

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：82610

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15507

研究課題名(和文)造血幹細胞増幅剤の標的同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and characterization of biological targets of chemical expander for hematopoietic stem cells

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) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞は生後産生される全ての血液細胞を作り出す細胞で、骨髄移植に利用されて悪性造血器腫瘍等の治療に用いられる。現状では骨髄ドナーが限られていることから、試験管内で造血幹細胞を増幅する技術が骨髄移植に貢献する基盤的技術となると期待されている。近年いくつかの造血幹細胞増幅剤が報告されたが、その標的分子は未だ明らかになっていない。本研究は造血幹細胞増幅剤が標的とする分子(群)を同定し、それらの造血幹細胞制御における機能の同定を目指した研究を実施し、いくつかのターゲット候補を同定して機能的な標的である可能性を示唆するデータを得た。

研究成果の概要(英文)：Hematopoietic stem cells (HSCs) produce all the hematopoietic lineages after birth. HSCs are utilized for transplantation therapy for various hematological malignancies. Due to the limited source of donor HSCs, the development of HSC expansion method is highly required. Recently, several chemical expander for HSCs are reported. However, the endogenous targets for these expanders have not reported so far. In this study, we tried to identify the targets for the HSC expanders, and characterized the functions of the targets in hematopoietic stem cells.

研究分野：血液学・幹細胞生物学

キーワード：造血幹細胞

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は、生涯にわたり全身の血液細胞を継続的に生み出すことができる細胞集団である。陸生哺乳類の成体では、骨髄に局在して、近傍の低酸素環境も含めた微小環境(ニッチ)によって、自己複製能と多分化能を保持しながら血液細胞の産生を必要に応じて行う。しかし、現時点では人為的に自己複製関連シグナルを ON/OFF して造血幹細胞を自在に操作する技術は存在しない。白血病などの造血器悪性腫瘍の治療に際しては、造血幹細胞移植が根治療法として広く実施されている。移植に供する造血幹細胞のソースとしては、ドナー骨髄由来の造血幹細胞を含む骨髄細胞や、臍帯血に含まれる造血幹細胞、そして、サイトカイン G-CSF を用いて骨髄ニッチの造血幹細胞を末梢血へと動員して、採取・ドナー細胞とする末梢血幹細胞が移植に利用されている。しかしながら、ドナーが限られているという社会的な要素が存在する状況に加えて、末梢血からは十分な量の造血幹細胞が確保できない場合もあり、また、十分な細胞数を確保してもレシピエント患者に生着しないこともある。よって臨床的な側面からも造血幹細胞の制御機構を標的として試験管内の幹細胞増幅を可能とする創薬は重要な未解決の課題である。近年、造血幹細胞を試験管内で増幅する活性を持つ低分子化合物がいくつか同定・報告された。しかし、それらの造血幹細胞増幅剤の造血幹細胞上の標的分子と機能的な意義に関しては未だ明らかとなっていない状況である。

2. 研究の目的

近年になって同定されてきた、造血幹細胞を試験管内で増幅するとして同定された低分子化合物による処理で、試験管内の造血幹細胞の移植活性を増幅できることが報告されている。しかし、現状ではその標的分子は未だ明らかになっていない。そこで本研究はその標的分子(群)を同定し、それらの標的分子(群)が造血幹細胞の数や活性の制御における機能の同定を目指すものである。具体的にはまず、造血幹細胞増幅剤をベイト(釣餌)として、そこに対して結合するタンパク質を回収・抽出し、得られた結合タンパク質を同定する。次に、得られた造血幹細胞増幅剤に結合するタンパク質の造血幹細胞に対して果たす機能を解明し、新たな造血幹細胞の制御機構を同定する。

3. 研究の方法

本研究では、まず、造血幹細胞増幅剤およびネガティブコントロール分子をそれぞれスクリーニング用のベイトとする。ネガティブコントロール分子の選択が重要となると考えられる。造血幹細胞増幅剤の構造にある特有の構造を持つ化合物を選抜する。ネガティブコントロール分子候補も利用して、安定かつ効率よく造血幹細胞増幅剤あるいはネガ

ティブコントロール分子が結合したベイトが得られるように、反応する条件を最適化する。続けて、造血幹細胞の抽出物と、準備した造血幹細胞増幅剤あるいはネガティブコントロール分子を結合したベイトをそれぞれ反応させ、反応後のベイトを集めたのちに SDS-PAGE にて電気泳動し、得られたペプチドのバンドを質量分析器にかけて、造血幹細胞増幅剤とネガティブコントロール分子それぞれがもたらしたバンドの差分を見出して、造血幹細胞増幅剤に特異的に結合するタンパク質の候補を得る。得られた造血幹細胞増幅剤標的分子候補が実際に造血幹細胞で発現しているか、造血幹細胞、前駆細胞および分化細胞を用いて定量的 PCR 法とウェスタンブロッティングで検討する。さらに、造血幹細胞増幅剤の標的分子候補について、造血幹細胞へのベクターを用いた遺伝子発現抑制実験を行うことで、造血幹細胞が造血幹細胞増幅剤への結合能を失うか検討する。評価にはフローサイトメーターによる解析を実施する。遺伝子発現抑制の効率については複数のベクターのクローンを用いて、qPCR を用いて確実なロックダウンが起きていることを検証する。これらの検討で、造血幹細胞への結合能を失った候補分子を造血幹細胞増幅剤の実際の内在性の結合・標的分子と考える。次に、結合するだけでなく実際に機能する分子であるかの検証を実施する。まず、造血幹細胞増幅剤の活性が、結合標的分子のロックダウンあるいはロックアウトで消失するか *in vitro* の表面形質の解析と、コロニー形成能と移植生着能で検討する。この解析で実際に造血幹細胞増幅剤の標的として機能する分子であるかの確証を得る。得られた造血幹細胞増幅剤の機能的標的分子の機能解析のためにヒト造血幹細胞へのベクターを用いた遺伝子発現抑制システムを用いた検証を行い、コロニー形成能およびマウスへの連続移植実験による幹細胞活性の評価を行うことで実際に造血幹細胞増幅剤の機能的標的分子が造血幹細胞でいかなる機能を果たしているか(自己複製能、多分化能等)検討する。さらに、造血幹細胞増幅剤の機能的標的分子を失った造血幹細胞の遺伝子発現解析を実施して、下流で作動する遺伝子プログラムを理解する。

4. 研究成果

造血幹細胞増幅剤及びネガティブコントロール分子をそれぞれ化学結合させたスクリーニング用のベイトを準備した。その際、ビーズと化合物の量比を検討し、安定して高効率に化合物が結合したアフィニティナノビーズが得られるように条件を最適化した。次いで造血幹細胞の抽出物と、前項で準備したベイトをそれぞれ反応させ、反応後のビーズを集めたのちに電気泳動した。造血幹細胞増幅剤には結合するものの、ネガティブコントロール分子には結合しないペプチドのバン

ドを同定し、それらを切り出して質量分析器にかけることで造血幹細胞増幅剤に対して特異的に結合するタンパク質候補のリストを得た。得られた造血幹細胞増幅剤が標的としている分子の候補が実際に造血幹細胞で発現しているか検討したところ、それぞれ発現していることを確認した。引き続き、その相互作用が造血幹細胞増幅作用に関わるかについての検討を進めるために、特に膜タンパク質を候補として選抜し、当該分子をコードする遺伝子を標的とした shRNA を設計し、それを搭載したベクターを作製した。このベクターを利用して、生体内より単離した造血幹細胞に対して、ノックダウン実験を実施した。遺伝子発現定量実験から、このベクターによって標的分子の発現が造血幹細胞レベルで著減していることが見出された。そこで、単離してきた造血幹細胞を用いて造血幹細胞増幅剤処理の効果に変調が生じるかの検討を行った。そして、当該分子がノックダウンされた造血幹細胞をフローサイトメーターで分取したうえで造血幹細胞増幅剤を添加したうえで培養を継続したところ、増幅効果が減少していることを見出した。興味深いことに、当該分子のノックダウンのみでも造血幹細胞の体外維持や幹細胞活性の維持が困難になっていたことから、造血幹細胞増幅剤が標的とする分子は実際に造血幹細胞機能を定常時においても制御している分子であることが示唆された。

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)