

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：82610

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21621

研究課題名（和文）骨髄酸素分圧の可視化と操作による造血幹細胞動態の時空間的理解

研究課題名（英文）Spatio-temporal analysis of hematopoietic stem cell dynamics through visualization and manipulation of bone marrow oxygen environment

研究代表者

田久保 圭誉（Takubo, Keiyo）

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・研究所・生体恒常性プロジェクト長

研究者番号：50502788

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：骨髄環境の酸素分圧が造血幹細胞維持や血液細胞産生を制御することが知られている。本研究では多光子レーザー顕微鏡と生体染色、遺伝学的レポーターを利用して、生体骨髄内でランドマーク付きのin vivoイメージングを可能にした。とりわけ、骨髄内の酸素分圧の分布とその変化を解析可能にした。また、骨髄の酸素分圧を局所操作する技術であるTCA法を利活用して、組織内の造血幹細胞動態や酸素分圧分布に生じる変化の有無を検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

In vivoイメージング技術は、生体臓器内の細胞の“生きざま”を直接観察する手法であり、各細胞の時空間動態や、細胞間相互作用を明らかにできる。本研究でin vivoイメージング技術をすべての血液細胞を生み出す造血幹細胞とその近傍のニッチの研究分野に導入し、酸素分圧との同時イメージングが可能となった。今後は骨髄内の細胞社会で生じる各種のイベントや、疾患・病態における変容を高い時空間解像度で検出可能になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The oxygen environment of bone marrow maintains hematopoietic stem cells and sustains blood cell production. In this study, we used multiphoton laser microscopy, intravital staining, and genetic reporter animals to enable in vivo imaging of living bone marrow with landmarks. In particular, we analyzed the oxygen distribution in the bone marrow and how it changes. Furthermore, the TCA method, a technique for local manipulation of oxygen distribution in bone marrow, was utilized to verify whether changes in hematopoietic stem cells and hematopoiesis occurred.

研究分野：幹細胞生物学、血液学

キーワード：造血幹細胞 幹細胞ニッチ 骨髄 イメージング メタボロミクス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 臓器の細胞社会の研究では、動物を生きたままの状態でご細胞の動態、運命などを経時的に観察する *in vivo* イメージング技術が重要な手法である。対象の細胞を蛍光レポーターで標識して、多光子レーザー顕微鏡で観察することで、生きた動物の臓器内の細胞の“生きざま”を直接観察する手法であり、各細胞の時空間動態や、細胞間相互作用を明らかにすることが可能である。

(2) 本手法は、すべての血液細胞を生み出す造血幹細胞の研究分野でも有用であると考えられてきた。造血幹細胞は、典型的な組織幹細胞であり、骨の内側にある骨髓に局在している。定常状態では造血幹細胞は細胞周期が静止状態にある。体内の血液細胞の需要に応じて、自己複製能や多分化能を發揮して血液細胞を産生(造血)する。*In vivo* イメージング自体の高い有用性は想定されていたものの、骨髓の細胞社会を解析するための *in vivo* イメージングが可能なほど高輝度かつ特異的に造血幹細胞を標識するレポーターやニッチのランドマークの同定法は見出されておらず、技術的なボトルネックであった。

(3) 近年研究代表者は、これを可能にするレポーターや生体染色法を見出して、いよいよ造血幹細胞の *in vivo* イメージング研究が可能と考えられる状況となった。しかし、実際に高い精度での解析を実施するためには、各種の撮像条件や、標識方法の至適化などが不可欠な状況であった。

(4) 一方、これまで研究代表者は、骨髓に住まう造血幹細胞を制御する微小環境(ニッチ)因子として、骨髓内の低い酸素分圧が重要であることを報告してきた。しかし、骨髓ニッチの酸素分布の時空間解析や、その直接的な意義の解析を可能にする技術開発はなされてこなかった。研究代表者はこれを打破するために経頭蓋薬物送達法(*transcalvarial administration*; TCA法)を開発して、骨髓ニッチを操作してその結果造血等で生じる現象を知ることができるようにしていた(引用文献)

2. 研究の目的

本研究ではこれらの要素技術や知見を組み合わせることで、骨髓ニッチの酸素分布の時空間解析を可能にする新たな技術を開発することとした。骨髓の酸素環境はフローサイトメーターや組織学的解析では検討が困難である。さらに、一般的な *in vivo* イメージングでは細胞の時空間動態は描出可能であるが、酸素分圧の分布は可視化できないため、造血幹細胞の住環境を正確に知るためには技術的ギャップがある。また、骨髓局所の酸素環境を操作する技術も存在しない。これらの結果、なぜ骨髓が低酸素環境であるのかという生物学的なメカニズムは未だ放置されている。本研究では、りん光寿命イメージング(*Phosphorescence Lifetime Imaging*; PLIM)を用いた骨髓ニッチの酸素分圧の可視化技術と局所操作技術を確立してこの問いに答えることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究ではマウス頭蓋骨骨髓の *in vivo* イメージングを中心にした解析に、TCA法やPLIMを組み合わせた研究を実施する。これらの研究アプローチによって骨髓内の酸素分圧の可視化と局所操作技術を確立し、骨髓の酸素分布を解明し、酸素動態が造血幹細胞の運命に及ぼす影響を解析する。具体的な研究項目としてはまず、(1) 骨髓の各種細胞の可視化系を確立し、(2) PLIMを行い酸素分圧分布を可視化し、さらには(3) 骨髓の酸素分圧を局所操作する技術を確立した上で(4) 造血幹細胞の動態・運命と酸素分圧との関連を解き明かすこととした。*in vivo* イメージング解析においては細胞の動態や空間配置を定量的に取得するようにした。

4. 研究成果

(1) 骨髓の各種細胞の可視化系の確立：これまでに遺伝学的に造血幹細胞を標識できるレポーターマウスでは高輝度かつ特異性の高い、*in vivo* イメージングで造血幹細胞を同定可能なモデルであることを見出している。そこで、同マウスに造血幹細胞のニッチ細胞である間葉系幹細胞を標識するマウスとを交配してニッチ細胞との空間配置や相互作用を可視化した。さらに、骨髓に存在する3種類の血管(動脈、細動脈、類洞血管)それぞれを蛍光標識抗体で同時に分類できる生体染色技術も確立できたため、これらを用いてマウス頭蓋骨骨髓を多光子レーザー顕微鏡で観察し、骨髓の各細胞の時空間動態の観察を実施することができた。

(2) PLIMによる酸素分圧分布の可視化：組織内の酸素分圧の可視化には、りん光プローブが出すりん光が、近くの酸素分子に衝突して消光するまでの時間を測定することで酸素分圧の測定が可能である。細胞膜透過性が高く *in vivo* イメージングに適した特性のりん光プローブをマウスに投与して骨髓組織内のりん光寿命を観察して酸素分圧の分布を可視化することができた。この際、単離した骨髓細胞を懸濁した培地にりん光プローブを加え、培地内の酸素分圧を変化さ

せることで、りん光寿命と実際の酸素分圧の検量線を同時に測定して、骨髓内の酸素分圧分布を定量的に理解するための基盤を整えることができた。

(3) 骨髓の酸素分圧を局所操作する技術の確立：骨髓の in vivo イメージング研究では、骨髓内の操作、例えば血流を操作する技術は研究立案時点ではこれまでなかった。研究代表者は、多光子レーザー顕微鏡のレンズ浸液への各種の薬剤添加による、骨髓内の動脈径を収縮・拡張を通じて、それに伴って骨髓内の血流供給を低下・増加する技術・TCA法を開発した(引用文献)。この際、全身の循環動態への影響を防止して、骨髓局所のみ作用できることも確認できていた。本計画ではこの方法と PLIM を併用して、骨髓局所血流の操作による酸素分圧分布への影響を検討し、実際に TCA 法を用いることで骨髓血流を調節することができ、その結果骨髓内の酸素分圧を変化することに成功した。

(4) 造血幹細胞の動態・運命と酸素分圧の関連を解き明かす：以上の(1)から(3)で用意した技術基盤を統合して、骨髓のランドマーク付きの酸素分圧分布マップを作成することができた。造血幹細胞の骨髓内の酸素分圧と、近傍の構造(ニッチ細胞や血管)との関連を明らかにすることができた。さらに、骨髓の局所酸素分圧を操作した際の造血幹細胞動態や運命についての初期データを観測した。

<引用文献>

Morikawa T, Tamaki S, Fujita S, Suematsu M, Takubo K. Identification and local manipulation of bone marrow vasculature during intravital imaging. *Sci Rep.* 10(1):6422, 2020. doi: 10.1038/s41598-020-63533-3.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Mikawa T, Shibata E, Shimada M, Ito K, Ito T, Kanda H, Takubo K, Shimada A, Lleonart ME, Inagaki N, Yokode M, Kondoh H.	4. 巻 16
2. 論文標題 Characterization of genetically modified mice for phosphoglycerate mutase, a vitally-essential enzyme in glycolysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0250856
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0250856	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 Kobayashi H, Takubo K.	4. 巻 17
2. 論文標題 A Culture Method to Maintain Quiescent Human Hematopoietic Stem Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Vis Exp	6. 最初と最後の頁 171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/61938	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 Morinaga H, Mohri Y, Grachtchouk M, Asakawa K, Matsumura H, Oshima M, Takayama N, Kato T, Nishimori Y, Sorimachi Y, Takubo K, Suganami T, Iwama A, Iwakura Y, Dlugosz AA, Nishimura EK.	4. 巻 595
2. 論文標題 Obesity accelerates hair thinning by stem cell-centric converging mechanisms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 266-271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-021-03624-x	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Kobayashi T, Nguyen-Tien D, Sorimachi Y, Sugiura Y, Suzuki T, Karyu H, Shimabukuro-Demoto S, Uemura T, Okamura T, Taguchi T, Ueki K, Kato N, Goda N, Dohmae N, Takubo K, Suematsu M, Toyama-Sorimachi N.	4. 巻 118
2. 論文標題 SLC15A4 mediates M1-prone metabolic shifts in macrophages and guards immune cells from metabolic stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A	6. 最初と最後の頁 e2100295118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2100295118	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 Karigane D, Haraguchi M, Toyama-Sorimachi N, Nishimura EK, Takubo K.	4. 巻 5966
2. 論文標題 Mitf is required for T cell maturation by regulating dendritic cell homing to the thymus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 29035
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.01.091	査読の有無 有
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 Daiki Karigane, Hidenori Kasahara, ... , Keiyo Takubo.	4. 巻 62
2. 論文標題 Detection of residual disease in chronic myeloid leukemia utilizing genomic next generation sequencing reveals persistence of differentiated Ph+ B cells but not bone marrow stem/progenitors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Leukemia & Lymphoma	6. 最初と最後の頁 679 - 687
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10428194.2020.1837366	査読の有無 有
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 Sorimachi Yuri, Karigane Daiki, Ootomo Yukako, Kobayashi Hiroshi, Morikawa Takayuki, Otsu Kinya, Kubota Yoshiaki, Okamoto Shinichiro, Goda Nobuhito, Takubo Keiyo	4. 巻 296
2. 論文標題 p38 plays differential roles in hematopoietic stem cell activity dependent on aging contexts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100563 ~ 100563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100563	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15件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 城下 郊平、小林 央、田久保 圭誉
2. 発表標題 造血幹細胞に最適化した遺伝子編集法の確立とそれに基づく代謝特性解析
3. 学会等名 第6回ゲノム編集学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kohei Shiroshita, Hiroshi Kobayashi, Keiyo Takubo
2. 発表標題 Environmental optimization to maintain the function of hematopoietic stem cells after genome editing
3. 学会等名 第18回幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shinya Fujita, Takayuki Morikawa, Yuki Sugiura, Hishiki Takako, Maiko Sezaki, Hitoshi Takizawa, Keisuke Kataoka, Makoto Suematsu, Keiyo Takubo
2. 発表標題 Non-neuronal acetylcholine in the bone marrow regulates B cell differentiation
3. 学会等名 第18回幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takayuki Morikawa, Shinya Fujita, Toshitada Yoshihara, Seiji Tobita, Keiyo Takubo
2. 発表標題 Nitric oxide-dependent vasodilation maintains physiological hypoxia and local crawling of hematopoietic stem cell in bone marrow
3. 学会等名 第18回幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takayuki Morikawa, Keiyo Takubo
2. 発表標題 Nitric oxide-dependent vasodilation maintains the physiological oxygen levels in bone marrow and allows local crawling of hematopoietic stem cells
3. 学会等名 ISEH2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林央、森川隆之、沖長あゆみ、浜野文三江、橋立智美、綿貫慎太郎、菱川大介、進藤英雄、新井文用、加部泰明、末松誠、清水孝雄、田久保圭誉
2. 発表標題 培養環境の最適化による造血幹細胞の体外での静止期維持
3. 学会等名 第16回麒麟塾
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田久保圭誉
2. 発表標題 加齢造血変化をもたらす造血幹細胞の代謝リプログラミング
3. 学会等名 第63回日本老年医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shinya Fujita, Takayuki Morikawa, Yuki Sugiura, Hishiki Takako, Maiko Sezaki, Hitoshi Takizawa, Keisuke Kataoka, Makoto Suematsu, Keiyo Takubo
2. 発表標題 Non-neuronal acetylcholine in bone marrow derives from hematopoietic cells and regulates B cell dynamics
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kohei Shiroshita, Hiroshi Kobayashi, Keisuke Kataoka, Keiyo Takubo
2. 発表標題 造血幹細胞機能と特性維持に最適化した新規遺伝子編集法
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shintaro Watanuki, Hiroshi Kobayashi, Masamichi Yamamoto, Keiyo Takubo
2. 発表標題 Real-Time ATP Analysis Reveals Thymidine Requirement of Quiescent Hematopoietic Stem Cells
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keiyo Takubo
2. 発表標題 Single-cell, real-time analysis of hematopoietic stem cell metabolism during aging
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 綿貫慎太郎、小林央、田久保圭誉
2. 発表標題 造血幹細胞の解糖系代謝可塑性と造血制御
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田久保圭誉
2. 発表標題 骨髄の生理的低酸素環境の形成機構と造血幹細胞制御
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田久保圭誉
2. 発表標題 単一細胞リアルタイム代謝解析に基づく加齢造血幹細胞の代謝変化の解析
3. 学会等名 CCVAA2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林央、田久保圭誉
2. 発表標題 骨髄内環境を再現した造血幹細胞培養とその応用
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立国際医療研究センター研究所生体恒常性プロジェクト公式サイト https://takubolab.com/
--

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			
英国	King's College London			