

令和 元 年 6 月 1 0 日現在

機関番号： 1 7 4 0 1

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2017 ~ 2018

課題番号： 1 7 K 1 6 1 9 1

研究課題名 (和文) オートファジー欠損による造血幹細胞機能不全の機構解明

研究課題名 (英文) the mechanisms of HSC dysfunction by autophagy deficiency

研究代表者

橋本 倫拓 (Hashimoto, Michihiro)

熊本大学・国際先端医学研究機構・客員助教

研究者番号： 2 0 7 7 2 4 1 1

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) : オートファジー欠損で造血幹細胞が機能不全に陥ることはすでに報告されているがその機構は不明なままであった。本研究ではマウスにおいてオートファジー関連遺伝子 (Atg7) を発生期から欠損させ、週齢を変え造血幹細胞において解析を行ったところ、幼児期ではAtg7KOの影響がなく、4週齢8週齢と成長とともに造血幹細胞の枯渇が起こることを明らかにした。また、欠損の影響のない幼児期の骨髓細胞を野生型の細胞と共に競合的移植を行うと8週齢の骨髓細胞ではHSCの枯渇が見られるが幼児期の骨髓細胞ではHSCsの枯渇が現れない。つまり、Atg7KOでは骨髓環境を変化させHSCsの枯渇を誘導していることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臍帯血由来の造血幹細胞は回収できる数は少ないが造血幹細胞としての質、機能は成人から回収したものに比べ良い状態を示す。しかし、成人患者への移植には多数の造血幹細胞が必要であり臍帯血からの造血幹細胞では不十分である。しかし、幼児期造血幹細胞の性質を解明することで成人造血幹細胞の機能を幼児期型に近づけることができれば、質の良い造血幹細胞を患者に提供することが可能となる。本研究で明らかにしたオートファジーは幼児期造血幹細胞維持には関連しないと言った知見は今後のex vivoでの幼児期造血幹細胞増殖、成人造血幹細胞を幼児期様造血幹細胞に近づけ移植する方法の開発に貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要 (英文) : Several studies have shown that cell fate of HSCs is dependent on mitochondrial quality and function, which might be controlled by autophagy process. In this study, we clarified how deficiency of autophagy-related gene 7 (Atg7) induce hematopoietic failure. At first, we analyzed mitochondria status (membrane potential= $\Delta\Psi_m$, mitochondrial ROS production) in Atg7KO mice HSCs in each age. We found that $\Delta\Psi_m$ and ROS production is no difference between neonatal stage but it will show difference from 4-weeks old mice. Actually, quiescent HSCs are seen after 4-weeks old in WT, while Atg7KO HSCs fail to enter quiescence. Furthermore, total bone marrow cell number and frequency of HSCs significantly decreased in Atg7KO mice with growing. Finally, we performed neonatal BMCs competitive transplantation assay, and found no defective reconstitution of Atg7KO BMCs. Here we concluded that autophagy process is involved in the maintaining quiescence in adult HSCs but not in neonatal HSCs.

研究分野： 血液内科学

キーワード： 造血幹細胞 オートファジー ミトコンドリア

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は、すべての血液細胞の源となる細胞であり、自己複製能・多分化能を特徴とする幹細胞である。造血幹細胞は通常静止期に止まり分裂回数を抑制することで、一生に渡り造血を支持しているが、失血・感染などで赤血球、免疫細胞を増加させなければならない時には分裂期に入り、自己複製分裂、分化分裂を経ることで血液細胞の産生を担っている。造血幹細胞の静止期から分裂期または分裂期から静止期への移行がどのような分子機構で制御されるのか様々報告されているが未だに解明されていない。一方でミトコンドリアは、細胞のエネルギー産生を担う細胞小器官であるが、近年ミトコンドリアの機能と造血幹細胞の機能がよくリンクしていることが報告されてきている。さらに、オートファジーは障害のあるミトコンドリアの処理を行うなど細胞のホメオスタシスを維持していく上で重要な機構であるが、近年オートファジーがミトコンドリアの機能、品質を維持し造血幹細胞の長期的な維持に寄与していることが示唆される報告もなされている。

一方で幼児期の造血幹細胞は細胞分裂が亢進している。通常造血幹細胞は細胞分裂の回数を経ることで幹細胞性が失われ分化分裂を起こし、造血幹細胞の数が減少、クローン数の減少などが起こる。しかし、胎生期から幼児期にかけての増殖期にある造血幹細胞の幹細胞維持機構はいまだに明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、発生時期によりオートファジーの機能・造血幹細胞維持への関与が異なるのか、また、オートファジー関連遺伝子（Atg 7）欠損による造血障害の機構解明を目指し研究を行った。

3. 研究の方法

オートファジー関連遺伝子欠損マウス（Atg7^{flox/flox}, Vav-cre）を用意、幼児期（p5）、4週齢、8週齢とそれぞれのマウスから骨髓細胞を回収後ミトコンドリアの膜電位、ミトコンドリア内の活性酸素（ROS）産生能、細胞分裂の解析、造血幹細胞の割合の計算、骨髓細胞数の計算などの解析。幼児期から回収した骨髓細胞を野生型（Ly5.1）の骨髓細胞と共にレシピエントに移植しその後のキメリズムの解析を行った。また、Atg 7 KO 末梢血の成分分析、骨髓細胞内での赤血球分化解析。また、野生型マウスにおいて PHZ 投与による人為的に貧血を誘導したのちに細胞分裂の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 幼児期造血幹細胞はオートファジー非依存的に造血を行う。

造血幹細胞の機能、質はミトコンドリアの機能、質とよく相関していることから、我々の研究室では造血幹細胞のミトコンドリア機能、代謝に焦点を当て研究を行っている。本研究では、オートファジー関連遺伝子欠損マウス（Atg7^{flox/flox}, Vav-cre）において発生、成長の時期により造血幹細胞へのオートファジー欠損の影響が異なるのか解析を行った。ミトコンドリア膜電位においては、幼児期（p5）では野生型（wt）と Atg 7 KO の間で差が見られない。しかし、4週齢、8週齢と週齢を経るとともに wt ではミトコンドリア膜電位が抑制されるが、Atg 7 KO では幼児期の高いミトコンドリア膜電位を保ったままであった（図 1-a）。また、ミトコンドリア内活性酸素の産生ではミトコンドリア膜電位と同様に幼児期では wt、Atg 7 KO の間で差が見られないが、Atg 7 KO では4週、8週と週齢を経る内にミトコンドリア内の活性酸素の産生量が増大した（図 1-b）。また、骨髓内の総細胞数、造血幹細胞の割合を解析したところ、ミトコンドリア膜電位、ミトコンドリア内の活性酸素量と同様に幼児期では wt と同等の骨髓細胞数、造血幹細胞の枯渇はみられないが週齢を追うごとに骨髓細胞、造血幹細胞の減少がみられるようになった（図 1-c）。つまり、幼児期の分裂期にある造血幹細胞はオートファジー非依存的に造血を行っていることを明らかとした。

また、一方で細胞分裂速度、細胞周期の解析を行ったところ幼児期では wt、Atg 7 KO の間ではこれまでの解析と同様に差が

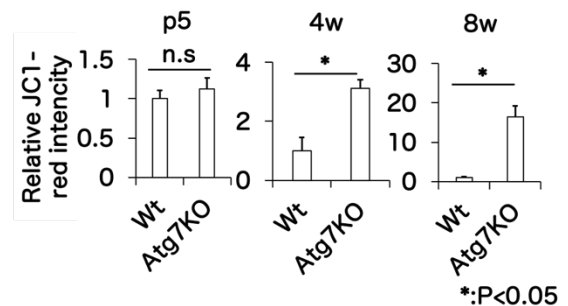


図1-a Atg7KOマウスはミトコンドリア膜電位が抑制されない

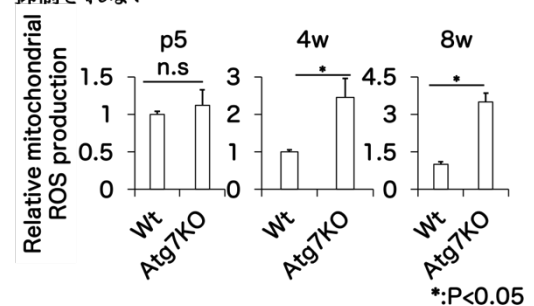


図1-b Atg7KO-HSCはミトコンドリア内活性酸素産生が増大する。

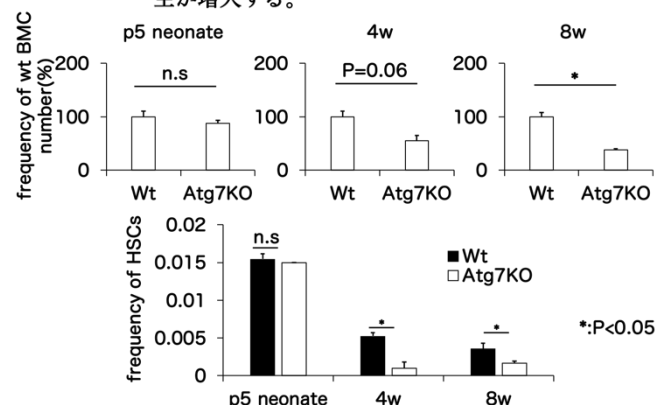


図1-c Atg7KOマウスではHSCの割合、骨髓細胞が減少する

見られないが、静止期造血幹細胞が出現すると言われる4週齢では wt は静止期造血幹細胞が出現するものの、Atg 7 KO では多数の細胞が細胞分裂を行っていた。つまりオートファジーが造血幹細胞の静止期への移行に寄与している可能性がある (図 1-d)。

(2)オートファジー欠損による造血幹細胞枯渇の機構解明。

前項で幼児期造血幹細胞がオートファジー非依存的に造血を行なっていることを示唆する結果を示したが、4週齢以降の Atg 7 KO による造血不全の機構は不明なままである。他のグループからの報告では Atg 7 KO マウス骨髓細胞を8週齢で移植し、その後の末梢血内でのキメリズムを追うことで8週齢での Atg 7 KO 一造血幹細胞が骨髓再構築能を示さないなどすでに示されている。我々はオートファジーに非依存的に造血を行なっている幼児期造血幹細胞を wt の細胞と競合的移植しその後の骨髓再構築の解析を行ったところ、Atg 7 KO の骨髓細胞でも骨髓再構築能を示した (図 2-a)。さらに、移植後の末梢血中の分化傾向を解析した。通常 Atg 7 KO ではミエロイド系細胞が増加するが wt との競合的移植を行なったマウス末梢血中ではミエロイド系細胞への分化がキャンセルされ、競合的移植により Atg 7 KO の表現型もキャンセルされることが明らかとなった (図 2-b)。つまり、オートファジーが欠損することで造血幹細胞が静止期に移行できない環境になり造血幹細胞の枯渇が誘導されることを明らかにした。

(3)オートファジー欠損による血球減少により造血幹細胞は枯渇する。

Atg 7 KO一造血幹細胞は、静止期に移行できないために造血幹細胞の枯渇が誘導されていると示唆される。Atg 7 KO マウス末梢血では、厳しい貧血、血球減少を伴う。さらに、骨髓内で赤血球分化 (CD 71、TER 119 による染色) の解析を行ったところ、Atg 7 KO では、赤血球の分化が CD 71 単陽性の段階で停止していることが明らかとなった (図 3-a)。また一方で免疫染色により骨髓を TER 119、DAPI により染色した結果、Atg 7 KO の骨髓では脱核前の TER 119 陽性細胞が見られた。つまり、Atg 7 欠損により赤血球分裂が障害されていることが重ねて証明された。さらに、貧血により造血幹細胞の分裂が開始されるのか人為的に赤血球を溶血させ貧血を誘導できる薬剤フェニルヒドラジン (PHZ) を野生型マウスに投与し造血幹細胞の分裂が誘導されるのか解析したところ、PHZ 投与群では顕著に造血幹細胞の細胞分裂が誘導されることを明らかとした。つまり、Atg 7 KO は厳しい貧血を含む血球減少を誘導することで HSC が静止期に移行することを阻害し、持続的に造血幹細胞の細胞分裂を誘導することで造血幹細胞の枯渇を誘導していることが示唆された。

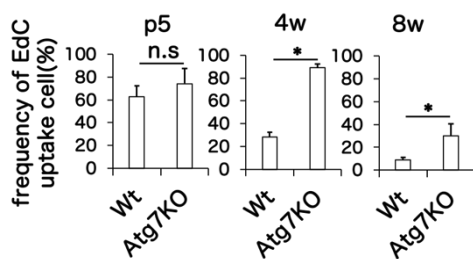


図1-d Atg7KO-HSCは連続的に細胞分裂する

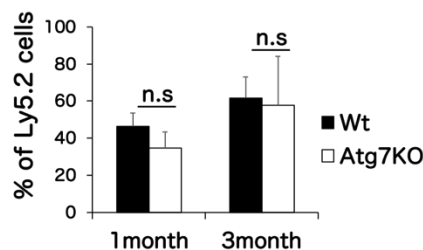


図2-a Atg7KOマウス骨髓再構築能

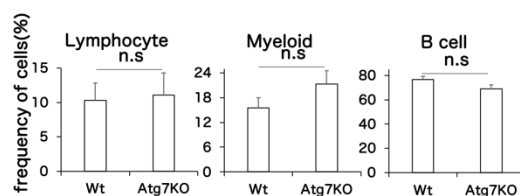


図2-b Atg7KOBM移植後の末梢血細胞分化割合

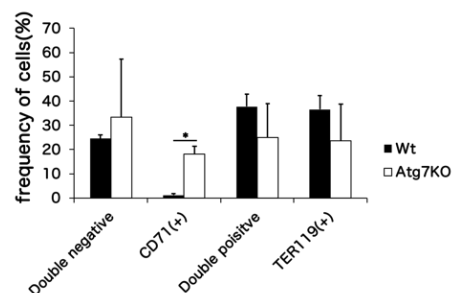


図3-a Atg7KO-赤血球分化への影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

1. Terumasa Umemoto, Yu Matsuzaki, Yoshiko Shiratsuchi, Michihiro Hashimoto, Takayuki Yoshimoto, Ayako Nakamura-Ishizu, Brian Petrich, Masayuki Yamato and Toshio Suda Integrin $\alpha v \beta 3$ enhances the suppressive effect of interferon- γ on hematopoietic stem cells. *EMBO J.* 2017 Aug 15;36(16):2390-2403. doi: 10.15252/emboj.201796771. Epub 2017 Jul 3. 査読有り
2. Masaya Baba, Mitsuhiro Endoh, Wenjuan Ma, Hirofumi Toyama, Akiyoshi Hirayama, Keizo Nishikawa, Keiyo Takubo, Hiroyuki Hano, Hisashi Hasumi, Terumasa Umemoto, Michihiro Hashimoto, Nobuko Irie, Chiharu Esumi, Miho Kataoka, Naomi Nakagata, Tomoyoshi Soga, Masahiro Yao, Tomomi Kamba, Takashi Minami, Masaru Ishii and Toshio Suda. Folliculin Regulates Osteoclastogenesis Through Metabolic

Regulation. J Bone Miner Res. 2018 Oct;33(10):1785-1798. doi: 10.1002/jbmr.3477.
Epub 2018 Jun 26. 査読有り

3. Terumasa Umemoto, Michihiro Hashimoto, Takayoshi Matsumura, Ayako Nakamura-Ishizu and Toshio Suda. Ca^{2+} -mitochondria axis drives cell division in hematopoietic stem cells. DOI: 10.1084/jem.20180421 | Published June 26, 2018 査読有り

〔学会発表〕（計 1 件）

橋本倫拓、梅本晃正、横溝智雅、須田年生 Autophagy 欠損による造血幹細胞機能不全の機構
解明、第 79 回日本血液学会学術総会、2017 年、東京

〔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

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。