

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03688

研究課題名（和文）エネルギー代謝を介した造血幹細胞の自己複製分裂・分化分裂のスイッチング

研究課題名（英文）Energy metabolism-dependent selection of self-renewal and differentiation in HSCs

研究代表者

梅本 晃正 (Umemoto, Terumasa)

熊本大学・国際先端医学研究機構・特任准教授

研究者番号：50620225

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、主に骨髄造血再生期における造血幹細胞の研究を通して、造血幹細胞の分裂後の運命決定においてはクロマチン動態の制御が極めて重要であることを見出した。さらに、還元的グルタミン代謝経路における重要な代謝酵素であるAcly、並びにミトコンドリア代謝は、ヒストンアセチル化を介して「クロマチンアクセシビリティ上昇を示す遺伝子」の発現を制御することで、造血幹細胞の増幅・維持・分化等の機能が制御されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、造血幹細胞の運命決定におけるクロマチン動態制御、及び造血幹細胞の機能制御における代謝制御の役割が明らかになり、「クロマチン動態と代謝制御」が協調して幹細胞機能を制御しているという、新たな理解を示した。これらの発見により、造血幹細胞の機能制御の理解が深まることで、再生治療・遺伝子治療を視野に入れた試験管内における幹細胞操作方法の開発や、抗癌剤投与の副作用として知られている骨髄抑制の新規治療法の開発等に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, through the study regarding HSCs during bone marrow regeneration, we found that the regulation of chromatin status in HSCs is essential to determine cell fate after HSC divisions. Moreover, we show that Acly, an essential enzyme in reductive glutamine metabolic pathway, and mitochondrial metabolism regulate expression of genes having increased accessibility within cis-elementary regions through histone acetylation.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：造血幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

血液細胞の源となる造血幹細胞は多分化能と自己複製能を併せ持つ体性幹細胞であり、造血の恒常性維持において最も中心的な役割を果たしている。造血幹細胞は骨髄移植療法では骨髄再建の主役となる細胞であるため、これまでに体外での維持・増幅が度々試みられているものの、未だ成功に至っていない。実際に、*in vitro* におけるサイトカイン刺激によって分裂を誘導すると、分裂後に分化が著しく進んでしまい、幹細胞の質・量が共に維持できず、これが造血幹細胞の試験管内増幅の最も大きな隘路の一つとなっている。従って、造血幹細胞の「自己複製分裂と分化分裂を使い分けている機構」の解明は造血幹細胞の試験管内増幅のための基盤技術の構築に大きく貢献すると考えられるが、不明な点が多い。

生体内の造血幹細胞は通常は滅多に分裂することなく静止状態で維持されている。しかし、抗癌剤投与、放射線照射等による骨髄組織損傷後は、残存した造血幹細胞が活発に盛んに自己複製分裂を繰り返すことで、幹細胞を絶やすことなく前駆細胞や機能的な分化細胞を供給し、造血組織の修復を主導することで、骨髄組織が修復される(ストレス造血)。申請者は、ストレス造血は造血幹細胞の自己複製分裂誘導の最適なモデルの一つと考え、ごく最近、*in vivo* では周辺細胞から提供される細胞外アデノシンが造血幹細胞の細胞内カルシウム( $Ca^{2+}$ )/ミトコンドリア膜電位の抑制を介して静止期維持に寄与していること(図 1A 右)、抗癌剤(5-fluorouracil: 5-FU)投与による骨髄組織損傷後は細胞外アデノシンの減少が起因となり、造血幹細胞の細胞内  $Ca^{2+}$ /ミトコンドリア膜電位が上昇し、造血幹細胞の分裂が誘導されること(図 1A 左)、

分裂時の  $Ca^{2+}$ /ミトコンドリア膜電位の適切に抑制すると、遅い速度で分裂し、その後の幹細胞性維持(自己複製分裂)に寄与すること(図 1B)、等を報告した(Umemoto et al, *J Exp Med*, 2018)。

他方、SH2B ファミリーに属するアダプター分子である Lnk の欠損は造血幹細胞の自己複製分裂の誘導に必須であるサイトカイン「Thrombopoietin (TPO)」で刺激した時のみに、その下流である Jak2/STAT pathway の活性化を亢進するため、Lnk 欠損造血幹細胞は自己複製能亢進モデルとして報告されている。実際に、Lnk 欠損マウスでは 8 週齢から 12 週齢にかけて、造血幹細胞数が約 2 倍に増えているおり、定常状態で自己複製分裂が起きていることが示唆された。さらに、興味深いことに、この時期の Lnk 欠損造血幹細胞の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度、ミトコンドリア膜電位、細胞内 ATP 量は野生型の静止期造血幹細胞と同等であった。一方で、造血幹細胞を *in vitro* で TPO で強く刺激すると Jak2/STAT pathway の活性化は誘導できるものの、細胞内  $Ca^{2+}$ 、ミトコンドリア膜電位、細胞内 ATP 量の顕著な上昇を伴って、分裂後に分化してしまうことも確認している。これらより、Lnk 欠損による自己複製分裂亢進には「TPO/Jak2/STAT pathway の活性化」以外に、エネルギー代謝の抑制的制御も重要な役割を果たすことを示唆している。

## 2. 研究の目的

申請者は“幹細胞性維持型のエネルギー代謝抑制”というブレーキを踏みながら“分裂誘導刺激”というアクセルを同時に強く踏み込んだときに造血幹細胞が自己複製分裂に至ると仮説を立て、本研究では主に TPO を中心とした分裂誘導刺激時に着目し、エネルギー

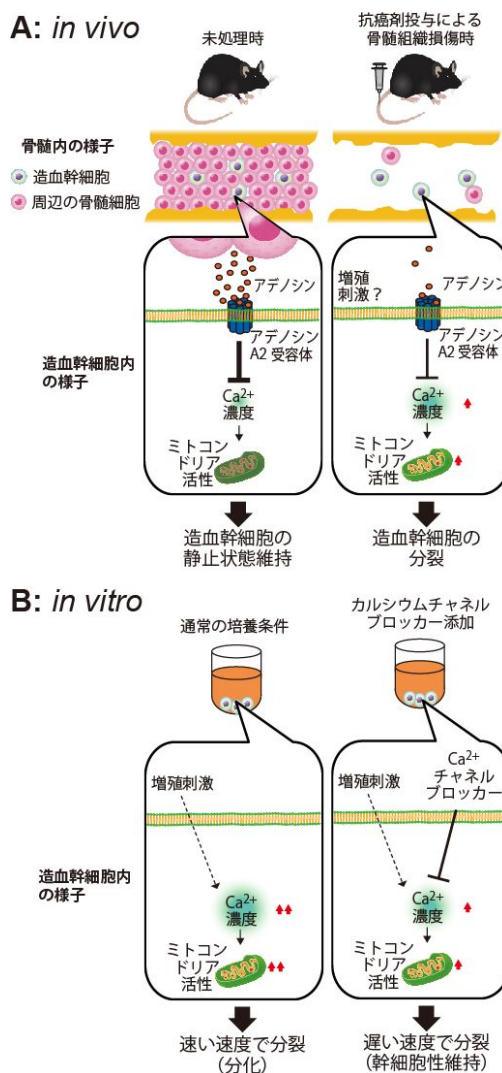


図 1.造血幹細胞の分裂制御

代謝制御が「自己複製分裂・分化分裂」のスイッチとして造血幹細胞分裂後の細胞運命に与える影響を明らかにし、造血幹細胞の自己複製分裂のメカニズムに迫ることを目的とする。さらに、自己複製分裂に必要な「分裂誘導刺激」と「エネルギー代謝制御」の条件を導き出し、*ex vivo* における造血幹細胞の維持・増幅のための基盤技術の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

(a) 自己複製分裂・分化分裂をスイッチするメカニズム：

5-FU 投与後 4 ~ 6 日後の比較的「前期」の自己複製分裂造血幹細胞と投与後 9 日目の比較的「後期」の造血幹細胞分画において、これら両群の遺伝子発現、オープンクロマチン領域を RNA-Seq、ATAC-Seq、を用いて比較し、変動している因子・経路を抽出し、自己複製分裂から分化分裂にスイッチするメカニズムを検討した。

(d) エネルギー代謝が造血幹細胞制御に与える影響の検討：

5-FU 投与後 4 ~ 6 日後の比較的「前期」の自己複製期分裂造血幹細胞と投与後 9 日目の比較的「後期」の分化分裂期造血幹細胞分画において、エネルギー代謝（ミトコンドリア代謝）が顕著に異なることを見出している。上記の傾向は、「幹細胞維持には低いミトコンドリア代謝が重要である」という一般的な認識とは相反する。従って、骨髓造血再生期の造血幹細胞のクロマチン動態と代謝、遺伝子発現制御の変化に着目して、造血幹細胞制御におけるエネルギー代謝の真の役割を考察した。

### 4. 研究成果

初めに、5-FU 投与による骨髓抑制後の骨髓再生期における造血幹細胞のクロマチンアクセシビリティの変化を検討したところ、造血幹細胞が自己複製分裂する 5-FU 投与後前期（4-6 日後）では幹細胞関連遺伝子のアクセシビリティが上昇していた一方で、5-FU 投与後後期（9-11 日後）では逆に前駆細胞関連遺伝子のアクセシビリティが上昇していた。これらは幹細胞のクロマチン動態が 5-FU 投与後前期から後期にかけて、“幹細胞型”から“前駆細胞型”に変化することを示している（図 1）。

さらに、後期の造血幹細胞が“前駆細胞型”のクロマチン動態を示しているにも関わらず、幹細胞の表現型を維持している理由を検討するために、ヒストンアセチル化に着目した。遺伝子発

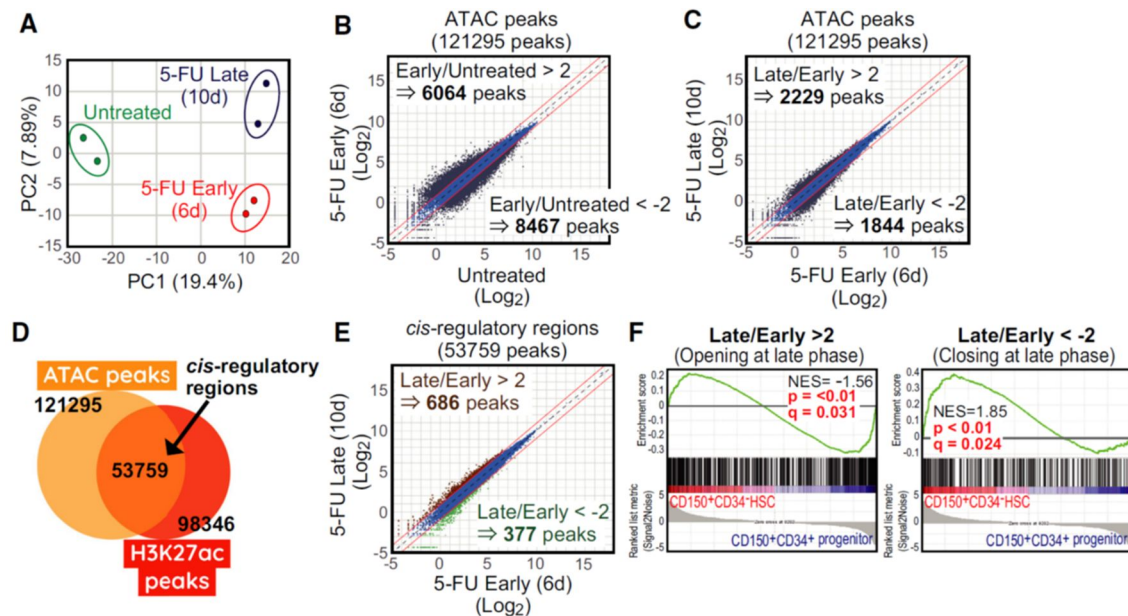


図 2. 5-FU 投与後の造血幹細胞のクロマチン動態の変化

A. PCA 解析

B and C. 未処理 vs 前期 (B) 又は前期 vs 後期 (C) の Scatter plot

D. ATAC peaks と H3K27 peaks のベン図

E. cis-regulatory regions に着目した未処理 vs 前期の Scatter plot

F. 後期で開いた (右) または閉じた (左) cis-regulatory regions に関連した遺伝子セットを用いた Gene set enrichment analysis

現が活性化するには、クロマチンアクセシビリティが上昇した後に当該領域のヒストン(H3K27)がアセチル化されることが必要である。興味深いことに、「幹細胞関連遺伝子」のアクセシビリ



「 $\Delta\Psi_m$ 上昇」を示す前期の造血幹細胞では、細胞全体でヒストンアセチル化活性が上昇しており、実際にアクセシビリティ上昇を示す領域でもヒストンアセチル化が亢進され、当該領域の関連遺伝子（幹細胞関連遺伝子等）の発現が上昇していた。一方で、「前駆細胞関連遺伝子」のアクセシビリティ上昇を示す後期の造血幹細胞では、細胞全体でヒストンアセチル化活性が抑えられており、アクセシビリティ上昇を示す領域でもヒストンアセチル化の亢進が確認されず、当該領域の関連遺伝子（前駆細胞関連遺伝子等）の発現についても顕著な上昇が確認されなかった。これらの結果から、後期の造血幹細胞は「前駆細胞関連遺伝子」のアクセシビリティ上昇を示すが、当該領域がヒストンアセチル化されないため、遺伝子発現が活性化せず、結果として幹細胞表現型が維持されることが考えられた。

さらに、5-FU 投与後の造血幹細胞におけるヒストンアセチル化制御機構として、ミトコンドリア代謝と還元的グルタミン代謝の重要因子である Acly に着目した。Acly は細胞質で Citrate から Acetyl-CoA を合成する代謝酵素であり、細胞質で合成される Acetyl-CoA はヒストンアセチル化の基質として利用される。また、ミトコンドリア代謝はトランスポーターを通じて Acly の基質である Citrate を細胞質に供給する。興味深いことに、5-FU 投与後前期の幹細胞ではミトコンドリア代謝、Citrate レベル、Acly の発現・活性化レベルが共に上昇していたが、5-FU 投与後後期の幹細胞ではこれら全てが抑制されていた。実際に、5-FU 投与後前期で Acly や mitochondrial Citrate transporter を阻害するとヒストンアセチル化レベルが減少し、造血幹細胞の増幅が抑制された。さらに、5-FU 投与後後期で低いミトコンドリア代謝下で「前駆細胞関連遺伝子」のクロマチンアクセシビリティ上昇を示す造血幹細胞において、ミトコンドリア代謝の活性化を誘導すると、Acly の発現レベル・ヒストンアセチル化レベルの上昇を伴って前駆細胞へと分化するが、この時に Acly や mitochondrial Citrate transporter を阻害すると前駆細胞への分化が阻害された。従って、本研究を通して、還元的グルタミン代謝経路における重要な代謝酵素である Acly、並びにミトコンドリア代謝は、ヒストンアセチル化を介して「クロマチンアクセシビリティ上昇を示す遺伝子」の発現を制御することで、造血幹細胞の増幅・維持・分化等の機能が制御されることを明らかにした(図2)。

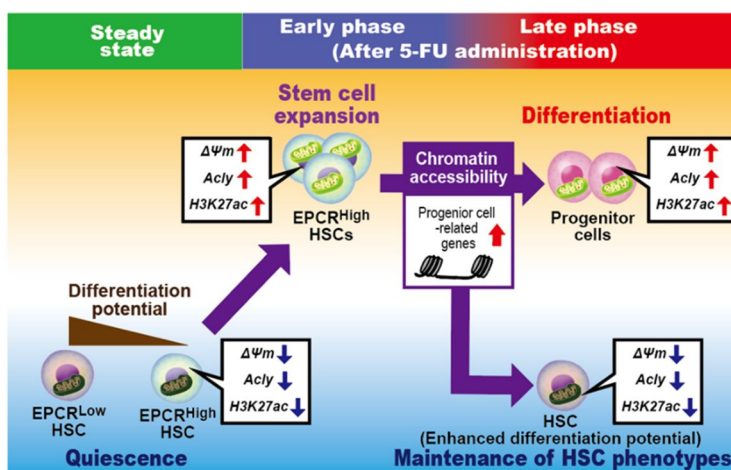


図 2. 本研究で提唱する骨髄造血再生期における造血幹細胞の機能制御機構

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hashimoto Michihiro, Umemoto Terumasa, Nakamura-Ishizu Ayako, Matsumura Takayoshi, Yokomizo Tomomasa, Sezaki Maiko, Takizawa Hitoshi, Suda Toshio	4. 巻 5
2. 論文標題 Autophagy is dispensable for the maintenance of hematopoietic stem cells in neonates	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 1594 ~ 1604
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2020002410	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Endoh Mitsuhiro, Baba Masaya, Endoh Tamie, Hirayama Akiyoshi, Nakamura-Ishizu Ayako, Umemoto Terumasa, Hashimoto Michihiro, Nagashima Kunio, Soga Tomoyoshi, Lang Martin, Schmidt Laura S., Linehan W. Marston, Suda Toshio	4. 巻 30
2. 論文標題 A FLCN-TEF3 Feedback Loop Prevents Excessive Glycogenesis and Phagocyte Activation by Regulating Lysosome Activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1823 ~ 1834.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.01.042	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukushima Tsuyoshi, Tanaka Yosuke, Hamey Fiona K., Chang Chih-Hsiang, Oki Toshihiko, Asada Shuhei, Hayashi Yasutaka, Fujino Takeshi, Yonezawa Taishi, Takeda Reina, Kawabata Kimihito Cojin, Fukuyama Tomofusa, Umemoto Terumasa, Takubo Keiyo, Takizawa Hitoshi, Goyama Susumu et al.,	4. 巻 29
2. 論文標題 Discrimination of Dormant and Active Hematopoietic Stem Cells by G0 Marker Reveals Dormancy Regulation by Cytoplasmic Calcium	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 4144 ~ 4158.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.11.061	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takahara Yuji, Nakamura-Ishizu Ayako, Tan Darren Qiancheng, Fukuda Masahiro, Matsumura Takayoshi, Endoh Mitsuhiro, Arima Yuichiro, Chin Desmond Wai Loon, Umemoto Terumasa, Hashimoto Michihiro, Mizuno Hidenobu, Suda Toshio	4. 巻 3
2. 論文標題 High mitochondrial mass is associated with reconstitution capacity and quiescence of hematopoietic stem cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 2323 ~ 2327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2019032169	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yokomizo Tomomasa, Watanabe Naoki, Umemoto Terumasa, Matsuo Junichi, Harai Ryota, Kihara Yoshihiko, Nakamura Eri, Tada Norihiro, Sato Tomohiko, Takaku Tomoiku, Shimono Akihiko, Takizawa Hitoshi, Nakagata Naomi, Mori Seiichi, Kurokawa Mineo, Tenen Daniel G., Osato Motomi, Suda Toshio, Komatsu Norio	4. 巻 216
2. 論文標題 Hlf marks the developmental pathway for hematopoietic stem cells but not for erythro-myeloid progenitors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 1599 ~ 1614
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20181399	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Umemoto Terumasa, Johansson Alban, Ahmad Shah Adil Ishtiyag, Hashimoto Michihiro, Kubota Sho, Kikuchi Kenta, Odaka Haruki, Era Takumi, Kurotaki Daisuke, Sashida Goro, Suda Toshio	4. 巻 41
2. 論文標題 ATP citrate lyase controls hematopoietic stem cell fate and supports bone marrow regeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2021109463	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fu Lingfeng, Yonemura Atsuko, Yasuda-Yoshihara Noriko, Umemoto Terumasa, Zhang Jun, Yasuda Tadahito, Uchihara Tomoyuki, Akiyama Takahiko, Kitamura Fumimasa, Yamashita Kohei, Okamoto Yuya, Bu Luke, Wei Feng, Hu Xichen, Liu Yang, Ajani Jaffer A., Tan Patrick, Baba Hideo, Ishimoto Takatsugu	4. 巻 25
2. 論文標題 Intracellular MUC20 variant 2 maintains mitochondrial calcium homeostasis and enhances drug resistance in gastric cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gastric Cancer	6. 最初と最後の頁 542 ~ 557
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10120-022-01283-z	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Y, Takeda R, Fukushima T, Mikami K, Tsuchiya S, Tamura Moe, Adachi Keito, Umemoto Terumasa, Asada S, Watanabe N, Morishita S, Imai M, Nagata M, Araki M, Takizawa H, Fukuyama T, Lamagna C, Masuda ES., Ito R, Goyama S, Komatsu N, Takaku T, Kitamura T	4. 巻 13
2. 論文標題 Eliminating chronic myeloid leukemia stem cells by IRAK1/4 inhibitors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-27928-8	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Terumasa Umemoto
2. 発表標題 Reductive Glutamine metabolism regulates self-renew and differentiation in hematopoietic stem cells during bone marrow regeneration
3. 学会等名 JSPS Core-to-Core Program Virtual Mini Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Terumasa Umemoto, Michihiro Hashimoto, Toshio Suda
2. 発表標題 Low energy metabolism contributes to the maintenace of hematopoietic stem cells.
3. 学会等名 幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Terumasa Umemoto, Michihiro Hashimoto, Toshio Suda
2. 発表標題 エネルギー代謝を介した造血幹細胞の維持機構
3. 学会等名 日本血液学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Terumasa Umemoto, Alban Johansson, Shah Adil Ishtiyahq Ahmad, Michihiro Hashimoto, Sho Kubota, Haruki Odaka, Takumi Era, Goro Sashida, Toshio Suda
2. 発表標題 還元的グルタミン代謝を介した造血幹細胞制御
3. 学会等名 幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Terumasa Umemoto, Alban Johansson, Shah Adil Ishtiyaq Ahmad, Michihiro Hashimoto, Sho Kubota, Haruki Odaka, Takumi Era, Goro Sashida, Toshio Suda
2. 発表標題 The metabolic fitness corresponding to chromatin accessibility patterns is essential for hematopoietic stem cell regulations
3. 学会等名 日本血液学会
4. 発表年 2021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
---------	---------