

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08364

研究課題名（和文）細胞エネルギー代謝を介する造血幹細胞の巨核球分化機構の解明

研究課題名（英文）Cell metabolism determines the megakaryocyte lineage fate of hematopoietic stem cells

研究代表者

石津 綾子（Nakamura-Ishizu, Ayako）

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：10548548

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：正常な止血プロセスには骨髓造血幹細胞(HSC)より分化する巨核球(Mk)から血小板が適切に生成されることが必要である。当研究は、骨髓ニッチにより産生されるサイトカイン、Thrombopoietin (Thpo)とミトコンドリアによるエネルギー代謝に着目し、ミトコンドリア代謝の制御を介したHSCのMk分化機構を報告した。また、TPO遺伝子欠損マウスの解析をとおし、Thpo遺伝子欠損マウス由来のHSCはミトコンドリア代謝を含めた広範囲の代謝変化によりHSCを維持することを認め、報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髓造血幹細胞の巨核球、血小板系統への分化バイアスマカニズムの詳細はわかっていない。本研究は、サイトカイン、Thrombopoietin(Thpo)によるミトコンドリアによるエネルギー代謝が造血幹細胞の巨核球分化に関与することを明確にした。生体外におけるHSCの増幅、分化は幹細胞を臨床治療に応用する際に重要であり、本研究はその手法の開発、改善のために役立つと思われる。また、造血幹細胞機能不全の起こる様々な血液疾患の病態解明、新規治療開発にも役立つと思われる。

研究成果の概要（英文）：The production of platelets in the bone marrow requires the differentiation of megakaryocytes (Mk) from hematopoietic stem cells (HSCs). This project aimed to delineate how the cytokine Thrombopoietin(Thpo) regulates Mk differentiation potential of HSCs. We identified that Thpo stimulates mitochondria metabolism in HSCs which skewed HSCs towards Mk lineage differentiation. Furthermore, we analyzed Thpo knock out mice and identified that Thpo signaling was required for maintaining HSCs in a quiescent state. Our research highlights the significance of Thpo signaling in regulating HSC differentiation and maintenance through modifications of mitochondria metabolism.

研究分野：実験血液学

キーワード：造血幹細胞 ミトコンドリア 巨核球 静止期 分化

1. 研究開始当初の背景

恒常的な血球産生には骨髄造血幹細胞(hematopoietic stem cell: HSC)の維持・増殖・分化が不可欠である。また、正常な止血プロセスには HSC より分化する巨核球(Megakaryocyte:Mk)から血小板が適切に生成されることが必要である。HSC は異なる分化能を有する複数のクローンから構成されており、その一つとして Mk への分化バイアスを有する HSC の存在が指摘されている。しかし、Mk はその性質や表面抗原の点で HSC と共通点が見られ、HSC から Mk への分化決定のメカニズムは依然として不明確な点が多い。申請者は、**HSC の Mk への特異的分化能を規定する新規因子の同定とそのメカニズムの解明を**対象とする研究を行ってきた。近年、HSC の幹細胞性が解析される中、HSC の中には、個々に異なった特異的な血球系への分化バイアスを有する HSC が存在することが報告された(Yamamoto et al. *Cell* 2013、Sanjuan-Pla et al. *Nature* 2013)。これらの報告では、Mk への分化 bias を有する HSC (Mk-biased HSC)は、巨赤芽球系前駆細胞を経由した Mk への分化をバイパスする経路の存在が示唆されているが、その制御機構や生理的意義は未だ解明されていない。また、**HSC の分化 bias を規定するメカニズムも解明されていない。**

申請者は、Mk が HSC の未分化性の維持に関わる Thpo を産生し、自己の分化誘導と HSC の静止期維持に寄与していることを解析した(Nakamura-Ishizu BBRC 2014、Nakamura-Ishizu, JEM 2015)。しかしながら、Thpo は、同時に HSC の自己複製性増殖を誘発する因子でもある。マウスに Thpo を投与し HSC の動向を解析した結果、Thpo 投与後短期間で、Mk 因子を高く発現する HSC が誘導された。これらの HSC は in vitro、in vivo のいずれにおいても Mk への分化バイアスを高く示し、Mk-biased HSC と同様の特徴を有していた。そこで、Thpo を投与したマウスの HSC を単離し、単一細胞 RNA sequencing により遺伝子発現解析をしたところ、Thpo シグナルによる刺激下の HSC は mitochondria 関連遺伝子の発現が有意に高い傾向にあることが認められた。これらは、Thpo シグナルにより誘導される HSC の Mk への分化と HSC の mitochondria 代謝が関連していることを示唆している。しかしながら、**Thpo シグナルがどの様に mitochondria 代謝を活性化するのは現時点では不明である。**

成人 HSC が定着する骨髄は、他の組織や循環系と比較し、低酸素状態にあり HSC は嫌氣的に解糖系代謝に依存することで細胞周期を静止期に維持するとされてきた(Suda et al. *Cell Stem Cell* 2011)。しかしながら、HSC は他の造血前駆細胞と同様に活性のある mitochondria を保有し、mitochondria rich HSC と mitochondria low HSC とに分類できる(Vannini et al. *Nat Commun.* 2016)。Mitochondria high HSC 及び mitochondria low HSC をそれぞれ Thpo シグナルの刺激下で培養したところ、mitochondria high HSC は、mitochondria low HSC よりも、Mk への分化について優位性を示した。しかし、**mitochondria の数や機能が HSC の分化決定に関連し、あるいは、HSC の代謝活性が HSC の Mk への分化を規定する**という報告はまだ存在していない。

2. 研究の目的

本研究は、HSC の直接的な Mk への分化が Thpo シグナルを介した HSC の mitochondria 代謝により制御されていることを提唱し、その詳細なメカニズムを解析することを目的とする。骨髄ニッチにより産生される cytokine, Thrombopoietin(Thpo)とその mitochondria 代謝の活性に着目し、mitochondria 代謝の制御を介した HSC の Mk への直接的分化の決定メカニズムを解析する。次の(1)及び(2)の問いに対して回答を与えるべく解析を行った。(1) Thpo シグナルはどのように

HSC の mitochondria 代謝を活性化させるのか。(2) HSC の mitochondria 代謝を制御することで HSC の分化誘導あるいは自己複製性の維持は可能か。通常、静止期 HSC は mitochondria 代謝の活性が低いとされているが、本研究は定常状態及びストレス造血時における好氣的代謝が HSC の Mk への分化運命を決定することを新たに提唱する。当研究結果は、生体内外における HSC からの効率性に優れた血小板分化誘導に利用できると思われる。

3 . 研究の方法

(1) Thpo シグナルはどのように HSC の mitochondria 代謝を活性化させるのか。

(1)の問に関して、生体内での Thpo シグナルによる HSC の mitochondria 代謝の活性化及び Mk への分化のメカニズムをより精密に解析した。Thpo 刺激・非刺激及び mitochondria high/low HSC の競合的骨髄移植を行い、末梢血小板再構成能を観察する。また、既に作成済みの Thpo 遺伝子欠損マウスから分離した HSC を使用して、Mk への分化及び mitochondria 代謝の活性化の解析を行う。さらには、Thpo 遺伝子欠損マウスに recombinant Thpo 又は Thpo 受容体 agonist (romiplostim) を投与し HSC の正常化及び mitochondria 代謝の変化を解析し、Thpo による HSC の mitochondria 代謝の機能及び形態の詳細な解析を行った。より具体的には、mitochondria マーカー染色による flow cytometry 解析、蛍光顕微鏡解析及び電子顕微鏡解析を行い、ROS 産生能及び ATP 産生能を測定した。加えて、Thpo は定常状態での血液循環や骨髄ニッチから HSC に供給されているため、定常状態の HSC の mitochondria 代謝の状態も合わせて考察する。mass cytometry(CyTOF) 解析を導入し、30 種類の重金属ラベル抗体で単一の HSC を染色し発現パターンを解析した。複数のパラメーターを同時に解析できる CyTOF により、HSC における Mk 因子及び代謝活性シグナル経路を解析した。また、Thpo シグナルの刺激による STAT3 及び STAT5 の活性を flow cytometry, CyTOF で、mitochondria への局在を超解像顕微鏡(Nikon NSTORM)にて検証した。

(2) HSC の mitochondria 代謝を制御することで HSC の分化誘導あるいは自己複製性の維持は可能か

(2)の問に関しては、Thpo シグナル刺激による幹細胞の細胞周期変化、アポトーシス誘導、酸化的ストレスの程度が mitochondria high/low HSC で異なるかを検討した。具体的には、flow cytometry による細胞周期、アポトーシス、酸化的ストレスの評価、qPCR による関連遺伝子の発現を解析した。

4 . 研究成果

(1) Thpo シグナルはどのように HSC の mitochondria 代謝を活性化させるのか。

まず、Thpo 刺激・非刺激及び mitochondria high/low HSC の競合的骨髄移植を行い解析した。Thpo 受容体作動薬の Romiplostim で刺激したマウスより分離した HSC は Thpo 非刺激 HSC と比べ、競合的骨髄移植にて血小板・巨核球分化傾向が強い結果を得られた。また HSC を TMRE にて染色し、Mitochondria 機能が高い HSC と低い HSC を競合移植した結果、TMRE high HSC は TMRE low HSC と比べ血小板・巨核球分化傾向が強い結果を得られた。TMRE high と TMRE low HSC 蛍光顕微鏡解析及び電子顕微鏡解析を行ったところ、mitochondria 活性が高く、Mk 分化能の高い HSC はミトコンドリア体積が多く、mitochondria cristae が密に存在することを認めた。CyTOF 解析にて、Thpo 受容体作動薬の Romiplostim で刺激したマウスより分

分離した HSC は Thpo 非刺激 HSC と比べ、CD9、CD41 などの Mk マーカーを多く発現し、pSTAT1、pMAPK など Thpo シグナル下流タンパクや代謝シグナルを多く発現していることを認めた。CD9 の発現に着目し、CD9 を高発現する HSC を解析したところ、CD9 の発現が高いほど mitochondria 活性は高く、Mk への分化傾向が高いことを認めた。また、NSTORM により、pSTAT3 シグナルが TMRE 活性の高い HSC では Mitochondria に局在することを認め、Thpo 刺激による HSC の Mk 分化のメカニズムの一つと考えた。これらの結果を 2018 Cell Reports にて報告した。

(2) HSC の mitochondria 代謝を制御することで HSC の分化誘導あるいは自己複製性の維持は可能か

さらに、Thpo 遺伝子欠損マウスから分離した HSC の解析を行った。Thpo 欠損の骨髄環境に置かれた HSC は細胞周期が活発に周り、増殖傾向を示すにも関わらず、ミトコンドリア活性は低い傾向にあり、ATP エネルギーの産生も低い傾向にあることを確認した。**Thpo** 欠損下において、**HSC** の数の減少、静止期破綻、およびアポトーシスの亢進を認めた。しかしながら、**Thpo** 遺伝子欠損マウスより分離した **HSC** を競合的骨髄移植したところ、正常な骨髄再構築能を示した。これらのことは **Thpo** 欠損による造血幹細胞障害が可逆的であることを示唆している。また、**Thpo** 受容体アゴニストを **Thpo** 遺伝子欠損マウスに投与し、その長期的な作用を検討した。その結果、**Thpo** 受容体アゴニストは **Thpo** 遺伝子欠損マウスにおいて、造血幹細胞の静止性を誘導した。一方、野生型マウスにおいて、**Thpo** 受容体アゴニストは造血幹細胞の増殖性を誘導した。競合的骨髄移植において、**Thpo** シグナルを長期的に与えた **Thpo** 遺伝子欠損マウス由来の造血幹細胞は野生型マウスの造血幹細胞と比較し、優位に高い造血再構築能を示した。また、**Thpo** 遺伝子欠損マウスと野生型マウスの造血幹細胞の **RNA** シークエンス解析を行い、**Thpo** 遺伝子欠損マウス由来の造血幹細胞はミトコンドリア代謝を含めた広範囲の代謝関連遺伝子の発現差が認められ、これらの遺伝子発現パターンは **Thpo** アゴニストの投与において正常化する傾向を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nakamura Ishizu Ayako, Suda Toshio	4. 巻 Apr;1466(1)
2. 論文標題 Multifaceted roles of thrombopoietin in hematopoietic stem cell regulation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of the New York Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 :51-58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nyas.14169	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakamura-Ishizu Ayako, Matsumura Takayoshi, Stumpf Patrick S., Umemoto Terumasa, Takizawa Hitoshi, Takihara Yuji, O'Neil Aled, Majeed A'Qilah Banu Bte Abdul, MacArthur Ben D., Suda Toshio	4. 巻 25
2. 論文標題 Thrombopoietin Metabolically Primes Hematopoietic Stem Cells to Megakaryocyte-Lineage Differentiation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1772 ~ 1785.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.10.059	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakamura-Ishizu Ayako, Chin Desmond Wai Loon, Matsumura Takayoshi, Tan Darren Qiancheng, Mochizuki-Kashio Makiko, Jianwen Deng, Suda Toshio	4. 巻 137
2. 論文標題 Prolonged maintenance of hematopoietic stem cells that escape from thrombopoietin deprivation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 2609 ~ 2620
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2020005517	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakamura-Ishizu Ayako, Ito Keisuke, Suda Toshio	4. 巻 54
2. 論文標題 Hematopoietic Stem Cell Metabolism during Development and Aging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 239 ~ 255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2020.06.029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Ayako Nakamura-Ishizu
2. 発表標題 “ The multifaceted roles of thrombopoietin in hematopoietic stem cell maintenance ”
3. 学会等名 Japan Association of Anatomists, regional meeting, Invited speaker, (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayako Nakamura-Ishizu
2. 発表標題 Thrombopoietin-mediated metabolic homeostasis for the maintenance of bone marrow hematopoietic stem cells
3. 学会等名 Hematology Meeting of Hematopoietic and Leukemic Stem Cells (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ayako Nakamura-Ishizu
2. 発表標題 Quiescence induction in a Thpo-independent HSC subset
3. 学会等名 日本血液学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayako Nakamura-Ishizu
2. 発表標題 A Thpo-independent HSC subset which can be induced to quiescence
3. 学会等名 Cancer Science Institute, CSI meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayako Nakamura-Ishizu
2. 発表標題 Characterization of Thpo-independent hematopoietic stem cells which are induced to quiescence
3. 学会等名 ISEH (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayako Nakamura-Ishizu
2. 発表標題 Thrombopoietin mediates metabolic priming of hematopoietic stem cells for rapid megakaryocyte lineage differentiation
3. 学会等名 Stem cell symposium, Kyushu University, Fukuoka, Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Ayako Nakamura-Ishizu
2. 発表標題 Thrombopoietin induces oxidative metabolism in hematopoietic stem cell differentiation.
3. 学会等名 MSC Cancer Program Symposium, NUS, Singapore (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Ayako Nakamura-Ishizu
2. 発表標題 Thrombopoietin regulates mitochondria homeostasis for HSC maintenance
3. 学会等名 The 82nd Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	須田 年生 (Suda Toshio) (60118453)	熊本大学・国際先端医学研究機構・卓越教授 (17401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------