

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K14702

研究課題名（和文）造血幹細胞の運動能制御機構の解明

研究課題名（英文）To Elucidate the Regulation Mechanism of Hematopoietic Stem Cell's Mobility

研究代表者

アブドゥル アジズ (IBRAHIM, ABD AZIZ)

東海大学・医学部・特任講師

研究者番号：50738789

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）：動員因子であるG-CSFによって、PKAを活性化し、Smad3とCREBで競合的にp300を奪い合うことになり、PKA優位の場合にはSmad3依存的な転写活性は抑制される。このことがTGF- β -PAI-1による造血幹細胞の静止状態を解除するメカニズムであることを見出した。G-CSFによって動員された幹細胞は、PKA-CREB-p300経路の活性化し、PAI-1発現が低下していることを明確した。PKAやp300の阻害剤によりG-CSFの効果が打ち消されることを確認し、遊走促進因子によるPAI-1発現の低下と運動能の亢進がPKA-CREB-p300経路依存であることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、静止幹細胞が運動能を獲得するに至る分子の機序を解明し、その運動能制御機構を利用した再生医療の効率化と、がん幹細胞の運動能亢進による治療高感受性化に取り組み、PAI-1阻害剤の適応拡大を可能にした。

研究成果の概要（英文）：Here, we provide evidence that G-CSF mobilizing agents inhibits Smad3-dependent signaling by regulating cAMP-PKA-dependent signaling pathway in Hematopoietic Stem Cells (HSCs). G-CSF induces activation of this pathway by inhibits Smad3-dependent expression of PAI-1 through an increase in phosphorylation level of CREB protein. Mechanistically, increased p-CREB competitively inhibited the p-Smad3 from binding to the p300, which ultimately resulting in a transcriptional suppression of p-Smad3-p300 transcription regulatory complex-dependent PAI-1 gene expression.

Our study reveals a novel role for G-CSF in controlling TGF- β -PAI-1 signaling to recruit HSCs into the circulation, which potentially improves clinical HSC mobilization, transplantation protocols and cancer therapy.

研究分野：造血幹細胞

キーワード：造血幹細胞 細胞運動能の制御 PAI-1 P300 PKA-CREB-P300

1. 研究開始当初の背景

幹細胞はニッチと呼ばれる特殊な場に『静止』し幹細胞活性を維持するとともに、ストレス負荷時にはニッチから『離脱』し造血系の恒常性を維持する。したがって、幹細胞のニッチにおける静止と離脱を司る運動能制御機構は幹細胞活性制御の根幹をなす基本原理である。しかし、幹細胞の静止状態は細胞周期の制御にのみ焦点が当てられてきたことから、運動能の制御機構には不明な点が多い。申請者らは、プラスミノゲン活性化抑制因子 (PAI-1) が造血幹細胞の運動能を抑制することによってニッチに静止させることを突き止めた。重要なことに、申請者らが開発した PAI-1 阻害剤を投与すると、幹細胞の運動能が亢進しニッチから離脱して末梢血中に遊走する。

申請者らは、ニッチが産生する TGF- β が幹細胞の PAI-1 発現を誘導すること、そして PAI-1 が、細胞内で MT1-MMP を前駆体型から成熟型に変換する酵素である Furin の酵素活性を阻害し、MT1-MMP の発現を抑制することを発見した。つまり、ニッチにおいて PAI-1 が幹細胞の運動能を制限していることを明らかにした。重要なことに、PAI-1 発現を増強すると幹細胞はニッチに留まり、逆に、PAI-1 阻害剤や遺伝子欠損により PAI-1 活性を抑制すると幹細胞がニッチから離脱すること、すなわち、PAI-1 活性の増減によって幹細胞の運動能が決定されるという驚くべき知見を得た。

TGF- β -PAI-1 シグナル経路が幹細胞をニッチに『静止』させる主要なメカニズムであることを解明することに成功したが、ストレス応答時に産生される G-CSF などの遊走促進因子がどのようにして TGF- β -PAI-1 による運動能の抑制を解除し、ニッチからの『離脱』を促進するのかについての分子メカニズムは全く不明なままであり、幹細胞の動態制御の理解としては不十分である。そこで本研究計画では、幹細胞遊走促進因子が幹細胞の『静止』状態を解除し『離脱』を促す分子的機序は何か？そして、幹細胞運動は再生反応の促進やがん幹細胞の治療感受性の決定などに重要な役割を果たしていることから、その制御機構を基盤とした再生医療の高効率化とがんの根治療法の確立は実現できるか？を本研究課題の核心をなす学術的「問い」として立てる。

2. 研究の目的

本研究は、静止幹細胞が運動能を獲得するに至る分子的機序を解明することを目的にし、その運動能制御機構を利用した再生医療の高効率化と、がん幹細胞の運動能亢進による治療高感受性化に取り組み、PAI-1 阻害剤の適応拡大を目指す。

3. 研究の方法

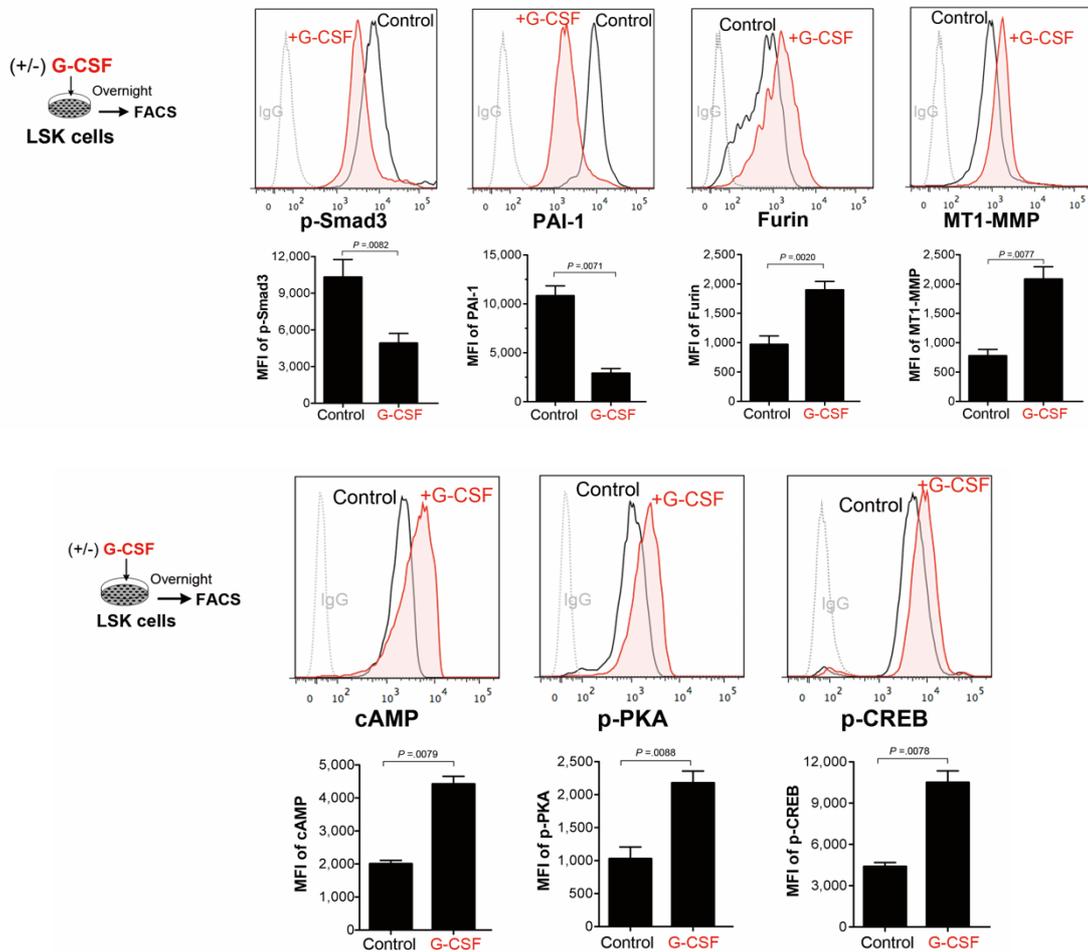
- (1) 試験管内の培養培地に TGF- β または動員因子である G-CSF を添加し、造血幹細胞内の Smad3, PAI-1, MT1-MMP, PKA, CREB, P300 の発現を検討し、FACS で解析した。
- (2) 10ng/ml の TGF- β 添加培地に、G-CSF の濃度を 0ng/ml から 100ng/ml まで段階的に高めて添加し、In Situ 近接ライゲーションアッセイ (PLA) の解析で幹細胞内のリン酸化タンパク質/転写因子 co-factor (p-Smad3/p300 及び p-CREB/p300) の複合体を可視化し、定量化した。
- (3) PAI-1 阻害剤 (TM5614, TM5509) によって幹細胞の動員が促進され、現行の G-CSF 製剤の代替や用量の低減が可能か否かを検証した。前処置として PAI-1 阻害剤を投与しレシピエント

の幹細胞のニッチからの離脱を誘導した後にドナー幹細胞を移植し、放射線照射をしない条件であっても空きニッチが形成され幹細胞が生着することを実証した。

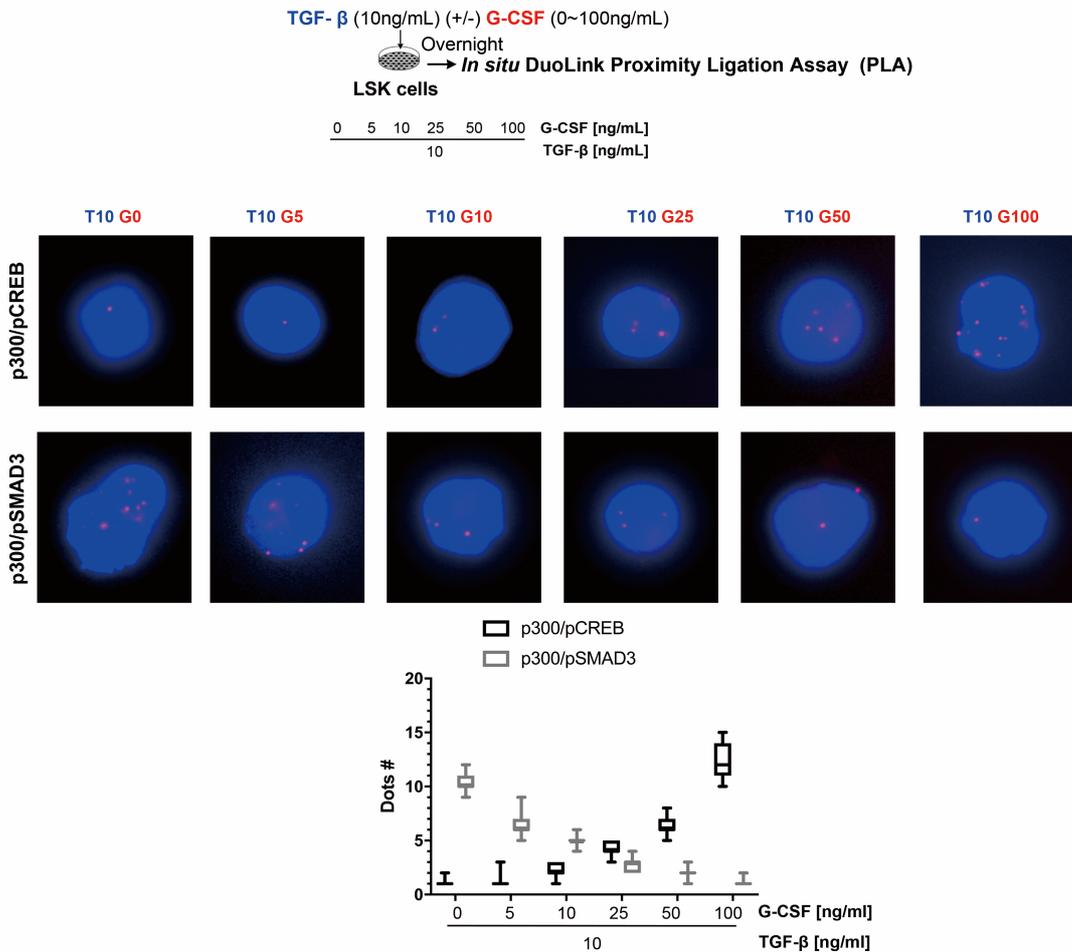
- (4) 造血幹細胞にBCR-ABL遺伝子などを導入しマウスに白血病を発症させる実験系で、白血病幹細胞がTGF- β シグナル依存的にPAI-1を高発現していることはすでに確認していた。そこで、正常造血幹細胞と同様にPAI-1によって白血病幹細胞の運動能が抑制されニッチに留まることを実証した。PAI-1阻害剤が白血病幹細胞のニッチからの離脱を促進し、抗がん剤高感受性化すること、その結果骨髄内から白血病幹細胞が完全に排除され再発が起きないことを実証した。

4. 研究成果

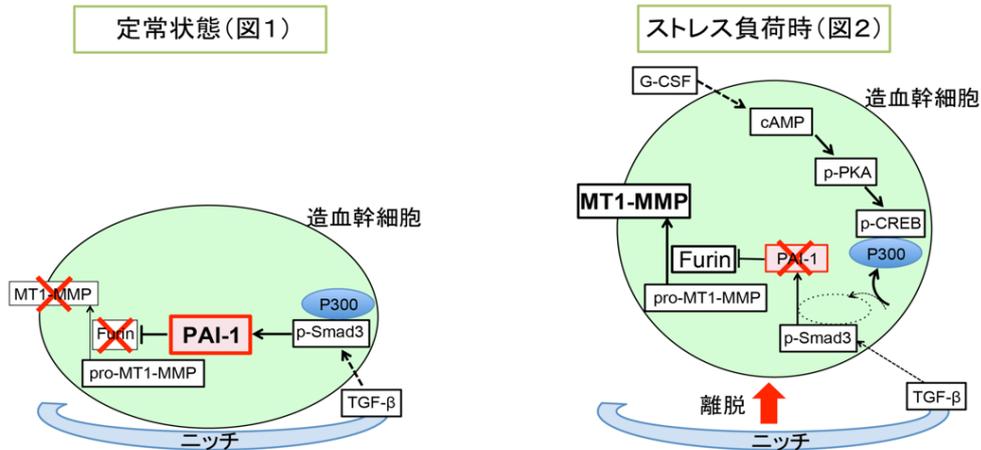
試験管内の培地に G-CSF を添加すると、リン酸化 Smad3 および PAI-1 の発現が抑制されたが、Furin と MT1-MMP の発現が増強したことを見出した。さらに、G-CSF は cAMP、リン酸化 PKA とリン酸化 CREB の発現を増強したことを明らかにした。



TGF- β 添加培地に、G-CSF の濃度を段階的に高めて添加し、ニッチにおいて TGF- β によって運動能が抑制されている幹細胞に遊走因子が作用し運動能を付与するに至る状況を再現した。Smad と CREB に結合する p300 の割合の変化と MT1-MMP 発現や遊走能の相関を FACS や In Situ 近接ライゲーションアッセイ (PLA) の解析を行った。その結果、G-CSF によって p300/pSmad3 複合体の数 (赤色点の数) が減少したが、p300/pCREB 複合体の数が増強したことから遊走促進因子 G-CSF が p300 を pSmad3 から奪って pCREB へ結合させることによって、TGF- β による幹細胞の運動能の抑制を解除することを実証した。



ニッチから産生され、造血幹細胞の幹細胞活性の維持に重要な役割を果たす TGF- β は、PAI-1 の強力な誘導体である。TGF- β が Smad3 のリン酸化を介して造血幹細胞の PAI-1 発現を誘導し、その PAI-1 が Furin 活性を抑制する。Furin は前駆体タンパク質を成熟型に変換する酵素であるため、PAI-1 による阻害により細胞遊走に重要な MT1-MMP の膜型への変換が低下する。このことが造血幹細胞の運動能抑制のメカニズムであり、静止状態維持の主要な経路であることを突き止めた。



以上の本研究の結果から、TGF- β -Smad3 依存的な PAI-1 の転写活性には p300 タンパク質との結合が必要であるが、p300 は G-CSF によって誘導される PKA 依存的な CREB による転写活性においても要求される。すなわち、G-CSF による PKA の活性化は、Smad3 と CREB で競合的に p300 を奪い合うことになり、PKA 優位の場合には Smad3 依存的な転写活性は抑制される。このこ

とが TGF- β -PAI-1 による静止状態を解除するメカニズムであるという仮説が成り立つ蓋然性が高い。G-CSF によって動員された幹細胞は、PKA-CREB-p300 経路の活性化し、PAI-1 発現が低下していることを確認した。さらに、PKA や p300 の阻害剤により G-CSF の効果が打ち消されることを確認し、遊走促進因子による PAI-1 発現の低下と運動能の亢進が PKA-CREB-p300 経路依存的事であることを証明した。

PAI-1 分子を阻害することで幹細胞の運動能を制御する応用として PAI-1 阻害剤 (TM5614, TM5509) を用いた。活性 PAI-1 の機能を PAI-1 阻害剤で抑制し、マウス骨髄から末梢血に幹細胞を動員することによって、骨髄に空きニッチが形成され、化学療法や放射線療法の移植前処置なしでもマウスの骨髄移植が可能にした。放射線照射を実施することなく“空きニッチ”を確保し、再生の場を最適な状態にすることができれば、再生反応の格段の効率化が実現でき、副作用の大幅な軽減や対象患者の適応拡大など患者 QOL の飛躍的な向上が期待できる。さらに、血液がんにおいて、分子標的薬 Imatinib (IM) と PAI-1 阻害剤を併用することで、ニッチからがん幹細胞が離脱し、より血液がん治療の感受性が達成され、マウス生存の延命も見出した。がん幹細胞の運動能を亢進しニッチから離脱させれば、がん幹細胞の休眠状態が解除され、抗がん剤に対して『高感受性化』するので、がんの完全な排除を実現することが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Harama Daisuke, Yahata Takashi, Kagami Keiko, Abe Masako, Ando Norie, Kasai Shin, Tamai Minoru, Akahane Koshi, Inukai Takeshi, Kiyokawa Nobutaka, Ibrahim Abd Aziz, Ando Kiyoshi, Sugita Kanji	4. 巻 7
2. 論文標題 IMiDs uniquely synergize with TKIs to upregulate apoptosis of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia cells expressing a dominant-negative IKZF1 isoform	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Death Discovery	6. 最初と最後の頁 1, 14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41420-021-00523-y	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 Takashi Yahata, Abd Aziz Ibrahim, Ken-ichi Hirano, Yukari Muguruma, Kazuhito Naka, Katsuto Hozumi, Douglas E. Vaughan, Toshio Miyata, Kiyoshi Ando	4. 巻 106
2. 論文標題 Targeting of plasminogen activator inhibitor-1 activity promotes elimination of chronic myeloid leukemia stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 483 ~ 494
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3324/haematol.2019.230227	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 Harada Kaito, Yahata Takashi, Onizuka Makoto, Ibrahim Abd Aziz, Kikkawa Eri, Miyata Toshio, Ando Kiyoshi	4. 巻 557
2. 論文標題 Plasminogen activator inhibitor type-1 is a negative regulator of hematopoietic regeneration in the adipocyte-rich bone marrow microenvironment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 180 ~ 186
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.04.017	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 Ibrahim Abd Aziz, Yahata Takashi, Muguruma Yukari, Miyata Toshio, Ando Kiyoshi	4. 巻 516(2)
2. 論文標題 Blockade of plasminogen activator inhibitor-1 empties bone marrow niche sufficient for donor hematopoietic stem cell engraftment without myeloablative conditioning	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 500 ~ 505
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.06.076	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 Imai Jin, Yahata Takashi, Ichikawa Hitoshi, Ibrahim Abd Aziz, Yazawa Masaki, Sumiyoshi Hideaki, Inagaki Yutaka, Matsushima Masashi, Suzuki Takayoshi, Mine Tetsuya, Ando Kiyoshi, Miyata Toshio, Hozumi Katsuto	4. 巻 18(2)
2. 論文標題 Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 attenuates against intestinal fibrosis in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Intestinal Research	6. 最初と最後の頁 219-228
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5217/ir.2019.00037	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

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Abd Aziz Ibrahim, Takashi Yahata, Yukari Muguruma, Toshio Miyata, and Kiyoshi Ando
2. 発表標題 Pharmacological Inhibition of PAI-1 Empties Bone Marrow Niche Without Myeloablative Conditioning
3. 学会等名 The 81st Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kaito Harada, Makoto Onizuka, Takashi Yahata, Abd Aziz Ibrahim, Eri Kikkawa, Toshio Miyata, Kiyoshi Ando
2. 発表標題 Bone Marrow Adipocyte-Derived PAI-1 As a Negative Regulator of Hematopoietic Regeneration
3. 学会等名 The 61st American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------