

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22641

研究課題名(和文)Thrombopoietin応答チューニングを基軸とした試験管内造血幹細胞増幅法

研究課題名(英文)The maintenance of hematopoietic stem cells through tuning TPO response

研究代表者

梅本 晃正(Umemoto, Terumasa)

熊本大学・国際先端医学研究機構・特任准教授

研究者番号：50620225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、造血幹細胞の増殖・維持・分化を司るサイトカイン「Thrombopoietin (TPO)」の機能において、栄養状態がTPOの分化誘導効果において、重要な役割を果たすことが明らかになった。また、造血幹細胞はクロマチンアクセシビリティを変化させることで、TPOの応答性を制御していた。加えて、TPOの分化誘導に関しては上記のクロマチンアクセシビリティの変化に加え、Aclyに依存したヒストンアセチル化の活性化が必要であることも見出した。さらに、低栄養系+Acly抑制条件下で、造血幹細胞を培養すると、特に分裂が早い分画において、TPOによる分化誘導が抑制され、幹細胞性を維持された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果は、造血幹細胞における「Thrombopoietin (TPO)」の相反する効果が制御されるメカニズムの一端を明らかにした。さらに、幹細胞研究において、「自己複製・分化誘導の選択機構」の解明は古くからの大きな問いであり、本研究の成果は、TPO刺激をモデルとして、その機構の解明に寄与したと考えられる。さらに、TPO刺激と代謝制御が試験管内での造血幹細胞維持に寄与することも見出した。従って、本研究の成果は「造血幹細胞の増幅・維持が可能な培養条件」の開発に寄与すると考えられ、将来的には、骨髄移植療法の質・安全・適応の拡大や、造血幹細胞を用いた遺伝子療法にも大きく貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that the regulation of glucose or glutamine uptake is important to regulate the differentiation of hematopoietic stem cells (HSCs) in the presence of Thrombopoietin (TPO), which have multi-functions in HSCs. In addition, we suggested that HSCs regulate TPO responses through changing chromatin accessibility pattern. In addition of the change of changing chromatin accessibility pattern, Acly-dependent histone acetylation is required to induce the differentiation of HSCs under TPO stimulation. Moreover, the combination between low nutrition and Acly suppression contributes to the maintenance of stem-ness especially within the rapidly divided HSC fraction.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：造血幹細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

成人男性の場合、赤血球は約 3,000,000 細胞/秒、白血球は約 300,000 細胞/秒と、膨大な数の血液細胞が日常的に絶え間なく産生され続けている。これら血液細胞の源であり、体性幹細胞の一つである造血幹細胞は自己複製能と多分化能を駆使して一生に渡り、この造血システムを維持し続ける。造血幹細胞は通常、骨髄中の“ニッチ”と呼ばれる微小環境に局在し、静止状態で維持されている (Ito K et al., *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; Nakamura-Ishizu A et al., *Dev Cell.* 2020)。造血幹細胞の静止状態維持機構の破綻は、幹細胞の消耗・老化を引き起こし、最終的には造血不全や白血病に至るため、造血幹細胞の静止期維持は造血の恒常性維持において重要な機構である (Mendelson A et al., *Nat Med.* 2014; Trumpp A et al., *Nat Rev Immunol.* 2010)。また最近では、静止期造血幹細胞は他の前駆細胞と比較して低いミトコンドリア膜電位を示すことも明らかになった (Vannini N et al., *Nat Commun.* 2016)。また、ミトコンドリア活性化に伴い産生される活性酸素は幹細胞機能の減弱を誘導すること (Ito K et al., *Nature.* 2004)、幹細胞はミトコンドリア膜電位上昇を伴い分化すること (Vannini N et al., *Cell stem cell.* 2019) などから、定常状態時の造血幹細胞においては低代謝状態の維持が幹細胞性維持に重要であると認識されている。

一方で、放射線照射や 5-フルオロウラシル (5-FU) 等の抗癌剤投与で骨髄造血組織が重篤な損傷を負った状況 (ストレス造血) 下では、造血幹細胞は分裂を開始し、自己複製分裂で自身を維持・増幅する一方で、機能的な血液細胞の前駆体 (前駆細胞) に分化することで、造血組織の再構築を主導する (Harrison DE et al., *Blood.* 1991)。しかしながら、ストレス造血下で分裂誘導された造血幹細胞が「自己複製」と「分化」を選択するメカニズムに関しては、未だ不明な点が多い。その理由の一つとして、ストレス造血下では骨髄細胞全体で汎用されている造血幹細胞マーカーの発現が著しく変動してしまうため、造血幹細胞の正確な同定が困難であり、幹細胞の詳細な解析が進んでいなかった。一方で、申請者はストレス造血下でも integrin  $\beta$ 3 や EPCR 等の一部の幹細胞マーカーは、造血幹・前駆細胞において発現パターンが極めて安定していたことに着目し、これらを利用してストレス造血下に適応した造血幹細胞同定法を確立した (Umemoto et al., *EMBO J.* 2017)。さらに、申請者はこの方法を応用することで、申請者は造血幹細胞が分裂する時に活性化するエネルギー代謝 (細胞内  $Ca^{2+}$  濃度、ミトコンドリア膜電位、細胞内 ATP 量の上昇) を、 $Ca^{2+}$  チャンネルブロッカー等を用いて抑制すると、分裂後の幹細胞維持に寄与することを見出した (Umemoto et al., *J Exp Med.* 2018)。

トロンボポイエチン (TPO) は造血幹細胞の自己複製分裂を促すサイトカインとして知られる一方、巨核球への分化を誘導する重要因子としても知られている。しかしながら、造血幹細胞が TPO の相反する機能をどのように使い分けているメカニズムに関しては、未だに分かっていない。SH2B ファミリーに属するアダプター分子である Lnk の欠損は TPO 刺激時のみに、その下流である Jak2/STAT pathway の活性化を亢進させるため、Lnk 欠損造血幹細胞は自己複製能亢進モデルとして報告されている。一方で、造血幹細胞を *in vitro* で TPO で強く刺激すると Jak2/STAT pathway は強く活性化されるものの、分裂後に必ずしも自己複製分裂が優位に誘導される訳ではないことも確認している。従って、Lnk 欠損による造血幹細胞の自己複製能亢進には TPO/Jak2/STAT pathway の活性化に加え、他の機構の寄与も必要であることが示唆された。

従って、申請者は、分裂誘導時の造血幹細胞のエネルギー代謝状態が自己複製分裂・分化

分裂のスイッチとして機能していると考え、“抑制的なエネルギー代謝制御”というブレーキの制御下において、“分裂誘導刺激”というアクセルを同時に強く踏み込んだときに自己複製分裂が誘導されるという作業仮説に至った

## 2. 研究の目的

本研究では、造血幹細胞の増殖・維持・分化を司るサイトカイン TPO による“分裂誘導刺激”が、“エネルギー代謝抑制”という特殊なブレーキの制御下で、自己複製分裂誘導用にチューニングされるという仮説のもと(図 1)、自己複製分裂誘導に必要なエネルギー代謝制御と分裂誘導刺激の条件を明らかにする。

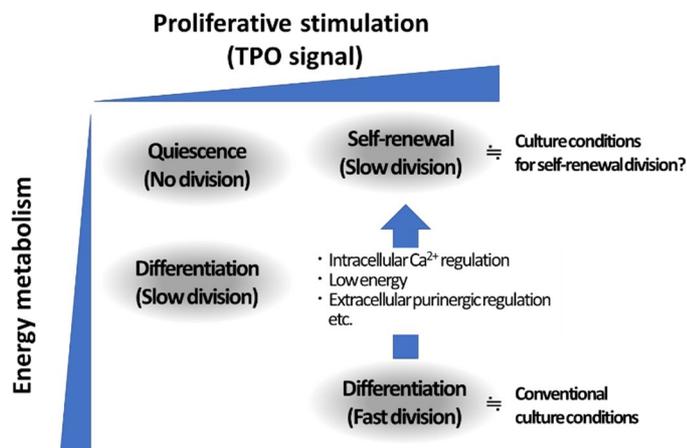


図 1. 本研究の仮説

通常培養条件下における「強い分裂誘導刺激」はエネルギー代謝の活性化を伴って、造血幹細胞の分裂を強く誘導し、分裂後に分化に至ってしまう(右下)。一方で、「弱い分裂誘導刺激」による分裂は、エネルギー代謝の活性化は抑えられ、分裂頻度も低くなるが、分裂後の幹細胞の維持には十分ではない(左下)。よって、様々な機構を介して低レベルのエネルギー代謝の維持させるための「ブレーキ」を踏みながら、分裂誘導刺激の「アクセル」を同時に強く踏み込んだときに造血幹細胞が自己複製分裂に至ると考えた(右中央から右上)。

## 3. 研究の方法

(a) “幹細胞維持型のエネルギー代謝制御”の特徴の抽出：

TPO を用いて、in vitro で造血幹細胞分裂を誘導すると顕著なエネルギー代謝の活性化を伴い、分裂後に分化してしまう。申請者は予備実験において、TPO 刺激時に Nifedipine 処理(細胞内  $Ca^{2+}$  濃度/ミトコンドリア膜電位の抑制)を用いてエネルギー代謝を抑制すると、分裂後の幹細胞維持に寄与することを確認している。従って、これらエネルギー代謝抑制が造血幹細胞のエネルギー代謝の状態に与える影響を比較し、共通点を“幹細胞維持型のエネルギー代謝抑制”の特徴として抽出する。

(b) エネルギー代謝制御が分裂後の細胞運命に及ぼす影響：

申請者は準備実験において、5-FU 投与によって骨髓組織損傷後(特に投与 8 日目以降から)造血幹細胞は自己複製分裂を通して幹細胞数を増加させるだけでなく、分化分裂により前駆細胞の供給にも寄与していることを確認している。さらに、5-FU 投与 8 日目から 9 日目にかけて造血幹細胞分画中にミトコンドリア膜電位の高い群( $m$  High)と低い群( $m$  Low)が共存し始めており、これら両者間ではエネルギー代謝制御や分裂後の運命が異なる可能性が考えられた。

この可能性を検討するために、5-FU 投与 9 日目の造血幹細胞分画中の  $m$  High と  $m$  Low におけるエネルギー代謝の状態を比較する。さらに、CFSE 標識した両群をそれぞれ別の 5-FU 投与 9 日目マウス(分裂誘導環境下)に移植し、その後の分裂回数と分裂後の表現型を比較する。これらの結果から、エネルギー代謝制御の相違が分裂後の細胞運命に影響していることを確認すると共に、自己複製分裂を優位に示す群のエネルギー代謝制御と上記(a)において同定された“幹細胞維持型のエネルギー代謝抑制”の特徴を比較し、両者の共通点を“自己複製分裂型

のエネルギー代謝抑制” の特徴として抽出する。

(c) エネルギー代謝が自己複製分裂・分化分裂をスイッチするメカニズム：

5-FU 投与後 4 ~ 6 日後の比較的「前期」の自己複製分裂造血幹細胞と投与後 9 日目の比較的「後期」の造血幹細胞分画において、これら両群の遺伝子発現、オープンクロマチン領域を RNA-Seq、ATAC-Seq、を用いて比較し、変動している因子・経路を抽出する。

(d) エネルギー代謝制御を基盤とした造血幹細胞増幅・維持のための培養条件の確立：

サイトカイン刺激（特に TPO の濃度）、エネルギー源の制限等の各条件を最適化し、組み合わせることで、“ TPO による分裂誘導刺激” によるアクセルの下、“自己複製分裂型のエネルギー代謝抑制” によるブレーキを in vitro で再現し、造血幹細胞の維持・増幅のための培養条件を確立する。さらに、(c)において抽出した自己複製分裂誘導の鍵となる因子・経路に対しての阻害剤・活性化剤があれば、適宜使用して in vitro での自己複製分裂を誘導する。

#### 4. 研究成果

(a) “幹細胞維持型のエネルギー代謝制御” の特徴の抽出：

5-FU 投与後 4 ~ 6 日後の比較的「前期」の自己複製分裂期の造血幹細胞のグルコース取り込み、細胞内グルタミン酸(グルタミン)レベルを解析したところ、いずれも他の前駆細胞と比較して、低栄養状態で分裂していることが明らかになった(図2)。さらに、興味深いことに、造血幹細胞を低エネルギー条件(ATP 産生に必要とされるグルコース、グルタミン、ピルビン酸を可能な限り制限した培養条件)下にて TPO 存在下で培養すると、通常培養条件と比較して、幹細胞性(EPCR の発現)が維持されること、巨核球系細胞の出現が著しく減少することを見出した。従って、グルコースやグルタミン等の栄養状態が TPO の分化誘導効果において、重要な役割を果たすことが明らかになった。

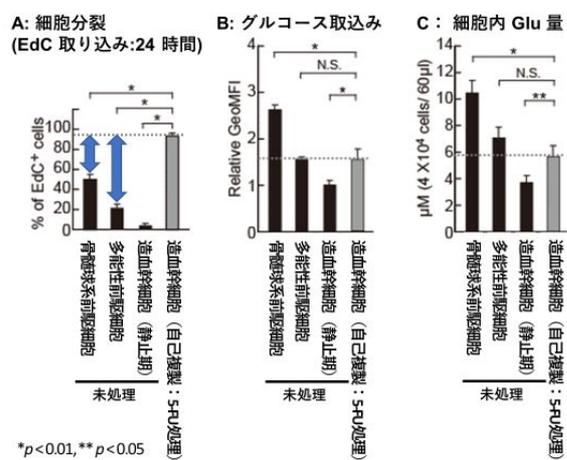


図2.自己複製分裂期の造血幹細胞の栄養状態

比較して、幹細胞性(EPCR の発現)が維持されること、巨核球系細胞の出現が著しく減少することを見出した。従って、グルコースやグルタミン等の栄養状態が TPO の分化誘導効果において、重要な役割を果たすことが明らかになった。

(b) エネルギー代謝制御が分裂後の細胞運命に及ぼす影響：

5-FU 投与後 9 日目の造血幹細胞において、ミトコンドリア膜電位の高い群(m High)と低い群(m Low)を、それぞれの 5-FU 投与 9 日目マウス(分裂誘導環境下)に移植し、その後の分裂回数と分裂後の表現型を比較したところ、両者間で大きな差は見られなかった。これらの結果から、この時点でのミトコンドリア膜電位の強弱は、定常状態時とは異なり、幹細胞機能とは関連しないことが分かり、5-FU 投与 9 日目の造血幹細胞のミトコンドリア膜電位はかなり流動的であり、不均一性もより高まっている可能性が考えられた。

(c) エネルギー代謝が自己複製分裂・分化分裂をスイッチするメカニズム：

5-FU 投与後 4 ~ 6 日後の比較的「前期」の自己複製分裂造血幹細胞と投与後 9 日目の比較

的「後期」の造血幹細胞分画において、オープンクロマチン領域を ATAC-Seq で比較したところ、「前期」から「後期」にかけて前駆細胞関連遺伝子のエンハンサー領域のアクセシビリティが上昇することが分かった。実際に、両時期の造血幹細胞を TPO 存在下で培養すると、「前期」の幹細胞からは巨核球系細胞は出現しない一方で、「後期」の幹細胞からは巨核球系幹細胞や CD48 + 前駆細胞が出現することが明らかになった。重要なことに、幹細胞から CD48 + 前駆細胞への分化は完全に TPO に依存していたことから、この現象も巨核球系への分化と同様に TPO による分化誘導の一つと考えられる。従って、造血幹細胞はクロマチンアクセシビリティの変化が、TPO の応答性の制御に關与する可能性が示唆された。さらに、CD48 + 前駆細胞への分化に関しては上記のクロマチンアクセシビリティの変化に加え、クエン酸からアセチル CoA の合成を行う酵素である Acly に依存したヒストンアセチル化の活性化が必要であることも見出した。

(d) エネルギー代謝制御を基盤とした造血幹細胞増幅・維持のための培養条件の確立：

これまでに、低栄養条件下と Acly 抑制が幹細胞から前駆細胞への分化の抑制に寄与することが示唆されたため、上記条件を組み合わせ、造血幹細胞を培養した。その結果、通常培養条件下では CD48 + 前駆細胞も巨核球系細胞も TPO 存在下で出現するが、低栄養 + Acly 抑制条件下では、どちらも出現も著しく抑制された。さらに、通常条件下では、分裂が早い細胞ほど、TPO 依存性の分化が進むことに着目し、低栄養 + Acly 抑制条件下において、同様に分裂が早い細胞の表現型を検討したところ、興味深いことに分裂した後でも幹細胞の特徴を維持していた。さらに、通常条件下と低栄養 + Acly 抑制条件下において、分裂が早い幹細胞同士を比較したところ、低栄養 + Acly 抑制条件下で培養した幹細胞のみ、放射線照射マウスに移植後に生着することが可能であった。このことから、低栄養 + Acly 抑制条件下において TPO 刺激すると、分化よりも幹細胞維持に傾くことが示され、幹細胞における TPO の機能制御において代謝調節は非常に重要であることが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Endoh Mitsuhiro, Baba Masaya, Endoh Tamie, Hirayama Akiyoshi, Nakamura-Ishizu Ayako, Umemoto Terumasa, Hashimoto Michihiro, Nagashima Kunio, Soga Tomoyoshi, Lang Martin, Schmidt Laura S., Linehan W. Marston, Suda Toshio	4. 巻 30
2. 論文標題 A FLCN-TEF3 Feedback Loop Prevents Excessive Glycogenesis and Phagocyte Activation by Regulating Lysosome Activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1823 ~ 1834.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.01.042	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukushima Tsuyoshi, Tanaka Yosuke, Hamey Fiona K., Chang Chih-Hsiang, Oki Toshihiko, Asada Shuhei, Hayashi Yasutaka, Fujino Takeshi, Yonezawa Taishi, Takeda Reina, Kawabata Kimihito Cojin, Fukuyama Tomofusa, Umemoto Terumasa, Takubo Keiyo, Takizawa Hitoshi, Goyama Susumu et al.	4. 巻 29
2. 論文標題 Discrimination of Dormant and Active Hematopoietic Stem Cells by G0 Marker Reveals Dormancy Regulation by Cytoplasmic Calcium	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 4144 ~ 4158.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.11.061	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takahara Yuji, Nakamura-Ishizu Ayako, Tan Darren Qiancheng, Fukuda Masahiro, Matsumura Takayoshi, Endoh Mitsuhiro, Arima Yuichiro, Chin Desmond Wai Loon, Umemoto Terumasa, Hashimoto Michihiro, Mizuno Hidenobu, Suda Toshio	4. 巻 3
2. 論文標題 High mitochondrial mass is associated with reconstitution capacity and quiescence of hematopoietic stem cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 2323 ~ 2327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2019032169	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sezaki Maiko, Hayashi Yoshikazu, Wang Yuxin, Johansson Alban, Umemoto Terumasa, Takizawa Hitoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Immuno-Modulation of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells in Inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 585367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.585367	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Arima Y, Nakagawa Y, Takeo T, Ishida T, Yamada T, Hino S, Nakao M, Hanada S, Umemoto T, Suda T, Sakuma T, Yamamoto T, Watanabe T, Nagaoka K, Tanaka Y, Kawamura Y, Tonami K, Kurihara H, Sato Y, Yamagata K, Nakamura T, Araki S, Yamamoto E, Izumiya Y, Sakamoto K, Kaikita K, Matsushita K, Nishiyama K, Nakagata N, Tsujita K	4. 巻 3
2. 論文標題 Murine neonatal ketogenesis preserves mitochondrial energetics by preventing protein hyperacetylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Metabolism	6. 最初と最後の頁 196 ~ 210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42255-021-00342-6	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto Michihiro, Umemoto Terumasa, Nakamura-Ishizu Ayako, Matsumura Takayoshi, Yokomizo Tomomasa, Sezaki Maiko, Takizawa Hitoshi, Suda Toshio	4. 巻 5
2. 論文標題 Autophagy is dispensable for the maintenance of hematopoietic stem cells in neonates	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 1594 ~ 1604
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2020002410	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Terumasa Umemoto, Michihiro Hashimoto, Toshio Suda
2. 発表標題 Low energy metabolism contributes to the maintenace of hematopoietic stem cells.
3. 学会等名 幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Terumasa Umemoto, Michihiro Hashimoto, Toshio Suda
2. 発表標題 エネルギー代謝を介した造血幹細胞の維持機構
3. 学会等名 日本血液学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------