

令和元年5月20日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02661

研究課題名(和文) アミノ酸による造血幹細胞制御と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Hematopoietic stem cell control by amino acids and development of novel therapeutic methods

研究代表者

中内 啓光 (Hiromitsu, Nakauchi)

東京大学・医科学研究所・特任教授

研究者番号：40175485

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,500,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞は骨髄の微小環境において未分化性を維持している。筆者らは、骨髄におけるアミノ酸の濃度は不均一であることを発見し、おのおののアミノ酸と造血幹細胞の機能との関係について解析した。その結果、バリンを含まない培養液において造血幹細胞はすみやかに未分化性を消失した。マウスにバリンを含まない飼料で長期間にわたり飼育したところ体内の造血幹細胞は減少し、さらに、放射線を照射することなく造血幹細胞の移植が成立した。これらの知見から、アミノ酸の制御が新しい造血幹細胞の移植法となりうる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究期間内に我々は、造血にアミノ酸のバランスが非常に重要であることが示された。これらの発見は今後の骨髄ニッチの機能および造血についてのさらなる研究が期待される。また、造血幹細胞と骨髄ニッチとの相互作用と同様の概念が白血病幹細胞においても提唱されていることから、バリンの欠乏した環境が造血幹細胞と同様に白血病細胞など悪性腫瘍においても効果が期待でき、アミノ酸の制御は移植の前処置やがんの分野においても新しい治療法となる可能性が示唆できることから、社会的な意義や波紋は大きかった。

研究成果の概要(英文)：A specialized bone marrow microenvironment (niche) regulates hematopoietic stem cell (HSC) self-renewal and commitment. For successful donor-HSC engraftment, the niche must be emptied via myeloablative irradiation or chemotherapy. However, myeloablation can cause severe complications and even mortality. We found that the essential amino acid valine is indispensable for the proliferation and maintenance of HSCs. Both mouse and human HSCs failed to proliferate when cultured in valine-depleted conditions. In mice fed a valine-restricted diet, HSC frequency fell dramatically within 1 week. Furthermore, dietary valine restriction emptied the mouse bone marrow niche and afforded donor-HSC engraftment without chemoirradiative myeloablation. These project findings a critical role for valine in HSC maintenance and suggest that dietary valine restriction may reduce iatrogenic complications in HSC transplantation.

研究分野：免疫学、血液学、免疫学

キーワード：造血幹細胞 骨髄ニッチ アミノ酸 バリン BCAA 骨髄移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は最もよく研究された幹細胞であり、幹細胞システムの旗艦モデルとして種々のコンセプトを提案してきた。その一つである「造血幹細胞ニッチ」は造血幹細胞の自己複製、分化、冬眠、増殖などを制御する役割を持つ骨髄微小環境を意味する。同様なニッチは造血幹細胞だけでなく、他の体性幹細胞についてもその存在が示唆されており、幹細胞の運命を決定する制御機構としていろいろな角度から研究が進められている。しかしながら、多くの研究者の努力によってニッチを構成する個々のコンポーネントに関する研究は進んでいるにもかかわらず、依然として骨髄幹細胞ニッチの本態の統合的な理解は不十分であり、*in vitro* でこれを再構成することもできていない。

一方で「造血幹細胞ニッチ」は造血幹細胞移植の際にも重要な役割を持つ。ドナー造血幹細胞の生着には、致死量を超える放射線照射や化学療法などによってホストの造血幹細胞を「造血幹細胞ニッチ」から取り除くこと（骨髄破壊の前処置）が必要である。造血幹細胞移植は白血病や遺伝性血液疾患の治療に極めて有効な治療法であるものの、この前処置による副作用は大きな問題であり、造血幹細胞移植の適応を広げられない原因でもある。

申請者は高度に純化された造血幹細胞を用いてクローナルな解析を行うことにより幹細胞研究を概念的、定性的なものから現実的に定量的な研究へと変換させるとともに、方法論の開発を進めながら分子レベルでの理解を着実に進めてきた。最近、我々は必須アミノ酸の一つである Valine が造血幹細胞の増殖・生存に必須であることを見出した。そのような背景から以下の研究目的を考案するに至った。

2. 研究の目的

本研究プロジェクトでは、必須アミノ酸の一つである Valine が造血幹細胞の増殖/生存に必要であるという申請者等の最近の発見を基に、研究期間内で (1)造血幹細胞の Valine 依存性のメカニズムの解明、(2)造血幹細胞以外の組織幹細胞の維持・増殖に対する Valine ならびに他のアミノ酸の影響、(3)Valine 摂取制限を利用した造血幹細胞移植法の確立、(4)ヒト造血幹細胞ならびに白血病幹細胞の Valine 依存性の有無の解明、について研究を行い、これをてがかりにして造血幹細胞とニッチの相互作用の機構を統合的に理解するとともに、白血病やガンに対する画期的な治療法の開発のための Proof-of-concept を確立することを目指した。

3. 研究の方法

(1)造血幹細胞の Valine 依存性のメカニズムの解明

造血幹細胞および造血前駆細胞のアミノ酸依存性の詳細を *in vitro* ならびに *in vivo* で解明するとともに、これを手掛かりにして造血幹細胞に特異的なトランスポーターの発現、酸化ストレス経路などにおける Valine の役割を解析した。また、環境側のアミノ酸依存性、骨髄各種細胞におけるアミノ酸排出能について明らかにした。TOF/MS を利用して骨髄組織内でのアミノ酸分布を測定した。

(2)造血幹細胞以外の組織幹細胞の維持・増殖に対する Valine ならびに他のアミノ酸の影響。各種アミノ酸欠損飼料で2-4週間維持したマウスにおいて組織幹細胞、前駆細胞等に異常があるかどうかを詳細な病理組織学的解析により明らかにした。

(3)Valine 摂取制限を利用した造血幹細胞移植法の確立。

Valine の摂取制限によって最も効果的に非骨髄破壊性の移植を可能にする治療モデルを確立した。

(4) ヒト造血幹細胞ならびに白血病幹細胞の Valine 依存性の有無の解明

臍帯血由来の CD34 陽性細胞を免疫不全マウスに移植して生着を確認後、各種アミノ酸欠損飼料を与え、アミノ酸が造血幹細胞の生着に与える影響を解析する。各種白血病幹細胞モデルを用いて Valine をはじめとするアミノ酸感受性の有無を検索し、白血病幹細胞を対象としたアミノ酸欠損飼料による治療法の可能性を探った。

4 . 研究成果

申請者らは研究期間内に以上の研究成果を見出した。

(1)Valine が非常に低濃度な環境において造血幹細胞は幹細胞性を維持できず in vitro と in vivo で枯渇してしまう。(2)Valine を欠損した餌をマウスに与えることにより骨髄内の造血幹細胞が枯渇することに注目し放射線などの全処置を用いずに安全な造血幹細胞移植を実験的に成功させた。(3)骨髄中で Valine を分泌している細胞を同定した。(4)造血幹細胞の維持には BCAA のバランスが非常に大事であることを明らかにした。(5)BCAA ダイエット法によりより安全に造血幹細胞の移植を行えることを示した。(6)白血病細胞にも一部のアミノ酸欠損ダイエットは有効であることが実証された。これらの成果は国際的な科学雑誌により報告された。

Adam et al., 2018 Exp Hematolo. Taya et al., 2016 Science.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 24 件)

- (1) Yamamoto R, Wilkinson AC, Nakauchi H. Changing concepts in hematopoietic stem cells. Science. 2018 362(6417):895-896. doi: 10.1126/science.aat7873. 査読有
- (2) van Galen P, Mbong N, Kreso A, Schoof EM, Wagenblast E, Ng SWK, Krivdova G, Jin L, Nakauchi H, Dick JE. Integrated Stress Response Activity Marks Stem Cells in Normal Hematopoiesis and Leukemia. Cell Rep. 2018 25(5):1109-1117.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2018.10.021. 査読有
- (3) Taoka K, Arai S, Kataoka K, Hosoi M, Miyauchi M, Yamazaki S, Honda A, Aixinjueluo W, Kobayashi T, Kumano K, Yoshimi A, Otsu M, Niwa A, Nakahata T, Nakauchi H, Kurokawa M. Using patient-derived iPSCs to develop humanized mouse models for chronic myelomonocytic leukemia and therapeutic drug identification, including liposomal clodronate. Sci Rep. 2018 8(1):15855. doi: 10.1038/s41598-018-34193-1. 査読有
- (4) Hamanaka S, Umino A, Sato H, Hayama T, Yanagida A, Mizuno N, Kobayashi T, Kasai M, Suchy FP, Yamazaki S, Masaki H, Yamaguchi T, Nakauchi H. Generation of Vascular Endothelial Cells and Hematopoietic Cells by Blastocyst Complementation. Stem Cell Reports. 2018 pii: S2213-6711(18)30359-X. doi: 10.1016/j.stemcr.2018.08.015. [Epub ahead of print] 査読有
- (5) Ishizuka S, Lai CY, Otsu M, Nakauchi H, Nagamune T, Kawahara M. Designing Motif-Engineered Receptors To Elucidate Signaling Molecules Important for Proliferation of Hematopoietic Stem Cells. ACS Synth Biol. 2018 7(7):1709-1714. doi: 10.1021/acssynbio.8b00163. Epub 2018 Jun 21. 査読有
- (6) Tadokoro Y, Hoshii T, Yamazaki S, Eto K, Ema H, Kobayashi M, Ueno M, Ohta K, Arai Y, Hara E, Harada K, Oshima M, Oshima H, Arai F, Yoshimura A, Nakauchi H, Hirao A. Spred 1 safeguards hematopoietic homeostasis against diet-induced systemic stress. Cell Stem Cell. 2018 May 3;22(5):713-725.e8. doi:10.1016/j.stem.2018.4.002. Epub 2018 Apr 26. 査読有
- (7) Wilkinson AC, Morita M, Nakauchi H, Yamazaki S. Branched-chain amino acid depletion conditions bone marrow for hematopoietic stem cell transplantation avoiding amino acid imbalance-associated toxicity. Exp. Hematol. 2018 Jul;63:12-16.e1 doi:10.1016/j.exphem.2018.04.004. Epub 2018 Apr 26. 査読有
- (8) Yamamoto R, Wilkinson A C, Oehara J, Lan X, Lai C Y, Nakauchi Y, Pritchard J K, Nakauchi H. Large-Scale Clonal Analysis Resolves Aging of the Mouse Hematopoietic Stem Cell Compartment. Cell Stem Cell 2018 22: 600-607 e604. doi: 10.1016/j.stem.2018.03.013. 査読有

- (9) Kon A, [Yamazaki S](#), Nannya Y, Kataoka K, Ota Y, Nakagawa M.M, Yoshida K, Shiozawa Y, Morita M, Yoshizato T, Sanada M, Nakayama M, Koseki H, [Nakauchi H](#), and Ogawa S. Physiological Srsf2 P95H expression causes impaired hematopoietic stem cell functions and aberrant RNA splicing in mice. *Blood* 2018. 131: 621-635. doi: 10.1182/blood-2017-01-762393. Epub 2017 Nov 16. [査読有](#)
- (10) Wilkinson AC, [Nakauchi H](#), Göttgens B. Mammalian Transcription Factor Networks: Recent Advances in Interrogating Biological Complexity. *Cell Syst.* 25;5(4):319-331. doi: 10.1016/j.cels.2017.07.004. Review. [査読有](#)
- (11) Ren Y, Sekine-Kondo E, Shibata R, Kato-Itoh M, Umino A, Yanagida A, Satoh M, Inoue K, Yamaguchi T, Mochida K, Nakae S, Van Kaer L, Iwabuchi K, [Nakauchi H](#), Watarai H. A Novel Mouse Model of iNKT Cell-deficiency Generated by CRISPR/Cas9 Reveals a Pathogenic Role of iNKT Cells in Metabolic Disease. *Sci Rep.* 7(1):12765. doi: 10.1038/s41598-017-12475-4. [査読有](#)
- (12) Saka K, Lai CY, Nojima M, Kawahara M, Otsu M, [Nakauchi H](#), Nagamune T. Dissection of Signaling Events Downstream of the c-Mpl Receptor in Murine Hematopoietic Stem Cells Via Motif-Engineered Chimeric Receptors. *Stem Cell Rev.* 2018 Feb;14(1):101-109. doi: 10.1007/s12015-017-9768-7. [Epub ahead of print] [査読有](#)
- (13) Tsukada M, Ota Y, Wilkinson AC, Becker HJ, Osato M, [Nakauchi H](#), [Yamazaki S](#). In Vivo Generation of Engraftable Murine Hematopoietic Stem Cells by Gfi1b, c-Fos, and Gata2 Overexpression within Teratoma. *Stem Cell Reports.* 2017 Oct 10;9(4):1024-1033. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.08.010. Epub 2017 Sep 21. [査読有](#)
- (14) Shimazu H, Munakata S, Tashiro Y, Salama Y, Dhahri D, Eiamboonsert S, Ota Y, Onoda H, Tsuda Y, Okada Y, [Nakauchi H](#), Heissig B, Hattori K. Pharmacological targeting of plasmin prevents lethality in a murine model of macrophage activation syndrome. *Blood.* 130(1):59-72. doi:10.1182/blood-2016-09-738096. Epub 2017 Mar 21. [査読有](#)
- (15) Aihara A, Koike T, Abe N, Nakamura S, Sawaguchi A, Nakamura T, Sugimoto N, [Nakauchi H](#), Nishino T, Eto K. Novel TPO receptor agonist TA-316 contributes to platelet biogenesis from human iPS cells. *Blood Adv.* 2017 Feb 28;1(7):468-476. doi: 10.1182/bloodadvances.2016000844. eCollection 2017 Feb 28. [査読有](#)
- (16) Ieyasu A, Ishida R, Kimura T, Morita M, Wilkinson AC, Sudo K, Nishimura T, Oehara J, Tajima Y, Lai CY, Otsu M, Nakamura Y, Ema H, [Nakauchi H](#), [Yamazaki S](#). An All-Recombinant Protein-Based Culture System Specifically Identifies Hematopoietic Stem Cell Maintenance Factors. *Stem Cell Reports.* 8(3):500-508. doi:10.1016/j.stemcr.2017.01.015. Epub 2017 Feb 23. [査読有](#)
- (17) Tajima Y, Ito K, Umino A, Wilkinson AC, [Nakauchi H](#), [Yamazaki S](#). Continuous cell supply from Krt7-expressing hematopoietic stem cells during native hematopoiesis revealed by targeted in vivo gene transfer method. *Sci Rep.* 7:40684. doi: 10.1038/srep40684. [査読有](#)
- (18) Ishida T, Suzuki S, Lai C Y, [Yamazaki S](#), Kakuta S, Iwakura Y, Nojima M, Takeuchi Y, Higashihara M, [Nakauchi H](#). and Otsu M. 2017. Pre-Transplantation Blockade of TNF-alpha-Mediated Oxygen Species Accumulation Protects Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cells.* 35:989-1002. doi: 10.1002/stem.2524. Epub 2016 Nov 11. [査読有](#)
- (19) Yokoi T, Yokoi K, Akiyama K, Higuchi T, Shimada Y, Kobayashi H, Sato T, Ohteki T, Otsu M, [Nakauchi H](#), Ida H. and Ohashi T. 2016. Non-myeloablative preconditioning with ACK2 (anti-c-kit antibody) is efficient in bone marrow transplantation for murine models of mucopolysaccharidosis type II. *Mol Genet Metab.* 119:232-238. doi: 10.1016/j.ymgme.2016.08.003. Epub 2016 Aug 21. [査読有](#)
- (20) Taya Y, Ota Y, Wilkinson A.C, Kanazawa A, Watarai H, Kasai M, [Nakauchi H](#). and [Yamazaki S](#). 2016. Depleting dietary valine permits nonmyeloablative mouse hematopoietic stem cell transplantation. *Science.* 354:1152-1155. PMID: 27934766. [査読有](#)
- (21) Koide S, Oshima M, Takubo K, [Yamazaki S](#), Nitta E, Saraya A, Aoyama K, Kato Y, Miyagi S, Nakajima-Takagi Y, Chiba T, Matsui H, Arai F, Suzuki Y, Kimura H, [Nakauchi H](#), Suda T, Shinkai Y. and Iwama A. 2016. Setdb1 maintains hematopoietic stem and progenitor cells by restricting the ectopic activation of nonhematopoietic genes. *Blood.* 128:638-49. doi: 10.1182/blood-2016-01-694810. Epub 2016 Jun 14. [査読有](#)
- (22) Ishida T, Takahashi S, Lai C Y, Nojima M, Yamamoto R, Takeuchi E, Takeuchi Y, Higashihara M, [Nakauchi H](#). and Otsu M. 2016. Multiple allogeneic progenitors in combination function as a unit to support early transient hematopoiesis in

transplantation. J Exp Med. 213:1865-80. doi: 10.1084/jem.20151493. Epub 2016 Aug 8. 査読有

- (23) Durruthy-Durruthy J, Wossidlo M, Pai S, Takahashi Y, Kang G, Omberg L, Chen B, Nakauchi H, Reijo Pera R. and Sebastiano V. 2016. Spatiotemporal Reconstruction of the Human Blastocyst by Single-Cell Gene-Expression Analysis Informs Induction of Naive Pluripotency. Dev Cell. 38:100-15. doi: 10.1016/j.devcel.2016.06.014. 査読有
- (24) Chen J Y, Miyanishi M, Wang S K, Yamazaki S, Sinha R, Kao K S, Seita J, Sahoo D, Nakauchi H. and Weissman I L. 2016. Hoxb5 marks long-term haematopoietic stem cells and reveals a homogenous perivascular niche. Nature. 530:223-7. doi: 10.1038/nature16943. 査読有

〔学会発表〕(計 14 件)

- (1) Hiromitsu Nakauchi, “ Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells: Dream or reality? ” Prof. Ken-ichi Arai Memorial Symposium.2019
- (2) Hiromitsu Nakauchi, “ iPS 細胞から臓器をつくる： 国境を跨いだ挑戦 ” NPO健康医療開発機構 細胞医療の時代2018シリーズ「第7回 細胞移植から臓器移植へ」.2019
- (3) Hiromitsu Nakauchi, “ Stable ex vivo HSC expansion: dream or reality? ” Cambridge Stem Cell Symposium,2018
- (4) Hiromitsu Nakauchi, “ Clonal analysis of young and aged hematopoietic stem cells ” Mini Symposium at Lund University,2018
- (5) Hiromitsu Nakauchi, “ Stem Cell Niche: From Cells to Organs ” Cell Press Lablinks, 2017
- (6) Hiromitsu Nakauchi, “ Clonal Analysis of Young and Aged Hematopoietic Stem Cells ” Regenerative Medicine Seminar Series (ReMS) , 2017
- (7) Hiromitsu Nakauchi, 幹細胞ニッチの概念を利用した新しい医療” 第9回血液疾患免疫療法学会学術集会共催ランチョンセミナー, 2017
- (8) Hiromitsu Nakauchi, “ 幹細胞とアミノ酸バランス (Stem Cells and Amino Acid Balance) ” 日本癌学会ランチョンセミナー, 2017
- (9) Hiromitsu Nakauchi, “ 幹細胞ニッチ：細胞から臓器へ ” 東京免疫フォーラム, 2017
- (10) Hiromitsu Nakauchi, “ From Stem Cells to Organs: Exploiting the organ niche for interspecies organogenesis ” Erasmus MC workshop,2016
- (11) Hiromitsu Nakauchi, “ Stem Cell niche--from cells to organs ” 7th Annual Stem Cell Biology and Regenerative Medicine Retreat,2016
- (12) Hiromitsu Nakauchi, “ From Stem Cells to Organs: Exploiting the organ niche for interspecific organogenesis ” Advances in Organogenesis and Tissue Engineering Symposia,2016
- (13) Hiromitsu Nakauchi, “ Stem Cell Niche ” - From Cells to Organs, University of Southern California,2016
- (14) Hiromitsu Nakauchi, “ Stem cell niche” from cells and organs”, Stower’s Li Lab,2016

〔産業財産権〕

出願状況(計 4 件)

名称：成人T細胞白血病リンパ腫を処置するために用いるための組成物およびその製造方法

発明者：中内啓光、石垣知寛、山崎聡、田矢祐規

権利者：国立大学法人東京大学

種類：特許

番号：特願 2018-531993

出願年：2019 年

国内外の別： 国内

名称：成人T細胞白血病リンパ腫を処置するために用いるための組成物およびその製造方法

発明者：中内啓光、石垣知寛、山崎聡、田矢祐規

権利者：国立大学法人東京大学

種類：特許

番号：US16/323106 (米国)、EP17837079.7 (欧州)

出願年：2019 年

国内外の別： 国外

名称：成人T細胞白血病リンパ腫を処置するために用いるための組成物およびその製造方法

発明者：中内啓光、石垣知寛、山崎聡、田矢祐規
権利者：国立大学法人東京大学
種類：特許
番号：、PCT/JP2017/028333
出願年：2017年
国内外の別： 国外

名称：成人T細胞白血病リンパ腫を処置するために用いるための組成物およびその製造方法
発明者：中内啓光、石垣知寛、山崎聡、田矢祐規
権利者：国立大学法人東京大学
種類：特許
番号：2016-154646
出願年：2016年
国内外の別： 国内

取得状況（計1件）

名称：造血幹細胞を減少させる組成物およびその製造方法
発明者：中内啓光、山崎聡、田矢裕規
権利者：国立大学法人東京大学
種類：特許
番号：第6449909号
取得年：2018年
国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/sct/>
<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/saisei/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：山崎 聡
ローマ字氏名： YAMAZAKI, Satoshi
所属研究機関名：東京大学
部局名：医科学研究所
職名：特任准教授
研究者番号（8桁）：50625580

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。