

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21249059

研究課題名（和文）造血幹細胞の冬眠とそれを支える機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the mechanisms underlying maintenance of hematopoietic stem cell hibernation

研究代表者

中内 啓光（NAKAUCHI HIROMITSU）

東京大学医科学研究所・教授

研究者番号：40175485

研究成果の概要（和文）：造血幹細胞における Lipid raft (LR) 構造の形成阻害活性を指標に TGF- β を休眠維持・誘導シグナル源として同定し、次に骨髄内において TGF- β を活性化する分子を目印として non-myelinating Schwann 細胞をニッチ細胞として同定した。この Schwann 細胞は：自律神経を被覆する；ニッチシグナルを発現する；造血幹細胞と一定の割合で共局在する、といった特徴を有し、さらに骨髄より除去することで造血幹細胞活性が速やかに減弱・消失したことから、造血幹細胞の休眠状態を維持するための重要なニッチ細胞として働くことを示した。

研究成果の概要（英文）：Hematopoietic stem cells (HSCs) reside in a bone marrow niche in a nondividing state, from which they occasionally arise to undergo cell division. Yet, the mechanism underlying this unique feature remains largely unknown. We screened candidate niche signals that inhibit lipid raft clustering, and identified that transforming growth factor- β (TGF- β) efficiently induces HSC hibernation ex vivo. From these data, we uncovered a critical role for TGF- β as a candidate niche signal in the control of HSC hibernation and provided TGF- β as a novel tool for ex vivo modeling of the HSC niche. TGF- β is produced as a latent form by a variety of cells, so we next searched for those that express activator molecules for latent TGF- β . Nonmyelinating Schwann cells in bone marrow (BM) proved responsible for the activation. These glial cells ensheathed autonomic nerves, expressed HSC niche factor genes, and were in contact with a substantial proportion of HSCs. Autonomic nerve denervation reduced the number of these active TGF- β -producing cells and led to rapid loss of HSCs from BM. Collectively, we for the first time demonstrated that glial cells are components of a BM niche and maintain HSC hibernation by regulating activation of latent TGF- β .

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	11,300,000	3,390,000	14,690,000
2010 年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
2011 年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
年度			
年度			
総計	31,700,000	9,510,000	41,210,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科

キーワード：造血幹細胞、CD34 陽性細胞、骨髄微小環境、非髄鞘シュワン細胞、GFAP 陽性細胞、白血病幹細胞

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞の骨髄ニッチ細胞としては骨芽細胞、血管内皮細胞、細網細胞、間葉系幹細胞が候補として挙げられていたが、神経系の細胞の関与は示されておらず、また、ニッチ細胞の造血幹細胞に対する機能を特定の分子との関係で証明した例はほとんど知られていなかった。

2. 研究の目的

マウス、ヒトにおいて普遍的に働く造血幹細胞の冬眠（休眠）状態維持機構を骨髄微小環境側の細胞、因子との関係で明らかにし、造血幹細胞制御、白血病幹細胞研究へと応用すること。

3. 研究の方法

純化したマウス造血幹細胞において冬眠誘導因子として同定した TGF- β を骨髄内で活性化するのに必要な因子と共局在する細胞を免疫染色により同定した。同定した細胞における遺伝子発現等によりニッチシグナルの有無を確認した。生体マウスにおいて神経遮断処置を行い、ニッチ細胞として同定した non-myelinating Schwann 細胞を *in vivo* で消失させ、造血幹細胞の存在頻度、活性を追跡した。ヒトでは骨髄生検検体入手し、マウスと同様の細胞がニッチとして働きうるか解析した。

4. 研究成果

定常状態マウスの骨髄の免疫染色像では活性型 TGF- β とインテグリン β 8 が共局在していた。このインテグリンは神経系の細胞での発現が示されていることから GFAP 抗体による染色を行った結果、ひも状に染色が観察され、活性型 TGF- β 、インテグリン β 8 と共局在していた。他の細胞種との位置関係、異同について解析した結果、この GFAP 細胞を non-myelinating Schwann 細胞として同定した。この細胞が骨髄標本中で高頻度に造血幹細胞と接触して存在していることを示し、また外科的処置により自律神経を切断し骨髄中の当該細胞を減らすことで造血幹細胞が細胞周期に入り、その存在頻度を経時的に減じることとあわせて、機能的ニッチ細胞として働く細胞であると結論した。

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 27 件）

- ① Wang J, Sun Q, Morita Y, Jiang H, Groß A, Lechel A, Hildner K, Guachalla LM, Gompf A, Hartmann D, Schambach A, Wuestefeld T, Dauch D, Schrezenmeier H, Hofmann WK, Nakauchi H, Ju Z, Kestler HA, Zender L, Rudolph KL. A Differentiation Checkpoint Limits Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal in Response to DNA Damage. *Cell*, 査読有, 148: 1001-1014, 2012
- ② Oguro H, Yuan J, Tanaka S, Miyagi S, Mochizuki-Kashio M, Ichikawa H, Yamazaki S, Koseki H, Nakauchi H, Iwama A. Lethal myelofibrosis induced by Bmi1-deficient hematopoietic cells unveils a tumor suppressor function of the polycomb group genes. *J Exp Med*, 査読有, 209: 445-54, 2012
- ③ Yamazaki S, Ema H, Karlsson G, Yamaguchi T, Miyoshi H, Shioda S, Taketo MM, Karlsson S, Iwama A, Nakauchi H. Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell*, 査読有, 147: 1146-58, 2011
- ④ Suzuki N, Yamazaki S, Ema H, Yamaguchi T, Nakauchi H, Takaki S. Homeostasis of hematopoietic stem cells regulated by the myeloproliferative disease associated-gene product Lnk/Sh2b3 via Bcl-xL. *Exp Hematol*, 査読有, 40:166-74, 2011
- ⑤ Umemoto T, Yamato M, Ishihara J, Shiratsuchi Y, Utsumi M, Morita Y, Tsukui H, Terasawa M, Shibata T, Nishida K, Kobayashi Y, Petrich BG, Nakauchi H, Eto K, Okano T. Integrin- α v β 3 regulates thrombopoietin-mediated maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood*, 査読有, 119:83-94,2011
- ⑥ Nishino T, Wang C, Mochizuki-Kashio M, Osawa M, Nakauchi H, Iwama A. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by

garcinol, a potent inhibitor of histone acetyltransferase. *PLoS One*, 査読有, 6: e24298, 2011

- ⑦ Yoshida K, Sanada M, Shiraiishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, Sato Y, Sato-Otsubo A, Kon A, Nagasaki M, Chalkidis G, Suzuki Y, Shiosaka M, Kawahata R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Ishiyama K, Mori H, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Sugano S, Haferlach C, Koeffler HP, Shih LY, Haferlach T, Chiba S, Nakauchi H, Miyano S, Ogawa S. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*, 査読有, 478: 64-69, 2011
- ⑧ Tanimura S, Tadokoro Y, Inomata K, Binh NT, Nishie W, Yamazaki S, Nakauchi H, Tanaka Y, McMillan JR, Sawamura D, Yancey K, Shimizu H, Nishimura EK, Hair follicle stem cells provide a functional niche for melanocyte stem cells, *Cell Stem Cell*, 査読有, 8:177-87, 2011
- ⑨ Morita Y, Iseki A, Okamura S, Suzuki S, Nakauchi H, Ema H, Functional characterization of hematopoietic stem cells in the spleen, *Exp Hematol*, 査読有, 39:351-359, 2011
- ⑩ Nishimura K, Sano M, Ohtaka M, Furuta B, Umemura Y, Nakajima Y, Ikehara Y, Kobayashi T, Segawa H, Takayasu S, Sato H, Motomura K, Uchida E, Kanayasu-Toyoda T, Asashima M, Nakauchi H, Yamaguchi T, Nakanishi M, Development of defective and persistent sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming, *J Biol Chem*, 査読有, 11:4760-71, 2011
- ⑪ Takayama N, Nishimura S, Nakamura S, Shimizu T, Ohnishi R, Endo H, Yamaguchi T, Otsu M, Nishimura K, Nakanishi M, Sawaguchi A, Nagai R, Takahashi K, Yamanaka S, Nakauchi H, Eto K, Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells, *J Exp Med*, 査読有, 207:2817-30, 2010
- ⑫ Kaneko S, Otsu M, Nakauchi H, Reprogramming adult hematopoietic cells, *Curr Opin Hematol*, 査読有, 17:271-5, 2010
- ⑬ Ogawa S, Shih LY, Suzuki T, Otsu M, Nakauchi H, Koeffler HP, Sanada M, Deregulated intracellular signaling by mutated c-CBL in myeloid neoplasms, *Clin Cancer Res*, 査読有, 16:3825-31, 2010

⑭ Nakahata S, Yamazaki S, Nakauchi H, Morishita K. Downregulation of ZEB1 and overexpression of Smad7 contribute to resistance to TGF-beta1-mediated growth suppression in adult T-cell leukemia/lymphoma, *Oncogene*, 査読有, 29:4157-69, 2010

⑮ Morita Y, Ema H, Nakauchi H, Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment, *J Exp Med*, 査読有, 2010 207:1173-82, 2010

⑯ Sugawara T, Oguro H, Negishi M, Morita Y, Ichikawa H, Iseki T, Yokosuka O, Nakauchi H, Iwama A, FET family proto-oncogene Fus contributes to self-renewal of hematopoietic stem cells, *Exp Hematol*, 査読有, 38:696-706, 2010

⑰ Ogawa S, Sanada M, Shih LY, Suzuki T, Otsu M, Nakauchi H, Koeffler HP, Gain-of-function c-CBL mutations associated with uniparental disomy of 11q in myeloid neoplasms, *Cell Cycle*, 査読有, 9:1051-6, 2010

⑱ Oguro H, Yuan J, Ichikawa H, Ikawa T, Yamazaki S, Kawamoto H, Nakauchi H, Iwama A, Poised lineage specification in multipotential hematopoietic stem and progenitor cells by the polycomb protein Bmi1, *Cell Stem Cell*, 査読有, 6:279-86, 2010

⑲ Ohki M, Ohki Y, Ishihara M, Nishida C, Tashiro Y, Akiyama H, Komiyama H, Lund LR, Nitta A, Yamada K, Zhu Z, Ogawa H, Yagita H, Okumura K, Nakauchi H, Werb Z, Heissig B, Hattori K, Tissue type plasminogen activator regulates myeloid-cell dependent neoangiogenesis during tissue regeneration, *Blood*, 査読有, 115:4302-12, 2010

⑳ Takizawa H, Nishimura S, Takayama N, Oda A, Nishikii H, Morita Y, Kakinuma S, Yamazaki S, Okamura S, Tamura N, Goto S, Sawaguchi A, Manabe I, Takatsu K, Nakauchi H, Takaki S, Eto K, Lnk regulates integrin alphaIIb beta3 outside-in signaling in mouse platelets, leading to stabilization of thrombus development in vivo, *J Clin Invest*, 査読有, 120:179-90, 2010

21 Xiao W, Hong H, Kawakami Y, Kato Y, Wu D, Yasudo H, Kimura A, Kubagawa H, Bertoli LF, Davis RS, Chau LA, Madrenas J, Hsia CC, Xenocostas A, Kipps TJ, Hennighausen L, Iwama A, Nakauchi H, Kawakami T, Tumor suppression by phospholipase C-beta3 via SHP-1-mediated dephosphorylation of Stat5, *Cancer Cell*, 査読有, 16:161-71, 2009

22 Sanada M, Suzuki T, Shih LY, Otsu M, Kato M, Yamazaki S, Tamura A, Honda H, Sakata-Yanagimoto M, Kumano K, Oda H, Yamagata T, Takita J, Gotoh N, Nakazaki K, Kawamata N, Onodera M, Nobuyoshi M, Hayashi Y, Harada H, Kurokawa M, Chiba S, Mori H, Ozawa K, Omine M, Hirai H, Nakauchi H, Koefler HP, Ogawa S, Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms, *Nature*, 査読有, 460:904-8, 2009

23 Okabe M, Otsu M, Ahn DH, Kobayashi T, Wakiyama Y, Morita Y, Onodera M, Eto K, Ema H, Nakauchi H, Definitive proof for direct reprogramming of hematopoietic cells to pluripotency, *Blood*, 査読有, 114:1764-7, 2009

24 Yamazaki S, Nakauchi H, Insights into signaling and function of hematopoietic stem cells at the single-cell level, *Curr Opin Hemato*, 査読有, 16:255-8, 2009

25 Matsumoto K, Isagawa T, Nishimura T, Ogaeri T, Eto K, Miyazaki S, Miyazaki J, Aburatani H, Nakauchi H, Ema H, Stepwise development of hematopoietic stem cells from embryonic stem cells, *PLoS ONE*, 査読有, 4:e4820, 2009

26 Ogaeri T, Eto K, Otsu M, Ema H, Nakauchi H, The actin polymerization regulator WAVE2 is required for early bone marrow repopulation by hematopoietic stem cells, *Stem Cells*, 査読有, 27:1120-1129, 2009

27 Yamazaki S, Iwama A, Takayanagi S, Eto K, Ema H, Nakauchi H, TGF- β induces hibernation of hematopoietic stem cells in the bone marrow niche, *Blood*, 査読有, 113:1250-1256, 2009

[学会発表] (計 6 件)

① Hiromitsu Nakauchi. (invited) Non-myelinating schwann cells in the mouse bone marrow niche maintain hematopoietic stem cell hibernation through TGF- β signaling. Keystone Symposia, USA. 2011 年 6 月 14 日

② Hiromitsu Nakauchi. (invited) Non-myelinating Schwann cells in the mouse bone marrow niche maintain hematopoietic stem cell hibernation through TGF- β signaling. The Oklahoma Center for Adult Stem Cell Research (OCASCR), USA. 2011 年 5 月 20 日

③ Hiromitsu Nakauchi. (invited) 3rd Else Kröner-Fresenius Symposium on Molecular Mechanisms of Stem Cell Aging, Germany. 2011 年 4 月 1 日

④ Hiromitsu Nakauchi. (invited) Heterogeneity and a hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment. Symposium on Molecular Mechanisms of Adult Stem cell Aging, Germany. 2009 年 10 月 23 日 -25 日

⑤ Hiromitsu Nakauchi. (invited) Single-cell transplantation and clonal analysis of hematopoietic stem cells: Exploring heterogeneity and hierarchy. The 2009 ISEH (ISEH: International Society for Experimental Hematology) Donald Metclaf Lecture Award, Greece. 2009 年 9 月 9 日-12 日

⑥ Hiromitsu Nakauchi. (invited) What's 'blood donation'? A question from the future. 第 71 回日本血液学会総会, 京都. 2009 年 5 月 21 日-24 日

[産業財産権]
○出願状況 (計 2 件)

①名称: 多能性幹細胞からの血液細胞分化に関する培養方法
発明者: 佐野進弥、江藤浩之、高山直也、中内啓光
権利者: 東京大学、テルモ株式会社
種類: PCT
番号: JP2011/070563
出願年月日: 2011 年 9 月 9 日
国内外の別: 国外

②名称: 誘導型多能性幹細胞の製造方法
発明者: 中内啓光, 大津真, 高山直也, 安東赫
権利者: 東京大学
種類: PCT
番号: JP2011/063650
出願年月日: 2011 年 6 月 15 日
国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者
中内 啓光 (NAKAUCHI HIROMITSU)
東京大学医科学研究所・教授
研究者番号: 40175485

(2) 研究分担者
大津 真 (OTSU MAKOTO)
東京大学医科学研究所・特任准教授
研究者番号: 30361330