

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2006～2008

課題番号：18689024

研究課題名 (和文) 造血幹細胞-骨芽細胞ニッチ相互作用の成立・維持の分子機構

研究課題名 (英文) Molecular mechanism of the establishment and maintenance of the interaction between hematopoietic stem cells and osteoblastic niche.

研究代表者

新井 文用 (ARAI FUMIO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：90365403

研究成果の概要：

造血幹細胞の未分化性維持には骨芽細胞性ニッチとの相互作用が重要であり、その制御に Mpl/Thrombopoietin、N-cadherin が重要な機能を果たしていることを同定した。また、骨芽細胞性ニッチは分化段階の異なる複数の細胞により構成されることを見いだした。さらに、ニッチ分子の機能阻害により、幹細胞がニッチから離れ、活性化されることがわかった。これは、ニッチ分子の機能修飾により、造血幹細胞の動態を制御できることを示しており、今後、低侵襲条件での幹細胞移植をはじめとした再生医療に応用できると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
2007 年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2008 年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
年度			
年度			
総計	21,700,000	6,510,000	28,210,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：造血幹細胞、幹細胞ニッチ、骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々は、成体骨髄において side-population (SP) 細胞が細胞周期を静止させた造血幹細胞 (静止期造血幹細胞) であり、この細胞が骨表面の骨芽細胞と接着していることを明らかにしており、このことから、骨芽細胞性ニッチと相互作用することにより、造血幹細胞は細胞周期を静止させ、未分

化性を維持していると考えられた。

(2) 造血幹細胞は骨髄造血の成熟に伴い、細胞周期が回転する状態から静止期に移行することを見出した。このことから、幹細胞のニッチ制御機構が骨髄造血の成熟に伴い変化していると考えられた。

(3) 造血系細胞の中で幹細胞が特に活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) による酸化ストレスに対して脆弱であり、造血幹細胞の自己複製能および静止状態の維持に酸化ストレスの抑制が重要であることを見出した。

2. 研究の目的

(1) 静止期造血幹細胞特異的分子を同定し、細胞周期の静止期維持、細胞接着における機能を明らかにする。

(2) 造血幹細胞と骨芽細胞性ニッチの相互作用がいかんして成立し、維持されるのかを明らかにする。

(3) いかなるメカニズムにより造血幹細胞がニッチから離脱し、活性化されるのかを明らかにする。特に、幹細胞とニッチの相互作用を制御する上で、ROSの制御が細胞周期制御のみならず、細胞接着分子の制御に関わる可能性が考えられることから、ROSによる細胞接着分子の抑制と幹細胞の細胞周期制御の関連性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 静止期造血幹細胞で特異的に発現する分子の同定と機能解析

静止期造血幹細胞 (SP⁺造血幹細胞) と細胞周期の回転する活性化造血幹細胞 (SP^{neg}造血幹細胞) を比較することにより、静止期造血幹細胞に特異的に発現する分子を検討した。さらに、そのシグナルを増強・抑制した際の造血幹細胞の細胞周期、ニッチに対する接着について検討した。

(2) 幹細胞-ニッチ相互作用の成立機構の解析

幼若骨髄 (2 週齢) と成体骨髄 (8 週齢) の造血幹細胞について、サイトカイン受容体、接着分子の発現を比較し、成体骨髄造血幹細胞で発現する分子を明らかにする。

また、骨組織から骨芽細胞系細胞を分離し、造血支持能および遺伝子発現を検討した。

(3) 活性酸素による造血幹細胞 - ニッチ相互作用制御機構

5-フルオロウラシル (5-FU) による骨髄抑制刺激を加え、造血幹細胞の末梢への動員を誘導した際の造血幹細胞における ROS の産生と N-cadherin の発現、さらに細胞周期の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 静止期造血幹細胞で特異的分子の同定とその機能解析

静止期幹細胞 (SP⁺造血幹細胞) と活性化

造血幹細胞 (SP^{neg}造血幹細胞) を用いたマイクロアレイ解析により、静止期造血幹細胞幹細胞に Mpl 受容体、N-cadherin が高発現していることを見いだした。

(2) Mpl/THPO シグナルの静止期造血幹細胞維持における機能

静止期幹細胞に Mpl 受容体が高発現しており、さらに、長期骨髄再構築能を持つ造血幹細胞が、Mpl 陽性分画に特異的に存在することを明らかにした。また、Mpl 結合因子 Thrombopoietin (THPO) が骨芽細胞から産生されることを見いだした。

Mpl/THPO シグナルは造血幹細胞での c-Myc や cyclin dependent kinase inhibitor の 1 つである p57^{Kip2} の発現を制御し、定常状態での造血幹細胞の静止期維持重要な働きをしていることがわかった。

次に、Mpl/THPO シグナルの抑制により、放射線の非照射条件下での造血幹細胞移植が成立するかを検討した。レシピエントマウスに移植 6 日前に Mpl 中和抗体 (AMM2) あるいは PBS を投与し、さらに 2 日前に 5-FU を投与し、LSK 細胞 1x10⁴ 個の移植をおこなった。その結果、AMM2 と 5-FU を併用した群で造血幹細胞の長期骨髄再構築がみられた (図 1)。これは、造血幹細胞の静止状態が一過性に抑制され、放射線照射を用いない条件下での骨髄移植が成立したものと考えられ、Mpl/THPO のシグナルの抑制により幹細胞と骨芽細胞ニッチの相互作用が阻害され、静止期造血幹細胞が減少し、「空きニッチ」が形成されたことを示すものであると考えられた。この研究成果は、ニッチ分子の機能を操作 (増強・阻害) することで、造血幹細胞の動態を制御できることを示唆するものであり、今後、放射線照射や抗がん剤投与によらない幹細胞移植の確立に応用でき、自己免疫疾患や代謝疾患の骨髄移植においても極めて有用な治療法になると考えられた。

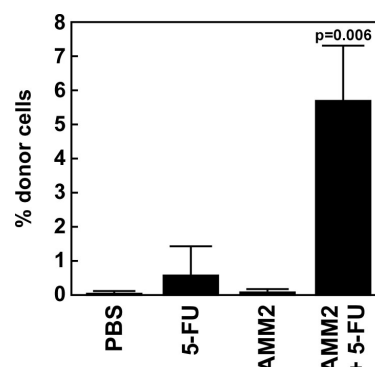


図 1. THPO/Mpl シグナルの抑制による、放射線非照射条件下での骨髄移植

レシピエントマウスに骨髄移植 6 日前に Mpl 中和抗体 (AMM2) を投与し、さらに 2 日前に 5-FU を投与することにより、放射線照射

を用いることなく、造血幹細胞の長期骨髄再構築が成立した。

(3) N-cadherin の造血幹細胞の維持における機能解析

長期骨髄再構築能を持つ造血幹細胞分画と骨芽細胞性ニッチ細胞に N-cadherin が発現しており、N-cadherin を介した細胞接着が、 β -catenin の核内移行を調節することで、 β -catenin シグナルの活性化を制御する、細胞周期抑制因子の発現を増強させる、といったメカニズムにより、造血幹細胞の細胞周期の静止に働くことがわかった。さらに、N-cadherin を介した接着を増強することにより、造血幹細胞が連続骨髄移植のストレスや酸化ストレスに対し抵抗性を示すことを見いだした。これらの結果は、幹細胞とニッチの接着を増強することによって造血幹細胞をストレスから保護できることを示唆するものと考えられた。

(4) ニッチ複合体の同定と週齢変化

マウス骨組織から血液細胞と血管内皮細胞を含まない、CD45-CD31-Ter119-細胞を分離し、間葉系幹細胞・骨芽細胞のマーカーとして Sca-1、ALCAM の発現を解析したところ、Sca-1⁺ALCAM⁻、Sca-1⁺ALCAM⁺、Sca-1⁻ALCAM⁻の 3 つの細胞集団が得られ、それぞれ、間葉系前駆細胞、骨芽細胞前駆細胞、成熟骨芽細胞であることがわかった。そこで、これらの細胞集団について、マイクロアレイ解析により遺伝子発現を検討した (図 2)。

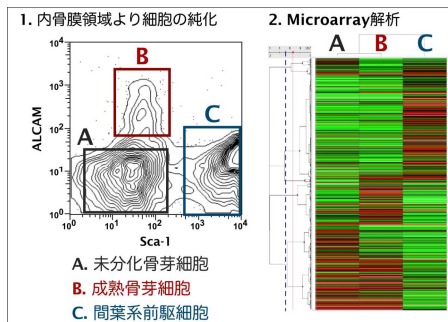


図 2. 骨芽細胞性ニッチからの間葉系前駆細胞、骨芽細胞前駆細胞、成熟骨芽細胞の分離と、マイクロアレイ解析。

その結果、間葉系前駆細胞分画は静止期誘導因子 (Ang-1, Thpo など) と増殖因子 (SCF など) を産生し、成熟骨芽細胞は N-cadherin などの接着分子を発現して幹細胞との接着に関わることで、幹細胞の機能を調節していると考えられ、骨芽細胞性ニッチでは、特定のニッチ細胞が機能するのではなく、複数の細胞がニッチ複合体を構成し、機能分担・相互作用することで、造血幹細胞の

静止状態の維持および自己複製能の制御を担っていると考えられた (図 3)。

さらに、造血幹細胞と Sca-1-ALCAM⁺細胞における N-cadherin の発現が週齢に伴い増加することがわかった。これらの結果から、N-cadherin を介した細胞接着の増加が、成体骨髄における幹細胞-ニッチ相互作用の構築に関わっていると考えられた。

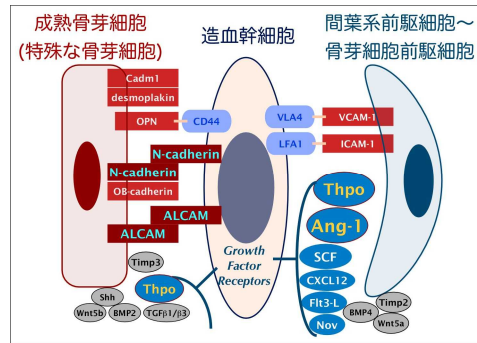


図 3. 造血ニッチ複合体のモデル

(5) 造血幹細胞-ニッチ相互作用の維持における ROS の機能解析

マウスに 5-FU 等の抗がん剤を投与すると、まず、造血幹細胞のなかでも分裂している幹細胞 (non-SP) が消失し、引き続いて、ニッチで保持されていた静止期造血幹細胞の細胞周期が活性化され、増殖が起こった。このとき、造血幹細胞内の ROS 濃度が 5-FU 投与後、一過性に増加し、さらに p38MAPK の活性化を介して N-cadherin の発現が抑制され、幹細胞がニッチから離脱することで造血幹細胞の細胞周期が回転することが明らかとなった。また、5-FU による骨髄抑制刺激時に抗酸化剤 N-acetyl-cysteine (NAC) を投与すると、N-cadherin の発現低下が抑制され、幹細胞の細胞周期の活性化がコントロールと比較して遅れることを明らかにした。これらの結果から、定常状態では造血幹細胞は ROS の産生を抑え、造血幹細胞-ニッチ相互作用を維持し、静止状態を保っていると考えられた。また、骨芽細胞性ニッチは低酸素環境にあることが考えられた。

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 16 件)

- Hosokawa K, Arai F, Yoshihara H, Iwasaki H, Hembree M, Yin T, Nakamura N, Gomei Y, Takubo K, Shiama H, Matsuoka S, Li L, Suda T. Cadherin-based adhesion is a potential target for niche manipulation to protect hematopoietic stem cells in adult bone

- marrow. *Cell Stem Cell*, in press. 査読有
- Sato T, Onai N, Yoshihara H, Arai F, Suda T, Ohteki T. IRF-2 protects quiescent HSCs from type-I interferon-dependent exhaustion. *Nat Med*, in press. 査読有
- Shima H, Takubo K, Iwasaki H, Yoshihara H, Gomei Y, Hosokawa K, Arai F, Takahashi T, Suda T. Reconstitution activity of hypoxic cultured human cord blood CD34-positive cells in NOG mice. *Biochem Biophys Res Commun* 378, 467-472, 2009. 査読有
- Hato T, Kimura Y, Morisada T, Koh GY, Miyata K, Tabata M, Kadomatsu T, Endo M, Urano T, Arai F, et al. Angiopoietins contribute to lung development by regulating pulmonary vascular network formation. *Biochem Biophys Res Commun* 381: 218-223, 2009. 査読有
- Suda T, Arai F. Wnt signaling in the niche. *Cell* 132: 729-730, 2008. 査読無
- Ohmura M, Naka K, Hoshii T, Muraguchi T, Shugo H, Tamase A, Uema N, Ooshio T, Arai F, Takubo K, Nagamatsu G, Hamaguchi I, Takagi M, Ishihara M, Sakurada K, Miyaji H, Suda T, Hirao A. Identification of stem cells during prepubertal spermatogenesis via monitoring of nucleostemin promoter activity. *Stem Cells*. 26: 3237-3246, 2008. 査読有
- Matsuoka S, Oike Y, Onoyama I, Iwama A, Arai F, Takubo K, Mashimo Y, Oguro H, Nitta E, Ito K, Miyamoto K, Yoshiwara H, Hosokawa K, Nagamatsu G, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, Shima H, Hayashi Y, Matsuzaki Y, Nakayama K, Ikeda Y, Hata A, Chiba S, Nakayama KI, Suda T. Fbxw7 acts as a critical failsafe against premature loss of hematopoietic stem cells and development of T-ALL. *Genes Dev*. 22: 986-991, 2008. 査読有
- Takubo K, Ohmura M, Azuma M, Nagamatsu G, Yamada W, Arai F, Hirao A, Suda T. Stem Cell defects in ATM-deficient undifferentiated spermatogonia through DNA damage-induced cell cycle arrest. *Cell Stem Cell*. 2: 170-182, 2008. 査読有
- Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, Hagiwara T, Takubo K, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, Matsuoka S, Miyazaki H, Takahashi T, Suda T. Thrombopoietin/Mpl signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell*. 1: 685-697, 2007. 査読有
- Hosokawa K, Arai F, Yoshihara H, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, Miyamoto K, Shima H, Ito K, Suda T. Function of oxidative stress in the regulation of hematopoietic stem cell-niche interaction. *Biochem Biophys Res Commun*. 363: 578-583, 2007. 査読有
- Miyamoto K, Araki K, Naka K, Arai F, Takubo K, Yamazaki S, Matsuoka S, Miyamoto T, Ito K, Ohmura M, Chen C, Hosokawa K, Nakauchi H, Nakayama K, Nakayama K-I, Harada M, Motoyama N, Suda T, Hirao A. Foxo3a is essential for maintenance of hematopoietic stem cell pool. *Cell Stem Cell*. 1: 101-112, 2007. 査読有
- Ito K, Takubo K, Arai F, Satoh H, Matsuoka S, Ohmura M, Naka K, Azuma M, Miyamoto K, Hosokawa K, Ikeda Y, Mak TW, Suda T, Hirao A. Regulation of reactive oxygen species by Atm is essential for proper response to DNA double strand breaks in lymphocytes. *J. Immunol*. 178: 103-110, 2007. 査読有
- Ninomiya M, Abe A, Katsumi A, Xu J, Ito M, Arai F, Suda T, Ito M, Kiyoi H, Kinoshita T, Naoe T. Homing, proliferation and survival sites of human leukemia cells in vivo in immunodeficient mice. *Leukemia*. 21 (1): 136-142, 2007. 査読有
- Takubo K, Hirao A, Ohmura M, Azuma M, Arai F, Nagamatsu G, Suda T. Premeiotic germ cell defect in seminiferous tubules of Atm-null testis. *Biochem Biophys Res Commun*. 351: 993-998, 2006. 査読有
- Ito K, Hirao A, Arai F, Takubo K, Matsuoka S, Miyamoto K, Ohmura M, Naka K, Hosokawa K, Ikeda Y and Suda T. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med*, 12: 446-451, 2006. 査読有
- Arai F. Regulation of hematopoietic stem cell and its interaction with stem cell niche. *J Oral Biosci*, 48: 22-29, 2006. 査読有

[学会発表](計 8件)

- . Arai F. Hematopoietic stem cell niche. The 5th General Assembly with Asian Symposium-2009. February 13-14, 2009, Kobe, Japan.
- . Arai F. Niche regulation of hematopoietic stem cells in the endosteum. International Conference and Workshop. Hematopoietic Stem Cells VII. September 18th-20th, 2008, Meersburg, Germany.
- . Arai F. Regulation of the hematopoietic stem cell and its interaction with the osteoblastic niche. Gordon Research Conference, Bone & Teeth, July 15th-20th, 2007, University of New England, Biddeford, ME, USA.
- . Arai F., Hosokawa K, Yoshihara H, Takubo K, Matsuoka S, Miyamoto K, Nakamura Y, Gomei Y, Suda T. Interaction of N-cadherin with b-catenin is involved in the maintenance of hematopoietic stem cell quiescence in the osteoblastic niche. 5th International Society for Stem Cell Research Annual Meeting, June 17-20, 2007, Cairns, Australia.
- . Arai F. Maintenance of stem cells in the niche. International Conference and Workshop. Hematopoietic Stem Cells VI. September 14th-16th, 2006, Tübingen, Germany.
- . Arai F. Regulation of hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche. 1st International Conference on Osteoimmunology: Interaction of the Immune and Skeletal Systems. May 28th-June 2nd, 2006, Crete, Greece.
- . Arai F. Regulation of hematopoietic stem cells by the niche. Stem Cell Biology and Regenerative Medicine-from Bench to Bedside. January 14th, 2006, Tokyo, Japan
- . Arai F. Regulation of hematopoietic stem cell and its interaction with stem cell niche .Hiroshima conference on education and science in dentistry, 2006. January 8th-9th, 2006, Hiroshima, Japan

[図書](計 3件)

- . Arai F., Suda T. Regulation of hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche. Osteoimmunology: Interactions of the Immune and

Skeletal System (Choi Y, edited), Adv Exp Med Biol. 602: 61-67, 2007.

- . Arai F., Suda T. Maintenance of quiescent hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche. Hematopoietic Stem Cells VI. Ann N Y Acad Sci, 1106:41-53, 2007.
- . Arai F., Suda T. Endothelial and hematopoietic cells in the intraembryonic compartment. In Hematopoietic Stem Cell Development. (edited by Godin I and Cumano A), Landes Bioscience/Eurekah.com. pp. 92-107, 2006.

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 文用 (ARAI FUMIO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：90365403

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者