

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790299

研究課題名（和文） DNA 障害応答系によるヒト造血幹細胞維持機構の解明

研究課題名（英文） DNA damage response in human hematopoietic stem cell

研究代表者

八幡 崇（YAHATA TAKASHI）

東海大学・医学部・講師

研究者番号：10398753

研究成果の概要（和文）：自己複製能を有する幹細胞といえども、恒久的にその能力を維持するわけではない。外的あるいは内的な老化誘導要因の蓄積により、幹細胞の制御機構は破綻する。幹細胞老化であり、臓器不全やがん幹細胞化の原因となる。本研究では、移植によってヒト造血幹細胞（HSC）の活性酸素種の産生を亢進し、DNA 障害を引き起こすことを見いだした。さらに、この酸化的 DNA 障害は、HSC の自己複製能の低下、すなわち早期老化を誘導し、造血再生能の破綻の主因となることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Stem cells of highly regenerative organs including blood are susceptible to endogenous DNA damage caused by both intrinsic and extrinsic stress. In this study, we demonstrate that the serial transplantation of human HSCs into immunodeficient mice triggers replication stress that induces incremental elevation of intracellular reactive oxygen species (ROS) levels and the accumulation of persistent DNA damage within the human HSCs. The study reveals that ROS play a causative role for DNA damage and the regulation of ROS have a major influence on human HSC aging.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：再生医学

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞（HSC）は個体の一生にわたって分化・成熟した機能細胞を供給し続けると同時に、自己複製的細胞分裂により自己と同質の多能性を保持した幹細胞集団を形成することで造血系の恒常性を維持している。し

かし、自己複製能を有する幹細胞といえども、恒久的にその能力を維持するわけではない。紫外線などの外的、あるいは細胞活動による活性酸素種などの内的な老化誘導要因の蓄積により、幹細胞の自己複製と増殖・分化の制御機構は破綻する。いわゆる幹細胞老化と

呼ばれるものであり、臓器不全やがん幹細胞化の原因となる。特に再生医療において問題となるのは、白血病などの難治性血液疾患に施行される骨髄移植において移植された HSC が盛んな増殖反応をともなう造血再生を行わなければならない、通常休止期にある HSC にとって大きな負担となることである。その結果、自己複製能の低下、すなわち、幹細胞の寿命短縮を引き起こし、最終的には組織再生機構の破綻に至る危険性が增大する。このことは、生着不全や白血病再発等の大きな要因となる。したがって、より安全で有効な再生医療法の確立のためには、幹細胞の組織再生能力を最大限に引き出すことと同時に、幹細胞の再生反応にともなうストレスを可能な限り軽減させ、幹細胞老化を克服する戦略の確立が重要である。

2. 研究の目的

ヒト造血幹細胞 (HSC) の老化を DNA 障害の蓄積による自己複製能の低下として捉え、HSC に DNA 障害が誘導される原因の解明と、DNA 障害応答系による造血再生能維持における役割を明確にするとともに、ヒト HSC における DNA 障害応答系と白血病幹細胞の発生との関係を明らかにすることにより、再生医療の最適化と白血病幹細胞の発生機序の解明を目指す。

3. 研究の方法

ヒト HSC は臍帯血より分離したものを使用した。さらに、ヒト HSC である CD34+CD38- 細胞は細胞分離装置を利用して回収した。回収した HSC は半致死量の放射線を照射した NOG マウスに移植した。経時的に末梢血細胞および骨髄細胞を回収し、HSC の老化機構を解析した。細胞の DNA 障害の程度は、 γ H2AX 染色による陽性個数の計測により判定した。また、酸化ストレスについては、フローサイトメーターにて測定した。

4. 研究成果

(1) ヒト HSC は骨髄ニッチで休止期状態にある

重度免疫不全マウスである NOD/SCID/IL-2Rgc^{mut1} (NOG) マウスに臍帯血由来のヒト CD34⁺細胞を移植すると、マウス骨髄内にヒト造血系が再構築される。この SCID マウスに生着し、ヒト造血系を再構築する幹細胞は SCID-repopulating cell と定義され、ヒト HSC の生体内動態を最も良く再現したモデル実験系である。我々はこれまでにこの実験系を利用して、ヒト HSC が骨髄内で多分化能と自己複製能を示すこと、ヒト HSC は CD34⁺CD38⁻細胞集団に濃縮されることなどの知見を得てきた。しかし、長期造血再構築を担うヒト HSC が、骨髄内ニッチにおいてどの

ような状態で存在し幹細胞活性を維持しているのかについては明らかにされていなかった。そこで我々は、CD34⁺細胞を NOG マウスに移植し、生着したヒト HSC の細胞周期を解析したところ、CD34⁺CD38⁻細胞集団は休止期状態にあるということを見いだした。さらに、骨髄内 CD34⁺細胞を CD38 抗原の発現強度を指標として分離し、2 次移植を行ったところ、休止期にある CD34⁺CD38⁻細胞のみが 2 次移植された。すなわち、ヒト HSC は、臍帯血幹細胞やヒト骨髄幹細胞と同様にマウス骨髄内においても CD34⁺CD38⁻細胞集団に濃縮され、その幹細胞活性は休止期状態にあることにより維持されているということが明らかとなった。

(2) 移植ストレスにより HSC の早期老化が誘導される

一方、ヒト HSC を免疫不全マウスに移植し、ヒト造血系を再構築させた後、再度別個体に移植を繰り返すと休止期 HSC の増殖反応が誘導され、再び休止期に戻るといった動態を示すことが明らかとなった。このとき、移植前、1 次移植、2 次移植の各段階にある HSC を回収し、細胞老化マーカーの発現を調べた結果、細胞老化マーカーである p16INK4 などの発現が亢進することが示された。この p16INK4 などの発現が高い状態にあるヒト HSC は、試験管内における増殖因子応答性や骨髄移植による造血再生能が著しく低下していた。すなわち、再生反応の繰り返しにより、HSC がいわゆる早期老化状態に陥っていることが明らかとなった。

(3) 早期老化状態の HSC には DNA 障害の蓄積が認められる

DNA 損傷は、不可逆的な細胞周期の停止状態、いわゆるセネッセンスを誘導することから、細胞老化の主因として注目されている。そこで、再生反応による幹細胞の早期老化の原因を明らかにするために、移植前、1 次移植、2 次移植の各段階における骨髄から CD34+CD38-細胞を回収し、DNA 損傷に着目した解析を行なった。その結果、移植の進行にともなって γ H2AX を指標とした DNA 損傷が、特に 2 次移植骨髄に生着している CD34+CD38-細胞において顕著に蓄積していることを見いだした。この DNA 損傷の蓄積は CD34+CD38+の前駆細胞集団には認められなかった。

(4) 酸化ストレスが DNA 障害の要因である

強く DNA 障害を受けている CD34+CD38-HSC 細胞は、細胞内活性酸素種 (ROS) のレベルが上昇していた。そこで、ROS の増加と DNA 損傷の関係を明確にするために、試験管内において CD34+CD38-細胞に

L-Buthionine-sulfoximine (BSO)を添加して培養することにより細胞内ROSの蓄積を誘導したところ、BSOの濃度依存的にDNA損傷が引き起こされた。DNA損傷によってヒトHSCにおけるp16INK4aなどのCDKIの発現が亢進し、細胞増殖停止状態に陥っていた。さらに、ROSによるDNA損傷を受けたヒトHSCの造血再生能が低下していた。一方、ROSによるDNA損傷は、抗酸化剤であるN-Acetyl-L-Cysteine (NAC)の添加によって抑制され、造血再生能も回復した。重要なことに、複数回移植実験系においてNACをマウスに投与することにより、ヒトHSCにおけるDNA損傷の蓄積が回避され、非常に高い自己複製能を維持するということが明らかにした。以上の結果から、長期造血再生反応を繰り返すと、ヒトHSC内のROSレベルが上昇し、DNA損傷の蓄積によって誘導される細胞老化に至るために、ヒトHSCが造血再生能を失うということを見いだした。さらに、抗酸化剤の投与によって幹細胞活性の低下を抑制させることが可能であることを明らかにした。本剤はすでに承認済みの薬剤であり、その再生医療への応用が期待される。

(5) 本研究の臨床的意義

さらにわれわれは、異種移植系で得られた知見の生理的、臨床的意義を明確にするため、ヒト検体を用いた検討を行った。本学倫理委員会において承認された研究計画に同意を得て採取された高齢者(72 to 84歳; median: 79歳, $n = 10$)、臍帯血移植を含めたHSC移植患者(34 to 56歳; median: 48歳, $n = 8$)、さらに移植患者と同年齢層(44 to 56歳; median: 50歳, $n = 6$)の骨髓液からCD34+CD38-HSC細胞を回収し、異種移植系と同様の検討を行った。その結果、高齢者のみならず移植患者から得られたHSCでは優位に高いレベルのROSが検出され、DNA損傷の蓄積が認められた。さらに、HSC数の減少とともに免疫不全マウスでの造血再構築能も顕著に低下していた。興味深いことに、30~50歳の患者に臍帯血移植を施行後半年から2年間経過した骨髓細胞からHSCを回収し解析したところ、同年代の健常人由来HSCに比べて、幹細胞数の低下、酸化的DNA障害の蓄積、骨髓再生能の低下が著しいことを見いだした。すなわち、臍帯血(0歳児)のHSCにもかかわらず、移植後のわずかな期間でその幹細胞活性が著しく低下していることを明らかにした。以上の結果から、長期造血再構築を維持する過程で生じるストレスは、異種移植系のみならず、ヒトの加齢や移植においてもHSCの酸化的DNA損傷の蓄積を誘導し、ヒトHSCの造血再生能の低下の原因となると推察された。このことは、移植患者が再発した場合に化学療法に対する造血

障害が強く引き起こされる原因となると考えられる。また、本年度の米国血液学会においても同様の現象が複数の施設で報告され、幹細胞移植における克服すべき課題となっており、本研究の臨床的意義は大きいものと考えられる。

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 3件)

1. Yahata T, Takanashi T, Muguruma Y, Ibrahim AA, Matsuzawa H, Uno T, Sheng Y, Onizuka M, Ito M, Kato S, Ando K. Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells. **Blood**. 2011;118(11):2941-50. 査読有り
2. Muguruma Y, Matsushita H, Yahata T, Yumino S, Tanaka Y, Miyachi H, Ogawa Y, Kawada H, Ito M, Ando K. MDS stem cells suppress normal hematopoiesis by niche invasion and microenvironment disruption. **Haematologica**. 2011; 96(4):543-51. 査読有り
3. Nakao N, Nakayama T, Yahata T, Muguruma Y, Miyata Y, Naoe T. Adipocyte-derived mesenchymal stem cells facilitate hematopoiesis in vitro and in vivo: advantages over bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Am J Pathol**. 2010; 117(2):547-54. 査読有り

[学会発表] (計 4件)

1. Abd Aziz Ibrahim, Takashi Yahata, Tomomi Takanashi, Toshio Miyata, and Kiyoshi Ando. Activation of Fibrinolytic Pathway Using a Novel Small Molecule Enhanced Hematopoietic Regeneration. 第73回日本血液学会総会、名古屋(名古屋国際会議場)、2011年10月14日
2. Hiromichi Matsushita, Takashi Yahata, Yoshihiko Nakamura, Yin Sheng, Yukari Muguruma, Hideyuki Matsuzawa Tomoko Uno, Tomomi Takanashi, Tadayuki Sato, Masayuki Tanaka, Hideki Hayashi, Makoto Onizuka, Yoshiaki Ogawa, Hayato Miyachi, Kiyoshi Ando. APL mice model using PML-RARA-transduced CD34-positive hematopoietic cells from human cord blood. 第73回日本血液学会総会、名古屋(名古屋国際会議場)、2011年10月16日
3. Yukari Muguruma, Takashi Yahata, Shizu Yumino, Yin Sheng, Katsuto

Hozumi, Kiyoshi Ando. Notch signals regulate hematopoietic homeostasis through osteoblastic niche maintenance. 第72回日本血液学会総会、神奈川 (パシフィコ横浜)、2010年9月24日

4. Takashi Yahata, Tomomi Takanashi, Hideyuki Matsuzawa, Yin Sheng, Tomoko Uno, Makoto Onizuka, Shunichi Kato, Kiyoshi Ando. Accumulation of DNA-damage limits the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells. 第72回日本血液学会総会、神奈川 (パシフィコ横浜)、2010年9月24日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八幡 崇 (YAHATA TAKASHI)
東海大学・医学部・講師

研究者番号：10398753

(2) 連携研究者

安藤 潔 (ANDO KIYOSHI)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：70176014