

令和 5 年 4 月 18 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08733

研究課題名（和文）骨髄造血微小環境の質と量を制御する転写シグナルネットワークの解明

研究課題名（英文）Identification of transcriptional signaling networks that control the quality and quantity of the bone marrow microenvironment

研究代表者

細川 健太郎（Hosokawa, Kentaro）

九州大学・医学研究院・講師

研究者番号：90569584

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、骨髄間葉系幹細胞（MSC）におけるフォークヘッド転写因子Foxp2の造血支持能や自己複製能に対する機能を明らかにすることを目的とし、MSC特異的Foxp2欠損マウスの解析を行ったところ、MSCにおいて、自己複製能の低下と造血支持因子群の発現低下が起きることが分かった。さらにその影響から、造血幹細胞（HSC）の細胞周期や代謝の活性化が起き、自己複製能や骨髄再構築能の低下が起きていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりFoxp2の重要な役割とその発現低下がHSCの機能に影響を与えることが示されたが、このことは血液疾患の新たな治療法の開発に結び付く可能性がある。即ち、MSCにおけるFoxp2が制御する新たな造血支持機構は、造血幹細胞移植や再生医療の効果を向上させることに繋がると考えられる。またこの研究で明らかになった知見は、遺伝子治療の分野にも応用され、患者由来HSCの機能維持法の改善につながることを期待される。これらの成果は、血液疾患の治療に関する科学的知見の拡大や、現在の医療技術の進歩に貢献するだけでなく、患者の生活の質を向上させることにも繋がると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to clarify the function of the forkhead transcription factor Foxp2 on hematopoietic support and self-renewal in bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs), and analyzed MSC-specific Foxp2-deficient mice. We found that MSCs exhibit decreased self-renewal capacity and decreased expression of hematopoietic supporting factors. Furthermore, we found that the effects of Foxp2 deficiency on the cell cycle and metabolism of hematopoietic stem cells (HSCs) resulted in a decrease in self-renewal capacity and bone marrow remodeling capacity.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：間葉系幹細胞 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

生体組織には体性幹細胞を中心とした幹細胞システムが存在し恒常性が維持されている。幹細胞には自己複製能と多分化能という特異な能力が備わっているが、これらは周囲のニッチによって厳密に制御されている。幹細胞と種々のニッチ細胞とのシグナルが複合的に作用し合うことで、幹細胞の増殖や分化が制御されている。近年、骨髄において造血幹細胞のニッチとして同定された Leptin 受容体陽性間葉系細胞(LepR+MSC)は、自己複製能を持ち、静止状態を維持しつつニッチ因子群を産生して造血幹細胞の維持・制御に寄与することが報告されている(Ding L, 2012)。これまでに我々は、LepR+MSC において、骨髄に存在する他の HSC ニッチ細胞集団(骨芽細胞前駆細胞、骨内膜間葉系幹細胞、血管内皮細胞)と比較して高レベルにフォークヘッド転写因子 Foxp2 が発現していることを見出した。また近年の報告において、骨髄 MSC のシングルセル RNA-seq 解析の結果、MSC は均一な分画ではなく脂肪分化に関与する遺伝子を強く発現する Adipo-MSC (aMSC) から骨分化に関与する遺伝子が濃縮された Osteo-MSC (oMSC) までその発現分子の構成によってグラデーションを形成しており、aMSC は oMSC よりも HSC の支持能が高いことが示唆されている(Tikhonova et al., 2019)。本研究において標的とした Foxp2 は oMSC よりも aMSC に強く発現することが分かっている。一方で MSC の造血支持能に対する Foxp2 の機能については、不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

上記の背景のもと、本研究では正常 HSC のニッチ細胞である LepR+MSC において、転写因子 Foxp2 がどのような機能を持つのかについて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Foxp2 が MSC の表現型および造血支持因子に与える影響の解明

Foxp2 欠損マウス(Foxp2[FL/FL];LepR-Cre+)由来 MSC および HSC をそれぞれ採取して RNA-seq 解析を行い、網羅的に発現遺伝子の比較を行った。

(2) Foxp2 の MSC の代謝に与える影響の解析

MSC の骨髄中の絶対数や割合、MSC の細胞周期やミトコンドリア膜電位や活性酸素種(ROS)産生に基づくエネルギー代謝の比較を行った。

(3) MSC における Foxp2 の欠損が HSC の機能維持に与える影響の解析

Foxp2 欠損マウス(Foxp2[FL/FL];LepR-Cre+)骨髄における造血幹・前駆細胞の絶対数、割合、さらに HSC のエネルギー代謝の比較を行った。

(4) Foxp2 欠損マウスの骨髄微小環境による造血支持能の解析

Foxp2 欠損マウスの微小環境の造血支持能を比較するため、欠損マウスをレシピエントとして骨髄移植を行った。骨髄の前処置として致死量放射線照射を行ってから野生型マウス由来骨髄を移植し、末梢血および骨髄 HSC のキメリズムを比較した。

(5) Foxp2 欠損マウス由来 HSC の骨髄再構築能の解析

Foxp2 欠損マウス由来 HSC の骨髄再構築能の比較を行うため、欠損マウスから HSC を抽出し、野生型マウス全骨髄とともに、致死量放射線照射による前処置済みのレシピエントマウスに対し、競合移植を行った。その後末梢血と 4 か月後の骨髄 HSC におけるキメリズムを解析した。

4. 研究成果

(1) Foxp2 が MSC の自己複製能および造血支持因子の産生に与える影響の解明

Foxp2 欠損マウス(Foxp2[FL/FL];LepR-Cre+)由来 MSC の RNA-seq 解析の結果、Foxp2-KO MSC において細胞周期の活性化やエネルギー産生に関する遺伝子の濃縮が起きていることが分かった。このことはまた MSC の細胞周期解析においても明らかであり、さらにエネルギー代謝の解析でもそれを証明していた。さらに骨髄における MSC の割合は欠損群で減少していることが分かり、MSC の自己複製能の低下が示唆された。このことは上記のような形質の変化が原因として考えられた。

一方で MSC の発現する造血幹細胞の支持因子群の比較を行ったところ、分泌因子では SCF や Angpt1 などの主要な因子群の低下が起きていることが分かった。このような変化は、HSC の支持能の低下に繋がることが考えられた。実際に支持能の低下に繋がっていることを確認するため、欠損マウスをレシピエントとして、野生型マウス由来全骨髄の移植を行った。末梢血キメリズムや血球分化には大きな異常は見られなかったが、4 か月後の骨髄中の HSC の割合が低下することが分かった。今回は放射線による骨髄破壊を伴う全骨髄の移植を行ったが、この方法は一旦破壊された微小環境の再構築の度合い(早さと質)を比較する意味も併せ持つため、純粋な

造血支持能の比較だけではない。一方近年では、骨髄非破壊による定常時微小環境の比較が可能となっているため(Kuribayashi et al., 2021)、今後こちらの方法でも比較を行い、骨髄再生過程を経ない、純粋な機能比較を行う予定である。

さらに、aMSC-oMSC 間の MSC 自体の形質変化もニッチ因子分泌に影響を与えることは前述のとおりであるため、RNA-seq および qPCR により遺伝子発現を比較したところ、Foxp2 欠損 MSC では骨分化に関連した遺伝子発現が高く、oMSC の傾向が強いことが分かった。このような変化もニッチ因子の発現低下に影響を与えた可能性が高いと考えられる。

(2) MSC における Foxp2 の欠損が HSC に及ぼす影響の解析

Foxp2 欠損の影響によって、Foxp2-KO マウス由来 HSC は対照群と比較して細胞周期やエネルギー代謝の活性化も起きていることが示唆された。さらに骨髄中における HSC の割合が低下したことから、自己複製能の低下またはアポトーシスの上昇が示唆された。さらに欠損マウス由来 HSC を採取して競合移植して、長期骨髄再構築能を比較したところ、対照群と比べて欠損群では再構築能の低下がみられた。このような表現型に対し、トランスクリプトームの面から確かめるため、Foxp2 欠損マウス由来 HSC に関しても RNA-seq 解析を行った。すると、静止期造血幹細胞特異的な遺伝子群の低下と、代謝に関連した遺伝子が濃縮されることが分かった。一方でアポトーシスなど生存に係る遺伝子群に差は見られなかったことから、HSC の分裂活性化に伴う自己複製能の低下が HSC の減少した原因と考えられた。

さらに詳しく解析すると、巨核球系の遺伝子が欠損群の HSC で強く濃縮されており、実際に FCM 解析でも巨核球系に特異的なマーカーの発現が増加していることが明らかになったことから、巨核球系分化が促進されていることが分かった。近年の報告では、HSC の巨核球系への分化促進はエネルギー代謝の活性化を伴うことが示されていることから、本研究の結果もこのような影響が HSC に及ぼされた可能性が考えられた (Nakamura-Ishizu et al., 2018)。一方で巨核球系への直接的な分化は、感染時の緊急対応のための幹細胞様巨核球前駆細胞の増産 (Haas et al., 2015) と同様の伝達経路が活性化していた可能性も考えられたが、RNA-seq 解析の結果からは炎症に関する遺伝子セットの濃縮は見られなかったため、この経路には依存しないタイプの機構であると考えられた。

巨核球系への分化を促進し得る分泌因子が欠損マウスの MSC から産生されていることが考えられたため、MSC に関する RNA-seq データの差次的遺伝子群から分泌因子を抽出し、Foxp2 の制御下にある分化促進候補因子として、現在個別に機能解析を進めているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Arai Fumio, Stumpf Patrick S., Ikushima Yoshiko M., Hosokawa Kentaro, Roch Aline, Lutolf Matthias P., Suda Toshio, MacArthur Ben D.	4. 巻 11
2. 論文標題 Machine Learning of Hematopoietic Stem Cell Divisions from Paired Daughter Cell Expression Profiles Reveals Effects of Aging on Self-Renewal	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Systems	6. 最初と最後の頁 640 ~ 652.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cels.2020.11.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Gotoh Kazuhito, Kunisaki Yuya, Mizuguchi Soichi, Setoyama Daiki, Hosokawa Kentaro, Yao Hisayuki, Nakashima Yuya, Yagi Mikako, Uchiumi Takeshi, Semba Yuichiro, Nogami Jumpei, Akashi Koichi, Arai Fumio, Kang Dongchon	4. 巻 23
2. 論文標題 Mitochondrial Protein Synthesis Is Essential for Terminal Differentiation of CD45 ⁺ TER119 ⁺ Erythroid and Lymphoid Progenitors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101654 ~ 101654
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101654	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	新井 文用 (Arai Fumio) (90365403)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	

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
---------	---------