

令和元年5月31日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16190

研究課題名(和文) ストレス応答の破綻を介したIFNによる造血幹細胞抑制機構の解明

研究課題名(英文) IFN γ -mediated regulation of hematopoietic stem cells in stress hematopoiesis

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・特任助教

研究者番号：50620225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：これまで、「造血幹細胞は維持するためには分裂をさせない」と考えられてきたが、本研究において、IFN γ が分裂抑制をしても幹細胞を維持出来ないメカニズム、さらには造血幹細胞が分裂後に幹細胞性を維持するメカニズムとして、エネルギー代謝制御の重要を見出した。従って、今後はエネルギー代謝制御が造血幹細胞の分裂と分裂後の幹細胞生維持に寄与するメカニズムの解明が望まれる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、「造血幹細胞は維持するためには分裂をさせない」と考えられてきたが、本研究において、分裂抑制をしても幹細胞を維持出来ないメカニズム、さらには造血幹細胞が分裂後に幹細胞性を維持するメカニズムの一端を見出すことが出来た。これらの成果は、造血幹細胞の体外増幅技術の開発に大きく寄与し、骨髄移植を用いた遺伝子治療や再生医療の発展に大きく寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：So far, it is thought that HSCs are maintained by suppressing cell divisions. In this study, we suggested that IFN γ is unable to maintain HSCs through the activation of energy metabolism while this cytokine suppresses HSC divisions. In addition, the appropriate suppression of energy metabolism contributes to HSC maintenance after cell divisions. Therefore, it is expected to clarified the mechanism how energy metabolism contributes to HSC divisions and the maintenance of stem-ness.

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、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

炎症性サイトカインであるインターフェロン γ (IFN γ) は再生不良性貧血等の造血不全が原因となる造血器疾患の誘導因子の一つとして考えられている。慢性的な IFN γ 刺激が造血幹細胞活性を喪失させるメカニズムにおいて、STAT1 (IFN γ シグナルで中心的な下流分子) の関与は報告されているが (Baldrige et al., *Nature*, 2010、de Bruin, *Blood*, 2013 他)、その詳細なメカニズムは未だ不明な点が多い。

これまでに申請者はこれまでの研究の一環で、IFN γ 刺激時の造血幹細胞を従来法よりも極めて高い精度で解析できる方法を確立した。IFN γ 影響下では、幹細胞マーカーである Sca1 の発現が一部の前駆細胞に誘導されるため、従来の造血幹細胞である CD150⁺CD34⁺c-kit⁺Sca1⁺Lineage⁻ (CD150⁺CD34⁺KSL) 分画では本来の幹細胞分画を正確に把握するのが困難であった。そこで、申請者は CD150⁺CD34⁺KSL 分画における integrin β 3 の発現パターンを手掛かりに IFN γ 刺激時に Sca1 の発現上昇を伴って造血幹細胞分画中に混入してくる前駆細胞を区別する手段を構築し、IFN γ 影響下の造血幹細胞の解析方法をより最適化した。実際に、この方法を用いて、IFN γ 影響下にある in vivo の造血幹細胞を解析したところ、IFN γ は造血幹細胞の自己複製分裂を促進しない(むしろ抑制している)、 α 幹細胞数は増加しない等、これまでの報告にはない現象が見出された。さらに、これらの現象は申請者がこれまでに展開していた研究で解析していた in vitro の造血幹細胞において観察される IFN γ の効果と酷似していた。従って、in vitro で IFN γ 刺激された造血幹細胞の解析をさらに推し進め、以下の4つの事象 (a. mTOR シグナル関連遺伝子群の発現上昇、b. 小胞体ストレス応答関連遺伝子群の発現上昇、c. STAT1 非依存的な細胞増殖亢進、d. STAT1 を介した細胞増殖抑制) に着目した。一般的に mTOR シグナルは細胞内の過剰に供給されたタンパク質、変性タンパク質、傷害された細胞小器官等の除去機構であるオートファジーを不活化するといわれている。「オートファジー不全」は不要タンパク質の除去を滞らせるため、小胞体ストレス等を助長し、細胞の正常な生理機能が妨げることが知られている。実際に、造血幹細胞においてもオートファジー不全が幹細胞活性の減弱を誘導することが既に報告されている (Mortensen et al., *J Exp Med*, 2011)。また、興味深いことに、上記 a、b は STAT1 非依存的な事象であることも確認している。これらから、IFN γ の幹細胞活性喪失効果には元来より STAT1 が必須であることが知られているが、IFN γ の STAT1 非依存的な影響 (オートファジー不全による細胞ストレスの蓄積) も造血幹細胞抑制効果に寄与する可能性が新たに考えられた。また、IFN γ の STAT1 非依存的な効果として、申請者は IFN γ が STAT1 欠損造血幹細胞においては幹細胞活性への影響を伴わないで細胞増殖を亢進することも見出している。しかしながら、この幹細胞に肯定的な STAT1 非依存的な増殖亢進効果は、通常の IFN γ 影響下では STAT1 を介した幹細胞活性減衰を伴う細胞増殖抑制効果によって、覆い隠されている。そこで、申請者は IFN γ 影響下では、STAT1 欠損造血幹細胞は STAT1 非依存的な効果で適度に細胞分裂を促されることによって、オートファジー不全で誘導される細胞内不要物 (ストレス源) を複数の細胞に分散させ、一つの細胞に過剰に蓄積されることを防ぎ、幹細胞性を保護しているという可能性を考え、IFN γ は「STAT1 非依存的経路で誘導される mTOR 活性化/オートファジー不全/細胞ストレス」と「STAT1 を介した強制的な細胞増殖抑制」を同時に誘導することで、細胞ストレスの蓄積が助長させ、造血幹細胞活性の喪失に至らせるという作業仮説に至った。

2. 研究の目的

本研究では「IFN γ が STAT1 非依存的に mTOR 活性化/オートファジー不全/細胞ストレスを誘導するか」、「IFN γ 刺激時の STAT1 を介した細胞増殖抑制が、STAT1 非依存的に誘導されるストレス源の蓄積を助長するのか」を明らかにする。そして、これらの STAT1 非依存的影響と STAT1 依存的影響の併合が造血幹細胞においてストレス応答の破綻・幹細胞活性の喪失を誘導するのかを明らかにし、IFN γ による造血幹細胞活性抑制機構の真髄に迫る。

3. 研究の方法

IFN γ の造血幹細胞活性減衰効果における「STAT1 非依存的な増殖誘導の影響」と「STAT1 を介した細胞増殖抑制」の寄与を、以下に項目に着目し、フローサイトメーター、移植実験等を用いて検討する。

5-FU 投与による造血幹細胞自己複製分裂誘導時と分化分裂誘導時における細胞動態を比較し、分裂誘導が幹細胞に与える影響を解析する。

IFN γ の幹細胞活性減衰効果に STAT1 非依存的に誘導される mTOR 活性化/オートファ

ジー不全/細胞ストレスが必要であることを明らかにする。

IFN γ 影響下では、STAT1 によって誘導される“細胞増殖抑制”が STAT1 非依存的に誘導される細胞ストレスの蓄積の亢進、及び幹細胞活性減衰効果に必要であることを明らかにする。

4. 研究成果

IFN 刺激によって、造血幹細胞のミトコンドリア膜電位や活性酸素がやや上昇することは確認されたが、5-FU 投与後に観察される増殖(自己複製)期造血幹細胞よりは、いずれも著しく低かった。さらに、IFN 刺激によって、mTOR シグナル関連の遺伝子群の上昇、及び、小胞体ストレス関連遺伝子群の発現上昇を誘導していることも見出しているものの、これらの傾向も 5-FU 投与後に観察される増殖期造血幹細胞よりは小さかった。一方で、5-FU 投与後に観察される増殖(自己複製)期造血幹細胞では IFN 関連遺伝子の発現が低下していることを見出した。これらの結果は STAT1 に依存する経路が幹細胞性の維持に負に働いていると推測されると同時に、単純な mTOR シグナル関連の遺伝子群や小胞体ストレス関連遺伝子群の発現上昇のみでは、幹細胞性に負に影響を及ぼさないと考えられた。

一般的に、造血幹細胞は幹細胞性を維持するために分裂を抑制していると考えられているが、IFN による幹細胞の分裂抑制は幹細胞性維持に対して負に影響する。実際、STAT1 の活性化は STAT3 や STAT5 のリン酸化を著しく阻害することを見出している。おそらく、この作用が幹細胞の分裂抑制に大きく寄与していると考えられる。同様に、低サイトカイン濃度で造血幹細胞を培養したときには、高サイトカイン濃度で培養したときと比較して幹細胞の分裂は著しく抑えられるが、幹細胞性維持には殆ど影響しなかった。これらの結果は、単純に分裂を抑制するだけでは幹細胞性に影響をおよぼさないことを示唆している。

一方で、造血幹細胞の分裂誘導時に、カルシウムブロッカー処理によって分裂速度が著しく遅延すること(図 1A)、アデノシン A2 受容体を介したシグナル誘導においても同様な効果が観察されること(図 1B)、いずれの処理によって誘導される造血幹細胞の slow cell division は、通常の分裂誘導時により、分裂後の幹細胞性の維持に寄与していることを見出した(図 1)。さらに、興味深いことに、カルシウムブロッカー存在下で造血幹細胞を試験管内で分裂させたとき、分裂後は幹細胞の機能・幹細胞用の遺伝子発現パターンを維持していたが、カルシウムブロッカー非存在下での分裂は幹細胞の機能を維持することが出来なかった(図 2)。重要なことに、カルシウムブロッカー処理やアデノシン A2 受容体アゴニストは、細胞内へのカルシウム流入を抑制することによりエネルギー代謝を抑制していた(図 3)。このようにエネルギー代謝の抑制を伴う細胞分裂を抑制は幹細胞性維持に寄与することを意味している。さらに、興味深いことに、カルシウムブロッカー存在下での IFN 処理時が、カルシウムブロッカー非存在下での処理と比較して、造血幹細胞の分裂速度に大きな影響を与えることなく、幹細胞表現型を喪失させる効果が著しく上昇していた。事実、IFN 刺激はミトコンドリア膜電位の上昇を誘導し

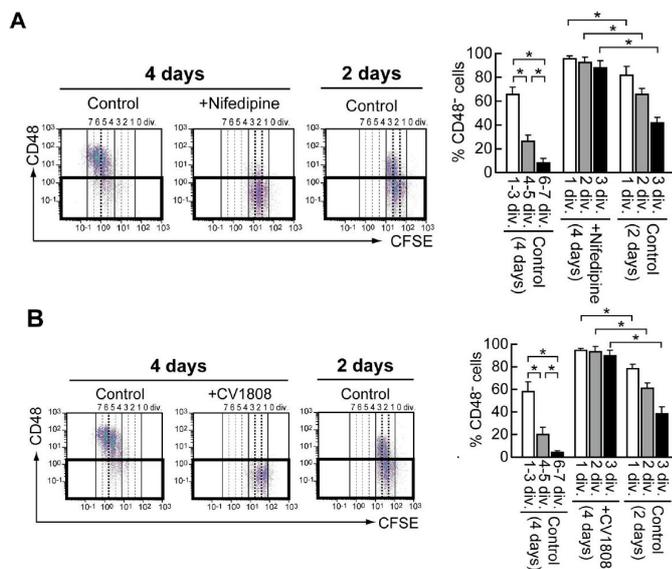


図 1. 細胞分裂速度と幹細胞性の維持

CFSE 色素で造血幹細胞を染色した後、カルシウムブロッカー-Nifedipine (A)、又はアデノシン A2 受容体アゴニスト (B) 存在下で培養し、分化マーカーである CD48 の発現を検討した。

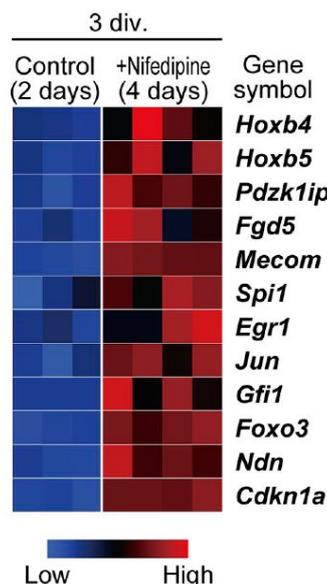


図 2. 分裂後の造血幹細胞の遺伝子発現

造血幹細胞をカルシウムブロッカー-Nifedipine 存在下又は非存在下で 3 回分裂させ、その後の造血幹細胞関連遺伝子群の発現を検討した。

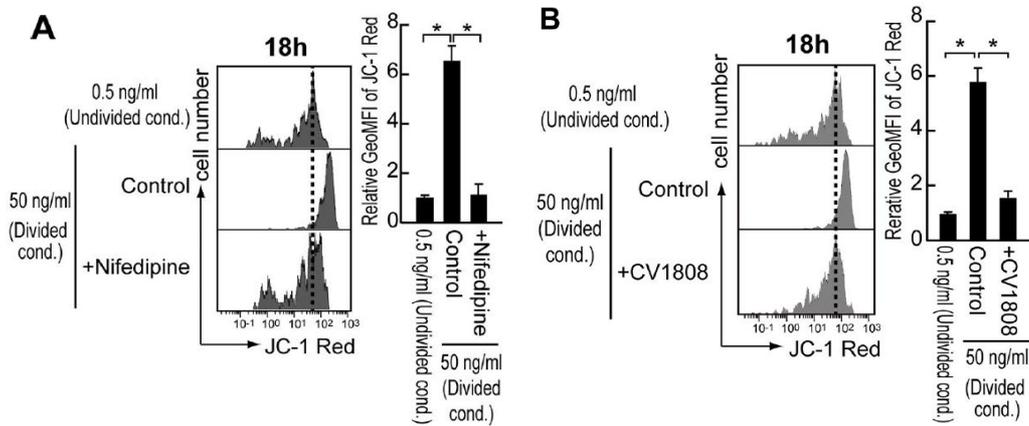


図 3. カルシウム流入阻害によるエネルギー代謝抑制

カルシウムブロッカー-Nifedipine (A)、又はアデノシン A₂ 受容体アゴニスト (B) 処理後、JC-1 染色によって、造血幹細胞のミトコンドリア膜電位を測定した。

ていることから、エネルギー代謝を活性化させていることが推測される。従って、IFN は分裂抑制作用を示すものの、幹細胞維持に対して負に働く原因としては、エネルギー代謝の活性に起因するものと考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Nakamura-Ishizu, A., Matsumura, T., Stumpf, P. S., Umemoto, T., Takizawa, H., Takihara, Y., O'Neil, A., Majeed, A. Q. B. B. A., MacArthur, B. D., and Suda, T. (2018) Thrombopoietin Metabolically Primes Hematopoietic Stem Cells to Megakaryocyte-Lineage Differentiation. *Cell Reports* **25**, 1772-1785.e1776
2. Umemoto, T., Hashimoto, M., Matsumura, T., Nakamura-Ishizu, A., and Suda, T. (2018) Ca(2+)-mitochondria axis drives cell division in hematopoietic stem cells. *J Exp Med*
3. Ito, N., Katoh, K., Kushige, H., Saito, Y., Umemoto, T., Matsuzaki, Y., Kiyonari, H., Kobayashi, D., Soga, M., Era, T., Araki, N., Furuta, Y., Suda, T., Kida, Y., and Ohta, K. (2018) Ribosome Incorporation into Somatic Cells Promotes Lineage Transdifferentiation towards Multipotency. *Sci Rep* **8**, 1634
4. Baba, M., Endoh, M., Ma, W., Toyama, H., Hirayama, A., Nishikawa, K., Takubo, K., Hano, H., Hasumi, H., Umemoto, T., Hashimoto, M., Irie, N., Esumi, C., Kataoka, M., Nakagata, N., Soga, T., Yao, M., Kamba, T., Minami, T., Ishii, M., and Suda, T. (2018) Folliculin Regulates Osteoclastogenesis Through Metabolic Regulation. *J Bone Miner Res*
5. Umemoto, T., Matsuzaki, Y., Shiratsuchi, Y., Hashimoto, M., Yoshimoto, T., Nakamura-Ishizu, A., Petrich, B., Yamato, M., and Suda, T. (2017) Integrin alphavbeta3 enhances the suppressive effect of interferon-gamma on hematopoietic stem cells. *EMBO J* **36**, 2390-2403

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Umemoto T, Hashimoto M, Suda T, Mitochondriametabolism regulates the activation of hematopoietic stem cells. 46th ISEH (August 2017)
2. 梅本 晃正、橋本倫拓、須田年生、Ca²⁺-mitochondria pathway による造血幹細胞の分裂制

御、日本分子生物学会（2018）

3. (口頭) 梅本 晃正、橋本倫拓、須田年生、細胞内カルシウム-ミトコンドリア制御を介した造血幹細胞の分裂制御、日本血液学会（2018）
4. Terumasa Umemoto, Michihiro Hashimoto, Toshio Suda., Ca²⁺-Mitochondrial axis drives cell division in hematopoietic stem cells. 幹細胞シンポジウム（2018）
5. 梅本 晃正、橋本倫拓、須田年生、ミトコンドリア代謝変化による造血幹細胞の活性化制御機構、日本分子生物学会（2017）
6. 梅本 晃正、橋本倫拓、須田年生、ミトコンドリア代謝変化による造血幹細胞の活性化制御機構、日本血液学会（2017）
7. Terumasa Umemoto, Yu Matuszaki, Michihiro Hashimoto, Toshio Suda., Mitochondria metabolism regulates the activation of hematopoietic stem cells. 幹細胞シンポジウム（2017）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。