

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011

課題番号：23659167

研究課題名（和文） Nrf2 による造血幹細胞の自己複製調節機構の解析

研究課題名（英文） Mechanism of Nrf2-mediated self-renewal of hematopoietic stem cells

研究代表者：山本 雅之（YAMAMOTO MASAYUKI）

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50166823

研究成果の概要（和文）：

細胞内の活性酸素レベルが幹細胞性の維持に大きく関与することが分かっている。そこで、酸化ストレス防御に寄与する酵素系を包括的に制御している Nrf2 に注目し、Nrf2 がどのように造血制御に関わるのか遺伝子改変動物を用いて解析した。その結果、Nrf2 の活性化が造血幹細胞の細胞周期を負に調節し、かつ、多能性前駆細胞の分化決定にも寄与していることを見いだした。

研究成果の概要（英文）：

It has been known that intracellular reaction oxygen specie (ROS) levels influence the maintenance of the stem cells. Nrf2 is a transcription factor that regulates the expression of antioxidant enzymes. In this study we analyzed the function of Nrf2 on hematopoietic system in mice. We found that Nrf2 negatively regulate cell-cycle progression of hematopoietic stem cells and contribute to the lineage commitment of multipotential progenitors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学

キーワード：転写因子・造血幹細胞・酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は、一生を通じて生体内に過不足なく細胞を供給し続けるために、その多くが静止期にとどまっており、静止期から細胞周期へのエントリーには細胞自律的、非自律的な制御を受けていると考えられている。近年、造血幹細胞内の活性酸素（ROS）レベルが幹細胞性の維持に大きく関与することが明らかにされつつある。特に、ATM 欠失マウスや FOXO3a 欠失マウスの解析から、これらの因子による造血幹細胞の活性酸素産生抑制が、造血幹細胞の自己複製能に大きく寄与していることが明らかになっている。

転写因子 Nrf2 は、酸化ストレス防御遺伝子群や抗炎症遺伝子群、薬物トランスポーター遺伝子群などを包括的に誘導し、酸化ストレスに対する恒常性維持機構の鍵となる因子である。申請者は、Nrf2 が E3 リガーゼのアダプターとして働く Keap1 分子により常に分解抑制を受けていること、酸化ストレス刺激を感じた Keap1 が Nrf2 の抑制を解除し、引き続いて Nrf2 が核内に速やかに蓄積することにより、迅速な酸化ストレス応答機構を獲得していることを明らかにしてきた。また、申請者は、Nrf2 ノックアウトマウスが加齢に従って貧血を呈すること、Nrf2 と Keap1 の発

現が造血細胞の分化段階で異なっており、骨髄長期再建能を有する造血幹細胞 (LT-HSC) での *Nrf2/Keap1* の mRNA 発現比が多能性骨髄前駆細胞 (MPP) に比べて高いこと、*Nrf2* ノックアウトマウスの LT-HSC の活性酸素レベルは野生型とほとんど変わらないが、*Keap1* のノックダウンマウスでは有意に低値であることを見いだしている。このことは、LT-HSC においても *Keap1-Nrf2* による活性酸素の調節機構が存在していること、LT-HSC では *Keap1* が少ないために酸化ストレス刺激による *Nrf2* の活性化が容易に起こりやすいことを示唆している。さらに申請者は、*Nrf2* ノックアウトマウスの LT-HSC の割合は野生型と同様であるが、静止期に存在している細胞が野生型より少ないこと、競合的骨髄再構築法を用いた解析でむしろ骨髄再建能が亢進していることを見いだしている。これらの事象は、*Keap1-Nrf2* による酸化ストレス感知システムが造血幹細胞の自己複製制御に関与している可能性を示唆している。

2. 研究の目的

白血病根絶のための大量抗がん剤投与や放射線照射は、骨髄抑制という重篤な副作用を引き起こす。その救済として造血幹細胞移植術が脚光を浴びているが、幹細胞数不足による移植適応制限は深刻な問題となっている。本研究は、造血幹細胞の自己複製制御機構の解明を通して、造血幹細胞の体外培養法の樹立をめざす研究シーズを開拓することを目的とする。造血幹細胞は、骨髄ニッチにおいて静止状態で存在しているが、なんらかの刺激により自己複製を開始する。また、自己複製の開始が細胞内の活性酸素量で制御されることが分かっている。本研究では、外環境の酸化ストレスを感知して細胞内活性酸素レベルを変化させる *Keap1-Nrf2* システムに焦点をあて、造血幹細胞における酸化ストレス感知システムの生理機能を明らかにしていく。

3. 研究の方法

野生型マウスの造血幹細胞を用いて培養や骨髄移植術などの通常の幹細胞機能解析を行った場合、環境からの刺激を感受して造血幹細胞の細胞内活性酸素レベルが変化してしまうことが予想される。*Keap1* ノックダウンマウス (*Nrf2* 恒常的機能亢進; *Keap1-KD*) を用いて、擬似的に外来からの刺激が“ある”状態を作出し、野生型マウスの造血幹細胞から得られた結果と比較検討しながら解析をすすめる。具体的には、

Keap1-KD マウスの骨髄細胞を、表面マーカーを指標に長期骨髄再建能を有する骨髄幹細胞などの各段階に分取し、血液学的解析、コロニー形成能解析を行う。また、競合的または非競合的な骨髄移植再建を行い、造血幹細胞の骨髄再建能、増殖能、多分化能を検討する。さらに、*Nrf2* 活性化剤や活性酸素レベルを低下させる薬剤投与に対する影響について解析する。

(1) 骨髄造血細胞の細胞分画の解析

Nrf2-KO や *Keap1-KD* マウスおよび野生型 (WT) マウスより骨髄細胞を採取する。分化マーカー陰性、*Sca1* 陽性、*c-Kit* 陽性 (KSL) 分画をさらに、*CD34* および *FLT3* 抗原性の有無により長期骨髄再建能を有する骨髄幹細胞 (LT-HSC)、短期骨髄再建能を有する骨髄幹細胞 (ST-HSC)、多能性前駆細胞 (MPP) の分布を検討する。また、系列特異的表面形質に体する抗体を用いて、顆粒球系、リンパ球系、赤血球系、巨核球系の比率を検討する。

(2) 骨髄造血幹細胞の *ex vivo* 培養

ex vivo 環境では骨髄ニッチからのシグナルもなく、また骨髄環境に比して高酸素に暴露されていると考えられる。そこで、*Nrf2-KO*、*Keap1-KD*、WT の LT-HSC を分取し、コロニーアッセイや液体培養を行い、コロニーの大きさや、細胞周期、増殖傾向などを比較する。

(3) 非競合的および競合的骨髄移植実験を用いた幹細胞の増殖能の解析

申請者は、*Nrf2-KO* マウスの骨髄細胞が WT マウスの骨髄細胞に比して骨髄再建能が亢進していることを見いだしている。すなわち、*Nrf2-KO* マウスでは、骨髄移植によって産生された活性酸素が排除されないため、造血幹細胞が自己複製しやすい状態になっている可能性が考えられる。そこで、以下の実験を行う。

①脾コロニー形成能の解析

Keap1-KO マウスの骨髄細胞を致死的放射線照射した同系マウスに移植し、8日目および12日目に、レシピエントマウスの脾臓に形成されたコロニー数、コロニー構成細胞を解析する。

②*Keap1-KO* マウスの骨髄細胞を用いて骨髄移植を行う。長期骨髄再建が得られた移植4ヶ月後ごろに、LT-HSC、ST-HSC、MPP、および、各細胞系列の前駆細胞の割合を測定する。

③*Keap1-KO* マウスの骨髄細胞を用いて競

合的骨髄移植を行う。Keap1-KD マウス骨髄細胞を、同数の野生型マウス骨髄細胞と混合し、致死放射線照射を行った同系レシピエントマウスに移植する。経時的に、末梢血中のドナー由来細胞の比率を検討する。

4. 研究成果

(1) 骨髄造血細胞の細胞分画の解析

Nrf2-KO の骨髄では、LT-HSC、ST-HSC、MPP の存在率や系列特異的前駆細胞分画に顕著な偏りはみられなかったが、Keap1-KD 骨髄では、LT-HSC の比率が減少し、MPP の比率が増大していた。また、Keap1-KD では、赤芽球系列への分化が抑制され骨髄球系列への分化する細胞が増大していた。このことは、Nrf2 を恒常的な活性化は、長期骨髄再建能を持つ細胞の減少を引き起こし、かつ、骨髄球系細胞への系列へと分化決定する事を示唆している。

(2) 骨髄造血幹細胞の *ex vivo* 培養

Keap1-KD マウスでは、LT-HSC の比率が減少し、MPP の割合が増加していた。このことは、①LT-HSC の自己複製能が障害されている、または、②LT-HSC から MPP への分化促進されている。事が考えられる。同マウスの LT-HSC をコロニー解析したところ、コロニー系性能は野生型と比較して同レベルに保たれていた。一方、MPP 細胞を用いたコロニー解析を行ったところ、顆粒球系列のコロニー数が有意に増大していた。

(3) 非競合的および競合的骨髄移植実験を用いた幹細胞の増殖能の解析

① 脾コロニー形成能の解析

8 日目の脾コロニー数は、Keap1-KD マウスで有意に減少していたが、12 日目の脾コロニー数は、若干減少していたものの有意ではなかった。以前の報告から、8 日目の脾コロニーは主に赤血球巨核球共通前駆細胞由来、12 日目の脾コロニーは主に多能性前駆細胞由来と考えられるので、Keap1-KD マウスでは、赤芽球系のコロニー形成細胞が顕著に減少していると考えられる。一方、LT-HSC 分画を選別し、同様に脾コロニー形成能を検討したところ、Keap1-KD では顕著にコロニー数が減少していた。

② 長期骨髄再建能の解析

Keap1-KD マウス由来の骨髄細胞を移植したレシピエントマウスでは、Keap1-KD マウスと同様に、LT-HSC の比率が減少し、MPP の比率が増大していた。また、赤芽球

系列への分化が抑制され骨髄球系列への分化する細胞が増大していた。このことは、Nrf2 の活性化による造血細胞での表現型は細胞自立的に引き起こされている事がわかった。

③移植施行後、16 週間経時的に観察したところ、末梢血有核細胞中では、Keap1-KD 由来の細胞の中で顆粒球系列の細胞比率が著しく増大していた。一方、16 週後のレシピエント中の LT-HSC では、Keap1-KD と野生型の比率がほとんど同じであった。このことは、Nrf2 の活性化が、特に、顆粒球系列への分化決定に大きく寄与している事を示している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Kaneko H, Kobayashi E, Yamamoto M, Shimizu R. Amino- and carboxyl-terminal transactivation domains of GATA1 coordinate the hematopoietic program. *J Biol Chem* in press (査読あり)

2. Hasegawa A, Shimizu R, Mohandas N, Yamamoto M. Mature erythrocyte membrane homeostasis is compromised by loss of the GATA1-FOG1 interaction. *Blood* 119: 2615-2623, 2012 (査読あり)

3. Asada N, Takase M, Nakamura J, Oguchi A, Asada M, Suzuki N, Yamamura K, Nagoshi N, Shibata S, Rao TN, Fehling HJ, Fukatsu A, Minegishi N, Kita T, Kimura T, Okano H, Yamamoto M, Yanagita M. Dysfunction of fibroblasts of extrarenal origin underlies renal fibrosis and renal anemia in mice. *J Clin Invest* 121: 3981-3980, 2011 (査読あり)

4. Tsuchiya Y, Morita T, Kim M, Iemura SI, Natsume T, Yamamoto M, and Kobayashi A. Dual regulation of the transcriptional activity of Nrf1 by {beta}-TrCP- and Hrd1-dependent degradation mechanisms. *Mol Cell Biol* 31: 4500-4512, 2011. (査読あり)

5. Suzuki N, Obara N, Pan X, Watanabe M, Jishage K, Minegishi N, and Yamamoto M. Specific contribution of the erythropoietin gene 3' enhancer to hepatic erythropoiesis after late embryonic stages. *Mol Cell Biol* 31: 3896-3905, 2011. (査読あり)

6. Mimura J, Kosaka K, Maruyama A, Satoh T, Harada N, Yoshida H, Satoh K, Yamamoto M, and Itoh K. Nrf2 regulates NGF mRNA induction by carnosic acid in T98G glioblastoma cells and normal human astrocytes. *J Biochem* 150: 209-217, 2011. (査読あり)

7. Hirotsu Y, Katsuoaka F, Itoh K, and Yamamoto M. Nrf2 degraon-fused reporter system: a new tool for specific evaluation of Nrf2 inducers. *Genes Cells* 16: 406-415, 2011. (査読あり)

8. Tatsumi K, Yamamoto-Mukai H, Shimizu R, Waguri S, Sou YS, Sakamoto A, Taya C, Shitara H, Hara T, Chung CH, Tanaka K, Yamamoto M, Komatsu M. The Ufm1-activating enzyme Uba5 is indispensable for erythroid differentiation in mice. *Nat Commun* 2 Article number: 181 (DOI: 10.1038/ncomms1182), 2011 (査読あり)

9. Kawatani Y, Suzuki T, Shimizu R, Kelly V, Yamamoto M. Nrf2 and selenoproteins are essential for maintaining oxidative homeostasis in erythrocytes and protecting against hemolytic anemia. *Blood*, 177:986-996, 2011 (査読あり)

[学会発表] (計5件)

1. Mitsuishi Y, Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Keap1 degradation by autophagy for the maintenance of redox homeostasis Discovery on Target. Cancer Cell Metabolism as Drug Target. Park Plaza Hotel & Towers, Boston, MA, USA. Nov, 2-3, 2011.

2. Suzuki T, Maher J, Yamamoto M. Select heterozygous Keap1 mutations have a dominant-negative effect on wild-type Keap1 *in vivo*. 16th World Congress on Advances in Oncology and 14th International Symposium on Molecular Medicine, Rhodes Island, Greece, October 6-8, 2011.

3. Mitsuishi Y, Taguchi K, Yamamoto M, Motohashi H. Nrf2 activates the pentose phosphate pathway and glutamine consumption in proliferating cells. 16th World Congress on Advances in Oncology and 14th International Symposium on Molecular Medicine, Rhodes, Island, Greece October 6-8, 2011.

4. Fujikawa N, Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Transcription factor Nrf2 drives the pentose phosphate pathway and glutamine consumption in proliferating cells. 16th World Congress on Advances in Oncology and 14th International Symposium on Molecular Medicine, Rhodes, Island, Greece October 6-8, 2011.

5. 清水律子 ダウン症候群随伴巨核芽球性白血病の分子基盤第58回東北小児白血病研究会 ホテルコムズ仙台 2011年6月4日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 雅之 (YAMAMOTO MASAYUKI)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号 : 50166823

(2) 研究分担者

清水 律子 (SHIMIZU RITSUKO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号 : 40226262

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :