

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04861

研究課題名(和文) 二つの水酸化シグナルによる造血恒常性の統御機構の解明

研究課題名(英文) Impact of hydroxylation signals on homeostatic regulation of hematopoiesis

研究代表者

田久保 圭誉 (Takubo, Keiyo)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・生体恒常性プロジェクト長

研究者番号：50502788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞は自身の自己複製能と多分化能を通じて個体の生涯における血液細胞産生を担う。造血幹細胞制御における水酸化酵素の機能を検討し、造血幹細胞の制御においてプロリン水酸化酵素(prolyl hydroxylase; Phd)ファミリーが幹細胞活性と細胞周期、移植生着能の制御において不可欠な役割を果たすことを遺伝学的解析から見出した。また、ニッチ細胞における低酸素応答因子の機能を検討し、分化細胞産生において低酸素応答因子が必要であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Hematopoietic stem cells (HSCs) exhibit multilineage differentiation and self-renewal activities that maintain the entire hematopoietic system during an organism's lifetime. These abilities are sustained by intrinsic transcriptional programs and extrinsic cues from the microenvironment or niche. In this study we have clarified a pivotal role of prolyl hydroxylase (Phd) family genes in maintenance of stem cell capacity, cell cycle, and transplantation ability of HSCs. We also clarified a crucial role of hypoxia-inducible factor expressed in niche cells in generation of differentiated hematopoietic cells.

研究分野：血液学・幹細胞生物学

キーワード：造血幹細胞 低酸素応答 ニッチ細胞

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は自身の自己複製能と多分化能をもとに生涯にわたって各種の血液細胞を産生する。造血幹細胞が維持されている成体骨髄の環境は、低酸素環境であることが知られている。これまで研究代表者は造血幹細胞ニッチの非古典的な要素としての低酸素環境の重要性に着目して研究を展開してきた。その結果、造血幹細胞は低酸素によって安定化する転写因子、低酸素応答転写因子 (hypoxia-inducible factor; HIF) の HIF-1 の活性化を介してピルビン酸脱水素酵素 (pyruvate dehydrogenase; PDH) リン酸化酵素 (PDH kinase; Pdk) のうちの Pdk2 と Pdk4 の転写活性化を行うことを見出した。PDH はグルコースから解糖系の後半で産生されるピルビン酸をアセチル CoA へと変換する反応を触媒する。その結果ミトコンドリアの TCA サイクルを活性化する。Pdk2/4 をはじめとする Pdk ファミリーは PDH をリン酸化して不活性化し、その結果造血幹細胞においては、ピルビン酸は主に乳酸へと変換されて解糖系優位の代謝特性を取る。

これらの知見は得られていたものの、HIF がどのように骨髄の低酸素環境を感知して生涯にわたって造血幹細胞の維持と分化血液細胞の産生を行っているか、あるいは HIF 以外の低酸素センサーも造血恒常性に寄与しているかはいずれも明らかにならなかった。

2. 研究の目的

本研究では、低酸素環境による造血制御の全貌を理解することを企図して、特に HIF の制御に関わる水酸化酵素に着目した解析を進める。

プロリン水酸化酵素 (prolyl hydroxylase; PHD) は酸素依存性酵素であり、哺乳類では主に PHD1-3 までの 3 つのアイソザイムが知られている。いずれも通常の大気圧の酸素分圧下では HIF-1 のプロリン残基を水酸化する。水酸化された HIF-1 は E3 ユビキチンリガーゼである VHL によって認識されて、ユビキチン・プロテアソーム系によってタンパク質が破壊される。低酸素環境では PHD は酵素活性を失うために、HIF-1 はタンパク質が破壊されずに安定化され、転写因子として機能することが可能になる。一方、アスパラギン水酸化酵素 (asparaginyl hydroxylase あるいは factor-inhibiting HIF; FIH-1) も酸素依存性酵素で、通常酸素分圧下では HIF-1 のアスパラギン残基を水酸化する。水酸化アスパラギン残基を持つ HIF-1 は転写コアクティベーターの CBP/p300 と会合できず、転写因子としての活性が低下し十分機能できない。すなわち、PHD と FIH-1 はそれぞれ HIF-1 の機能発揮に重要である。本研究ではこれら 2 種類の水酸化シグナルが個体の生涯における造血幹細胞の数的あるいは機能的な維持に果たす役割を明らかにすることを目的と

した。

3. 研究の方法

本研究ではマウス造血幹細胞システムの検討を行った。遺伝学的な検討としては PHD ファミリーのうち、PHD2 単独、あるいは PHD1 から PHD3 までのコンディショナルノックアウトマウスを用意した。また、FIH-1 の相互作用分子である Mint3 の欠損動物についても検討を実施した。これらの遺伝子改変マウスはゲノム PCR による遺伝子型の決定の後、Cre ペプチドによる *in vitro* における単離造血幹細胞を用いた遺伝子欠損、あるいは CAG-CreERT2 トランスジーンによる *in vivo* における遺伝子欠損を誘導した。*in vivo* の検討ではマウス腹腔にタモキシフェンを 2mg ずつ 5 日間連続で投与して遺伝子欠損を誘導した。一方、ニッチ側における検討として、HIF ファミリーの中でも間葉系のニッチ細胞で主に発現している HIF-2 のコンディショナルノックアウトを、間葉系前駆細胞で発現する Prrx1-Cre を用いて実施した。血液学的な解析としては、スタンダードな末梢血カウンターによる血球解析や、末梢血、脾臓、胸腺、骨髄の細胞を単離し、蛍光抗体を用いたフローサイトメトリー解析を実施した。骨髄単核球や単離した造血幹細胞や前駆細胞を用いて血液学的な機能解析としては、サイトカインを添加した半固形培地を用いてコロニー形成能の検討を行った。幹細胞活性の定量に必要な、造血幹細胞移植によるレシピエントの生着能の検証についても実施した。ニッチ側の解析のためには主に形態学的な解析を実施し、HIF-2 欠損動物への野生型骨髄の逆移植実験も実施した。また、ソーティングにより純化した造血幹細胞から RNA を単離し、cDNA を合成して qPCR による遺伝子発現解析を行った。また、マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現変化の検索と、Gene set enrichment 解析も実施して発現変化する遺伝子セットの検討も行い、統合的な知見を得るように努めた。

4. 研究成果

タモキシフェン投与により PHD2 を誘導的にコンディショナルノックアウトしたマウスにおいてスタンダードな造血解析を行ったところ、同マウスは多血症を呈することが明らかになった。フローサイトメーターを用いた造血幹・前駆細胞分画の頻度と細胞数の検証を行ったところ、同マウスは多血症を呈するにもかかわらず、骨髄の造血幹細胞分画は比較的維持されていることが示唆された。さらに機能アッセイとして造血幹細胞移植や連続移植を行い幹細胞活性の測定を実施したところ、幹細胞活性の低下が認められたが、2 次移植においてはその低下は消失しており、軽微な幹細胞増殖の低下が示唆された。

次いで、PHD ファミリー全体が造血幹細胞で PHD1/2/3 トリプルノックアウトが可能

マウス (PHD1^{flox/flox} PHD2^{flox/flox} PHD3^{flox/flox}) を用意した。まず、細胞膜透過性の Cre ペプチドの短期処理により PHD1^{flox/flox} PHD2^{flox/flox} PHD3^{flox/flox} マウス由来の造血幹細胞を体外培養しながら PHD ファミリーの欠損を行った。遺伝子発現解析やゲノム解析などを組み合わせた結果、細胞膜透過性の Cre ペプチドは野生型の造血幹細胞にも強い細胞傷害活性を誘導する一方、PHD1^{flox/flox} PHD2^{flox/flox} PHD3^{flox/flox} マウス由来の造血幹細胞における遺伝子欠損誘導効率は低く、精密な造血幹細胞活性の検討ができないことが明らかとなった。そこで、CAG-CreERT2 トランスジェニックマウスとの交配を進め、タモキシフェン投与で PHD ファミリー全遺伝子を欠損できる動物を作製して検討を行った。腹腔内へのタモキシフェン投与で全 PHD ファミリー欠損を誘導したところ、マウスは多血症を呈し、造血幹細胞や前駆細胞分画の構成に変化が生じた。また、同マウスから造血幹細胞を単離して移植生着能の検討を行ったところ、強度の末梢血キメリズムの低下を観察した。以上の結果は、今回用意したマウスでは造血幹細胞システム全体の恒常性に異常が生じていることを示していた。既報では、主に造血幹細胞から前駆細胞への分化ブロックが中心である、と考えられていたコンセプトとは異なり、PHD ファミリーが造血幹細胞や前駆細胞のプールの維持や機能の発揮に必要で、その欠失は造血幹細胞機能を傷害することを示唆していると考えられた。一方、Mint3 遺伝子欠損では造血幹細胞の数や機能は基本的には維持されており、HIF の水酸化シグナルごとに造血幹細胞に及ぼす影響が異なると考えられた。

一方、ニッチ側における HIF の機能を検討するために、主たるニッチ細胞である骨髄の間葉系前駆細胞における HIF ファミリーの発現を検討したところ、HIF-2 の発現が高いことが見出された。そこで、Prrx1-Cre を用いて骨髄の間葉系前駆細胞を含む、間葉系の全細胞における HIF-2 の遺伝子欠損マウスを交配より作出して、造血動態の検討を行った。スタンダードな血液学的解析では、大きな異常は認めなかった一方、フローサイトメトリー解析による骨髄を含む各種造血器官の検討では野生型に比較していくつかの分化細胞コンパートメントの変化を認めた。また、各種の未分化血液細胞分画の数や頻度については大きな違いは存在しなかった。このマウスをレシピエントとした移植実験でも、移植されたドナー細胞の維持には変化がなかったことから、間葉系前駆細胞を中心としたニッチ細胞では HIF-2 は造血幹細胞維持においては大きな寄与はしていないことが示唆された。

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 7 件)

Morikawa T, Takubo K.
Use of Imaging Techniques to Illuminate Dynamics of Hematopoietic Stem Cells and Their Niches.
Front Cell Dev Biol. 2017 Jun 13;5:62.
doi: 10.3389/fcell.2017.00062.
eCollection 2017.

Karigane D, Takubo K.
Metabolic regulation of hematopoietic and leukemic stem/progenitor cells under homeostatic and stress conditions.
Int J Hematol. 2017 Jul;106(1):18-26.
doi: 10.1007/s12185-017-2261-x. Epub 2017 May 24

Karigane D, Kobayashi H, Morikawa T, Ootomo Y, Sakai M, Nagamatsu G, Kubota Y, Goda N, Matsumoto M, Nishimura EK, Soga T, Otsu K, Suematsu M, Okamoto S, Suda T, Takubo K.
p38 Activates Purine Metabolism to Initiate Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Cycling in Response to Stress.
Cell Stem Cell. 2016 Aug 4;19(2):192-204. doi: 10.1016/j.stem.2016.05.013. Epub 2016 Jun 23.

Kobayashi H, Suda T, Takubo K.
How hematopoietic stem/progenitors and their niche sense and respond to infectious stress.
Exp Hematol. 2016 Feb;44(2):92-100.
doi: 10.1016/j.exphem.2015.11.008. Epub 2015 Dec 2.

Nakamura-Ishizu A, Takubo K., Kobayashi H, Suzuki-Inoue K, Suda T. CLEC-2 in megakaryocytes is critical for maintenance of hematopoietic stem cells in the bone marrow.
J Exp Med. 2015 Nov 16;212(12):2133-46.
doi: 10.1084/jem.20150057. Epub 2015 Nov 9. Erratum in: J Exp Med. 2015 Dec 14;212(13):2323.

Morikawa T, Takubo K.
Hypoxia regulates the hematopoietic stem cell niche.
Pflugers Arch. 2015 Oct 21.

Kobayashi H, Kobayashi CI, Nakamura-Ishizu A, Karigane D, Haeno H, Yamamoto KN, Sato T, Ohteki T,

Hayakawa Y, Barber GN, Kurokawa M,
Suda T, Takubo K.
Bacterial c-di-GMP affects
hematopoietic stem/progenitors and
their niches through STING.
Cell Rep. 2015 Apr 7;11(1):71-84. doi:
10.1016/j.celrep.2015.02.066. Epub
2015 Apr 2.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

国立国際医療研究センター研究所生体恒常
性プロジェクト

<http://www.rincgm.jp/department/pro/04/>

<https://takubolab.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田久保 圭誉 (TAKUBO, Keiyo)

国立国際医療研究センター・研究所・生体
恒常性プロジェクト長

研究者番号：50502788

(2) 研究協力者

小林 央 (KOBAYASHI, Hiroshi)

森川 隆之 (MORIKAWA, Takayuki)

雁金 大樹 (KARIGANE, Daiki)

玉置 親平 (TAMAKI, Shinpei)

原口 美帆 (HARAGUCHI, Miho)