

平成 21年 6月 8日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19209036

研究課題名（和文）造血幹細胞の冬眠を規定するニッチシグナルの同定

研究課題名（英文） Identification of niche signal prescribing hibernation of hematopoietic stem cell

研究代表者

氏名 中内 啓光 (Nakauchi Hiromitsu)

所属機関・所属部局名・職名 東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号 40175485

研究成果の概要：(200字程度、難解な専門用語は避けること)

骨髄ニッチに存在する造血幹細胞にはLipid raft clustering(LRC)がなく、骨髄中の前駆細胞や骨髄から取り出してきてサイトカイン刺激した造血幹細胞にはLRCが存在するという事実から骨髄ニッチにはLRC形成を阻害する因子(シグナル)があるのではないかと考えた。この仮説のもと、ニッチシグナル分子と考えられている分子を対象として、サイトカイン刺激においてもLRCを阻害する分子をスクリーニングした。その結果、TGF-betaがLRCを阻害することを明らかにし、骨髄ニッチシグナルの一つの候補としてTGF-betaを同定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	24,300,000	7,290,000	31,590,000
2008年度	14,800,000	4,440,000	19,240,000
総計	39,100,000	11,730,000	50,830,000

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、リッピドラフト、冬眠、ニッチ、FOXO

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は多分化能と自己複製能を兼ね備えた未分化な細胞と定義され、組織・臓器の発生・修復・維持に重要な役割を果たしている。申請者は高度に純化された造血幹細胞を用いてクローナルな解析を行うことにより幹細胞研究を概念的、定性的な研究から現実的で定量的なものとへと変換させるとともに、分子レベルでの理解を着実に進めてきた。しかしながらこれまでどうしてもできなかったことの一つに造血幹細胞の細胞内シグナル伝達機構の解析がある。皮肉なことに造血幹細胞の純化が進めば進むほど得られる細胞

数が減少し、ウェスタンブロットなどの免疫電気泳動法を基本にした生化学的な解析法を利用することができないのである。ところが造血幹細胞の純化法を確立してからの10年の間に共焦点顕微鏡、レーザースキャニングサイトメトリ、コンピューターの性能が向上したことに支えられ、昨年、数十個程度の細胞を対象として安定で再現性の高い免疫染色を行うことができる実験系(Single Cell Immuno Staining, SCIS)法を確立することに成功した(Nature Protocol, 2007)。SCIS法を利用して申請者等は骨髄ニッチに存在する造血幹細胞が静止期の状態を保っている機

構が線虫やリスにおける冬眠と同じFOXO転写因子を利用したメカニズムであることを明らかにした(EMBO J, 2006)。SCIS法は各種タンパクの造血幹細胞における発現と細胞内局在を確認できるのみならず、抗リン酸化抗体を用いることにより、サイトカイン等による刺激後のエフェクター分子のリン酸化などのシグナル伝達系を定量的に解析できる系に発展している(PNAS 2007)。申請者らが開発したこれらの新しい技術を利用することにより、いよいよ造血幹細胞そのものを対象として細胞内のイベントを解析することが可能になった。これが本研究プロジェクト申請の理由である。

2. 研究の目的

1) 造血幹細胞におけるサイトカイン刺激後のLipid Raft Clustering(LRC)の意義

最も自然な状態でLRCが形成されていると考えられる造血前駆細胞を対象にしてLRCがどのようなコンポーネントより構成されているか、また造血幹細胞がどのような刺激によっていかなるkineticsのもとでLRCを形成するようかを明らかにする。またヒト未分化造血前駆細胞や白血病幹細胞についてもLRC形成の有無を解析し、ヒト造血系においても同様な機構が働いているかを明らかにする。

2) Lipid Raft Clustering形成の有無を利用した骨髄ニッチシグナルの同定

造血幹細胞がTPO+SCF刺激によっても増殖できない状態にするようなシグナルをニッチシグナルであると仮定し、候補分子をスクリーニングすることにより造血幹細胞の増殖を抑制する分子を同定しその骨髄ニッチシグナルとしての機能を証明する。

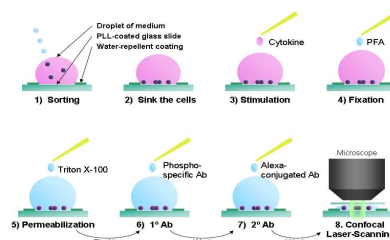
3. 研究の方法

骨髄から分離したばかりの造血幹細胞とin vitroでcytokine刺激後の造血幹細胞や造血前駆細胞を前述のSCIS法を利用して詳細に比較解析したところ、骨髄ニッチにいた造血幹細胞はLRCを形成していないが、造血前駆細胞やサイトカイン刺激後の造血幹細胞のほぼすべてがLRCを形成しているという驚くべき結果を得た。さらに阻害薬でLRC形成を阻

害することによって造血幹細胞をex vivoにおいて分裂も分化もさせず静止期の状態で維持できることを実験的に示した(EMBO J, 2006)。これらの知見はLRCの形成が骨髄における造血幹細胞の静止期からの離脱に重要な役割を持つことを強く示唆するものである。そこでLipid-raft分画の基本構造やコンポーネントを明らかにするとともに反応のKineticsの解析を試みることにより造血幹細胞におけるLRCの機能を明確にする。Lipid-raft分画は細胞膜上でスフィンゴ脂質とコレステロールおよびタンパク質が集積した分画であるが、糖脂質の種類により集積するタンパク質も異なってくる。本研究では最も自然な状態でLRCが形成されていると考えられ、解析に十分な細胞数を得ることができる造血前駆細胞(CD34+Kit+Sca+Lin-細胞)を対象としてウエスタンブロット、免疫電顕、シリカゲル薄層クロマトグラフィー等の生化学的、形態学的な解析を行い造血幹細胞のlipid-raft分画がどのようなガングリオシド(酸性糖脂質)の構成を示すかを特定する。これにより、LRCがどのような基本構造を保持しているかを解明する。

造血幹細胞のLRC中に含まれる細胞膜タンパクの同定

造血幹細胞に発現していることが確認されているc-Mpl, c-Kit, Flt-3, Tie-2, EPO-R, CD26, 各種インテグリンなどがLRC形成に関与しているかを明らかにする。具体的には造血幹細胞をTPO+SCFで刺激した後にLRCの局在を認識する蛍光標識Cholera Toxin B-subunitおよび各種細胞膜タンパクに



Single Cell Immunostaining Assay (SCISA) : FACSで50個の造血幹細胞を直接PLLコートしたスライドガラス上の培養液滴中にソーティングする。あとの操作はすべてスライドガラス上で行い、遠心操作は不要。

対する標識特異抗体で多重免疫染色しSCIS法を用いて解析する。

4. 研究成果

(1) ニッチシグナル分子と考えられている

分子をとして Notch リガンド、アクチビンや BMP などの TGF-beta ファミリー分子、Wnt など、また接着因子として N-カドヘリンやインテグリンなどの分子を予め造血幹細胞を培養する培地に加えた後、サイトカイン刺激においても LRC を阻害する分子をスクリーニングした。その結果、TGF-beta が LRC を阻害することを明らかにした。

(2) SCIS 法を用いることによりごく少数しか得ることができないため通寿の生化学的解析手法が利用できない造血幹細胞においてもシグナル解析が可能となった。これらの解析から骨髓中に存在している造血幹細胞では TGF-beta 受容体の下流にある Smad2/3 が顕著にリン酸化していたことが明らかとなり、TGF-beta が骨髓ニッチシグナルの一つであることを支持する結果が得られた。

(3) TGF-beta の刺激により *in vitro* の環境で造血幹細胞を骨髓中のニッチに存在している時と同様な冬眠状態に誘導することに成功した。

また、TGF-beta の種類 (TGF-beta1、beta2、beta3) を変えることにより最長で 15 日間以上、造血幹細胞を *in vitro* で冬眠状態に誘導できた。

(4) 細胞周期の負の制御因子である p57 は冬眠状態にある造血幹細胞において非常に高い発現を示す。しかし、SCF や TPO のサイトカインで刺激をして細胞周期に入ると p57 の発現が下がることが明らかにしている。この発現調節に TGF-beta およびその受容体からの刺激が関係していることを明らかにした。

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 32 件)

1. Okabe M, Otsu M, Ahn DH, Kobayashi T, Wakiyama Y, Morita Y, Onodera M, Eto K, Ema H, Nakauchi H. Definitive proof for direct reprogramming of hematopoietic cells to pluripotency. *Blood*. *in press*.
2. Yamazaki S, Nakauchi H. Insights into signaling and function of hematopoietic stem cells at the single-cell level. *Curr Opin Hematol*. 2009 May 21 *in press*.
3. Kakinuma S, Ohta H, Kamiya A, Yamazaki Y, Oikawa T, Okada K, Nakauchi H.

Analyses of cell surface molecules on hepatic stem/progenitor cells in mouse fetal liver. *J Hepatol*. 2009 May 5. *in press*.

4. Ogaeri T, Eto K, Otsu M, Ema H, Nakauchi H. The actin polymerization regulator WAVE2 is required for early bone marrow repopulation by hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 27:1120-1129. 2009.
5. Matsumoto K, Isagawa T, Nishimura T, Ogaeri T, Eto K, Miyazaki S, Miyazaki J, Aburatani H, Nakauchi H, Ema H. Stepwise development of hematopoietic stem cells from embryonic stem cells. *PLoS ONE*. 4:e4820, 2009
6. Sogo T, Kawahara M, Ueda H, Otsu M, Onodera M, Nakauchi H, Nagamune T. T cell growth control using hapten-specific antibody/interleukin-2 receptor chimera. *Cytokine*. 2009 *In Press*
7. Kakinuma S, Nakauchi H, Watanabe M. Hepatic stem/progenitor cells and stem-cell transplantation for the treatment of liver disease. *J Gastroenterol*. 44:167-72, 2009
8. Yamazaki S, Suzuki N, Saito T, Ishii Y, Takiguchi M, Nakauchi H, Watanabe N. A rapid and efficient strategy to generate allele-specific anti-HLA monoclonal antibodies. *J Immunol Methods*. 343:56-60, 2009
9. Oikawa T, Kamiya A, Kakinuma S, Zeniya M, Nishinakamura R, Tajiri H, Nakauchi H. Sall4 regulates cell fate decision in fetal hepatic stem/progenitor cells. *Gastroenterology*. 136:1000-11, 2009
10. Yashiro Y, Bannai H, Minowa T, Yabiku T, Miyano S, Osawa M, Iwama A, Nakauchi H. Transcriptional profiling of hematopoietic stem cells by high-throughput sequencing. *Int J Hematol*. 89:24-33, 2009
11. Hyun I, Lindvall O, Ahrlund-Richter L, Cattaneo E, Cavazzana-Calvo M, Cossu G, De Luca M, Fox IJ, Gerstle C, Goldstein RA, Hermerén G, High KA, Kim HO, Lee HP, Levy-Lahad E, Li L, Lo B, Marshak DR, McNab A, Munsie M, Nakauchi H, Rao M, Rooke HM, Valles CS, Srivastava A, Sugarman J, Taylor PL, Veiga A, Wong AL, Zoloth L, Daley GQ. New ISSCR guidelines underscore major principles for responsible translational stem cell research. *Cell Stem Cell*. 3:607-9, 2008

12. Suzuki A, Sekiya S, Onishi M, Oshima N, Kiyonari H, Nakauchi H, Taniguchi H. Flow cytometric isolation and clonal identification of self-renewing bipotent hepatic progenitor cells in adult mouse liver. *Hepatology*. 48:1964-78, 2008
13. Chiba T, Miyagi S, Saraya A, Aoki R, Seki A, Morita Y, Yonemitsu Y, Yokosuka O, Taniguchi H, Nakauchi H, Iwama A. The polycomb gene product BMI1 contributes to the maintenance of tumor-initiating side population cells in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 68:7742-9, 2008
14. Ma F, Ebihara Y, Umeda K, Sakai H, Hanada S, Zhang H, Zaike Y, Tsuchida E, Nakahata T, Nakauchi H, Tsuji K. Generation of functional erythrocytes from human embryonic stem cell-derived definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:13087-92, 2008
15. Yamazaki S, Iwama A, Takayanagi S, Eto K, Ema H, Nakauchi H. TGF- β induces hibernation of hematopoietic stem cells in the bone marrow niche. *Blood*. 113:1250-1256. 2009.
16. Kamiya A, Kakinuma S, Onodera M, Miyajima A, Nakauchi H. Prospero-related homeobox 1 and liver receptor homolog 1 coordinately regulate long-term proliferation of murine fetal hepatoblasts. *Hepatology*. 48:252-64, 2008
17. Nishikii H, Eto K, Tamura N, Hattori K, Heissig B, Kanaji T, Sawaguchi A, Goto S, Ware J, Nakauchi H. Metalloproteinase regulation improves *in vitro* generation of efficacious platelets from mouse embryonic stem cells. *J Exp Med*. 205:1917-27, 2008
18. Watanabe N, Takahashi S, Ishige M, Ishii Y, Ooi J, Tomonari A, Tsukada N, Konuma T, Kato S, Sato A, Tojo A, Nakauchi H. Recipient-derived cells after cord blood transplantation: dynamics elucidated by multicolor FACS, reflecting graft failure and relapse. *Biol Blood Marrow Transplant*. 14:693-701. 2008
19. Takayama N, Nishikii H, Usui J, Tsukui H, Sawaguchi A, Hiroshima T, Eto K, Nakauchi H. Generation of functional platelets from human embryonic stem cells *in vitro* via ES-sacs, VEGF-promoted structures that concentrate hematopoietic progenitors. *Blood*. 1:5298-306, 2008
20. Takizawa H, Eto K, Yoshikawa A, Nakauchi H, Takatsu K, Takaki S. Growth and maturation of megakaryocytes is regulated by Lnk/Sh2b3 adaptor protein through crosstalk between cytokine- and integrin-mediated signals. *Exp Hematol*. 36:897-906, 2008
21. Seita J, Asakawa M, Oehara J, Takayanagi SI, Morita Y, Watanabe N, Fujita K, Kudo M, Mizuguchi J, Ema H, Nakauchi H, Yoshimoto Y. Interleukin-27 directly induces differentiation in hematopoietic stem cells. *Blood*. 111:1903-12, 2008
22. Nabekura T, Nagasawa T, Nakauchi H, Onodera M. An immunotherapy approach with dendritic cells genetically modified to express the tumor-associated antigen, HER2. *Cancer Immunol Immunother*. 57:611-22, 2008
23. Heissig B, Lund LR, Akiyama H, Ohki M, Morita Y, Romer J, Nakauchi H, Okumura K, Ogawa H, Werb Z, Dano K, Hattori K. The Plasminogen Fibrinolytic Pathway Is Required for Hematopoietic Regeneration. *Cell Stem Cell*. 1:658-70, 2007
24. Miyamoto K, Araki KY, 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 KI, Harada M, Motoyama N, Suda T, Hirao A. Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Cell Stem Cell*. 1:101-12, 2007
25. Chiba T, Zheng YW, Kita K, Yokosuka O, Saisho H, Onodera M, Miyoshi H, Nakano M, Zen Y, Nakanuma Y, Nakauchi H, Iwama A, Taniguchi H. Enhanced self-renewal capability in hepatic stem/progenitor cells drives cancer initiation. *Gastroenterology*. 133:937-50, 2007
26. Yamazaki S, Iwama A, Morita Y, Eto K, Ema H, Nakauchi H. Cytokine signaling, lipid raft clustering, and HSC hibernation. *Ann NY Acad Sci*. 1106:54-63, 2007
27. Eto K, Nishikii H, Ogaeri T, Suetsugu S, Kamiya A, Kobayashi T, Yamazaki D, Oda A, Takenawa T, Nakauchi H. The WAVE2/Abi1 complex differentially regulates megakaryocyte development and spreading: implications for platelet

biogenesis and spreading machinery. *Blood*. 110:3637-47, 2007

28. Tadokoro Y, Ema H, Okano M, Li E, Nakauchi H. De novo DNA methyltransferase is essential for self-renewal, but not for differentiation, in hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 204:715-22. 2007.
29. Kato Y, Koseki H, Vidal M, Nakauchi H, Iwama A. Unique composition of polycomb repressive complex 1 in hematopoietic stem cells.. *Int J Hematol*. 85:179-81, 2007
30. Seita, J., Ema, H., Oeohara, J., Yamazaki, S., Tadokoro, Y., Yamazaki, A., Eto, K., Takaki, S., Takatsu, K., and Nakauchi H. Lnk negatively regulates self-renewal of hematopoietic stem cells by modifying thrombopoietin-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104:2349-54. 2007
31. Hamanaka S, Nabekura T, Otsu M, Yoshida H, Nagata M, Usui J, Takahashi S, Nagasawa T, Nakauchi H, Onodera M. Stable Transgene Expression in Mice Generated from Retrovirally Transduced Embryonic Stem Cells. *Mol Ther*. 15:560-5. 2007
32. Negishi M, Saraya A, Miyagi S, Nagao K, Inagaki Y, Nishikawa M, Tajima S, Koseki H, Tsuda H, Takasaki Y, Nakauchi H, Iawama A. Bmi1 cooperates with Dnmt1-associated protein 1 in gene silencing. *Biochem Biophys Res Commun*. 353:992-8. 2007

[学会発表](計 11 件)

1. Nakauchi H. "Cytokine Signals Modulated Via Lipid Rafts Induce Hibernation in Hematopoietic Stem Cells" International Society for Stem Cell Research 6th Annual Meeting (ISSCR). June 11-14, 2008. (Philadelphia, U.S.A.) Invited Speaker
2. Nakauchi H. "Hibernation of Hematopoietic Stem Cells in the Bone Marrow Niche" 13th Congress of the European Hematology Association. June 12-15, 2008. (Copenhagen, Denmark) Invited Speaker
3. Nakauchi H. "TGF- as a Candidate Bone Marrow Niche Signal to induce

Hematopoietic Stem Cell Hibernation." ISEH 2008 Meeting. July 10-12, 2008. (Boston, U.S.A.) Invited Speaker

4. Nakauchi H. "Silencing: Hibernation of hematopoietic stem cells in the bone marrow niche" Meeting of Barsinghausen, Sep 1-5,2008. (Germany)
5. Nakauchi H. "Hibernation of hematopoietic stem cells in the bone marrow niche" The 9th International Congress on Cell Biology (ICCB 2008) & The 20th Annual Conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology. Oct 7-10, 2008. (Seoul, Korea) Invited Speaker
6. Nakauchi H. "TGF- as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation" The 5th Nikko International Symposium 2008. Oct 25, 2008. (Shimotsuke, Tochigi Japan) Invited Speaker
7. Nakauchi H. " Generation of functional platelets from human pluripotent stem cells *in vitro*" 2008 TREMIS-AP Chapter Meeting. Nov 6-8, 2008. (Taipei) Invited Speaker
8. Nakauchi H. "Analysis of Signaling Events in hematopetic Stem Cells, a Vary rare Population in the Bone Marrow." 34th Lorne Conference on Protein Structure and Function. Feb 8-12, 2009. (Eskine Mantra Resort, Lorne Australia) , Invited Speaker
9. Nakauchi H. "HSC Hierarchy of hematopoietic stem cells." USA-Japan Cooperative Cancer Workshop "Stem Cells in Normal and Malignant Hematopoiesis". Mar 27-29, 2009. (Hawaii, USA) , Invited Speaker
10. Nakauchi H, Symposium on Molecular Mechanisms of Adult Stem cell Aging. "Heterogeneity and a hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment" May 21-24, 2009. (Reisensburg, Germany)
11. Nakauchi H, " Molecular regulation of hematopoetic stemcell self-renewal and dormancy". Internatinal PhD Program in Immuology, CellBiology and Biochemistry 2008-2009 Lecture Course. May 28, 2009

(Switzerland), Invited Speaker

〔産業財産権〕

取得状況（計7件）

発明の名称：ES細胞からの造血前駆細胞を内包する構造物、及び該構造物を用いた血球細胞の調整方法

発明者（敬称略）：中内啓光、江藤浩之、高山直也、錦井秀和、津久井弘子

出願人：国立大学法人東京大学

出願日：2007/10/04

出願番号：PCT/JP2007/001081

発明の名称：遺伝子改変による致死性表現型を持つ動物の繁殖用ファウンダー動物作製法

発明者（敬称略）：中内啓光、小林俊寛

出願人：国立大学法人東京大学

出願日：2008/02/22

出願番号：特願 2008 -042243

発明の名称：GPIb +血小板のインビトロ調製法

発明者（敬称略）：中内啓光、江藤浩之、錦井秀和、高山直也

出願人：国立大学法人東京大学

出願日：2008/03/28

出願番号：特願 2008 -085204

発明の名称：iPS細胞からの血小板の調製方法

発明者（敬称略）：中内啓光、江藤浩之、錦井秀和、高山直也、山中伸弥（京大）、高橋和利（京大）

出願人：国立大学法人東京大学、国立大学法人京都大学

出願日：2008/04/01

出願番号：特願 2008 -094584

発明の名称：GPIb +GPV+GPVI+血小板のインビトロ調製法

知財部管理番号：25B082001 -1

発明者（敬称略）：中内啓光、江藤浩之、錦井秀和、高山直也

出願人：国立大学法人 東京大学

出願日：2009/3/27

出願番号：PCT/JP2009/001383 (US only)

発明の名称：iPS細胞からの血小板の調製方法

知財部管理番号：25B083003 -1

発明者（敬称略）：中内啓光、江藤浩之、錦井秀和、高山直也、山中伸弥、高橋和利

出願人：国立大学法人 東京大学

出願日：2009/04/1

出願番号：PCT/JP2009/001542

発明の名称：ウイルス産生細胞

知財部管理番号：25B093006 -1・25B093005 -1

発明者（敬称略）：中内啓光、江藤浩之、大津真、高山直也

出願人：国立大学法人 東京大学

出願日：2009/5/15

出願番号：特願 2009 -118661

6. 研究組織

(1)研究代表者

中内 啓光(NAKAUCHI HIROMITSU)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：40175485

(2)研究分担者

大津 真(Otsu Makoto)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：30361330