

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24249056

研究課題名(和文) 骨髄造血幹細胞ニッチの構造と機能の解明

研究課題名(英文) Identification of human bone marrow niche to support HSCs

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は骨髄ニッチ細胞を基本から見直し、以前にTGF-betaシグナルが造血幹細胞のニッチ因子であることを同定した(Yamazaki et al., 2009. Blood)その研究成果により骨髄に存在する非髄鞘シュワン細胞がTGF-betaを活性化し造血幹細胞に受け渡していることで造血幹細胞の休眠状態と未分化性を維持しており、骨髄ニッチを構成する1つの細胞であることを報告した(Yamazaki et al., 2011. Cell)。またヒト骨髄環境においてもマウスと同様な機能が存在することも確認している(Kimura et al., Unpublished data)。

研究成果の概要(英文)：This project describes identification of human bone marrow niche to support HSCs. We hypothesized that identification of BM niche leads us to manipulate the function of human HSPCs in vivo and in vitro. Given that TGF-beta induces human HSPC hibernation, we analyzed the area where TGF is activated. Our result clearly showed that GFAP+ cells activate TGF and induce hibernation of human HSPCs in mouse BM. These findings were confirmed by the fact that nerve denervation reduces the number of human HSPCs in human BM. Furthermore, We first report suggesting an association between neural and hematopoietic systems. In this paper, we first described an innovative strategy to generate large numbers of HSCs from pluripotent stem cells. More specifically, we established in vivo differentiation system generating fully functional HSCs from mouse induced pluripotent stem cells. Using this system, we also succeeded in generating human HSCs from human iPSCs.

研究分野：再生医療

キーワード：骨髄ニッチ TGF-beta 休眠状態

#### 1. 研究開始当初の背景

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おり、幹細胞生物学は再生医療のみならず、病態の解明、創薬、毒性試験など21世紀の医学に極めて大きな影響を与える重要な医学研究領域である。申請者は約20年前より人工臓器や臓器移植に代わる、より本質的な医療として臓器再生を考え、その鍵を握る細胞として幹細胞を研究の対象とし、造血幹細胞をモデルとして幹細胞生物学の研究を続けてきた。現在までに我々がこれまでに積み重ねてきた成果から同定してきた骨髄造血幹細胞ニッチ関連分子と、組織標本を対象としたFACSに例えられるArrayScan、機能アッセイとしてのiPS細胞技術や発生工学的手法を駆使することにより骨髄造血幹細胞ニッチを詳細な方法で同定できると考えるに至り研究を行うことにした。

#### 2. 研究の目的

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へと変換させるため、新しい方法論を開発導入しながら研究を進めてきた。ごく最近、FACSで高度に純化した造血幹細胞の生化学的解析と骨髄組織切片の免疫染色をArrayScanで解析することにより、骨髄中のグリア細胞であるnon-myelinating Schwann細胞が造血幹細胞ニッチのコンポーネントの一つであることを明らかにした。本プロジェクトでは申請者らがこれまで集積してきた技術・知見を集約することにより骨髄造血幹細胞ニッチの本態を分子レベルで解明し、造血幹細胞の分化と自己複製、細胞周期と冬眠、老化、数の制御など、幹細胞生物学の根幹となる課題の解明のための知見を得ることを目指した。

#### 3. 研究の方法

まず、我々は骨髄中の神経系細胞が造血幹細胞であることを同定したことから、造血幹細胞の細胞周期や未分化性維持が生体内の概日時計により制御されているのではないかと仮説を立て概日時計制御因子であるBmal1欠損マウスにおける造血幹細胞機能を解析した。また、マウスで得られた知見からヒト骨髄中における造血幹細胞ニッチの存在も順天堂大学との共同研究により解析した。また本課題研究を進めていくにつれて、骨髄ニッチ環境が放出するタンパク質では栄養成分が造血幹細胞の重要な因子であることが確認されたことから、その解析を行った。

#### 4. 研究成果

Bmal1は生体内の概日時計を制御する中心的な分子である。近年、我々が同定した骨髄シユワン細胞や概日時計遺伝子欠損マウスの解析から概日時計における造血幹細胞の影響が考えられてきた。しかし、我々はBmal1欠損マウスを解析したことで造血幹細胞の表現系、すなわち、未分化性や血球分化に関して野生型マウスの造血幹細胞と比較して差が認められなかった。この結果から、概日時計の変化は造血幹細胞に影響を与えないことと断定した。(Ieyasu et al., 2014)。

ヒト骨髄中の造血幹細胞のニッチ細胞を同定することを目的として、健康人ヒト骨髄組織を用いて解析した結果、マウスと同様に神経細胞と血管細胞が混じり合う領域にヒト造血幹細胞が存在することが明らかとなった。さらに、この領域には活性化TGF-betaが存在しており、ヒト造血幹前駆細胞の細胞周期を制御していることが明らかになった。

我々は、本プロジェクトの実験結果と経験から、多能性幹細胞からの造血幹細胞への誘導方法を開発した。具体的には、造血幹細胞の発生とホーミング能力を利用することにより、テラトーマから造血幹細胞を発生させ、骨髄にホーミングした造血幹細胞を分取しその細胞の機能が骨髄再構築能を有する細胞であることを明確に証明した(Suzuki et al., 2013)。

さらに、我々は3年間の研究成果により、造血幹細胞の根本となる問題点を明らかにし、今後の課題を得た。

#### 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 46件)

1. Sato A, Nishida C, Sato-Kusubata K, Ishihara M, Tashiro Y, Gritli I, Shimazu H, Munakata S, Yagita H, Okumura K, Tsuda Y, Okada Y, Tojo A, Nakauchi H, Takahashi S, Heissig B, Hattori K. Inhibition of plasmin attenuates murine acute graft-versus-host disease mortality by suppressing the matrix metalloproteinase-9-dependent inflammatory cytokine storm and effector cell trafficking. *Leukemia*. 2015;29(1):145-56. doi: 10.1038/leu.2014.151. PubMed PMID: 24791857. 査読有
2. Nakauchi Y, Yamazaki S, Napier SC, Usui J, Ota Y, Takahashi S, Watanabe N, Nakauchi H. Effective

- treatment against severe graft-versus-host disease with allele-specific anti-HLA monoclonal antibody in a humanized mouse model. *Exp Hematol*. 2015;43(2):79-88 e1-4. doi: 10.1016/j.exphem.2014.10.008. PubMed PMID: 25448490. 査読有
3. Ishigaki T, Zaike Y, Nojima M, Kobayashi S, Ohno N, Uchimarui K, Tojo A, Nakauchi H, Watanabe N. Quantification of adult T-cell leukemia/lymphoma cells using simple four-color flow cytometry. *Clin Chem Lab Med*. 2015;53(1):85-93. doi: 10.1515/cclm-2014-0183. PubMed PMID: 25060346. 査読有
4. Iriguchi S, Kikuchi N, Kaneko S, Noguchi E, Morishima Y, Matsuyama M, Yoh K, Takahashi S, Nakauchi H, Ishii Y. T-cell-restricted T-bet overexpression induces aberrant hematopoiesis of myeloid cells and impairs function of macrophages in the lung. *Blood*. 2015;125(2):370-82. doi: 10.1182/blood-2014-05-575225. PubMed PMID: 25349175; PMCID: 4300389. 査読有
5. Yamazaki S, Nakauchi H. Bone marrow Schwann cells induce hematopoietic stem cell hibernation. *Int J Hematol*. 2014;99(6):695-8. doi: 10.1007/s12185-014-1588-9. PubMed PMID: 24817152. 査読有
6. Ochi K, Takayama N, Hirose S, Nakahata T, Nakauchi H, Eto K. Multicolor staining of globin subtypes reveals impaired globin switching during erythropoiesis in human pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med*. 2014;3(7):792-800. doi: 10.5966/sctm.2013-0216. PubMed PMID: 24873860; PMCID: 4073826. 査読有
7. Nakamura S, Takayama N, Hirata S, Seo H, Endo H, Ochi K, Fujita K, Koike T, Harimoto K, Dohda T, Watanabe A, Okita K, Takahashi N, Sawaguchi A, Yamanaka S, Nakauchi H, Nishimura S, Eto K. Expandable megakaryocyte cell lines enable clinically applicable generation of platelets from human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2014;14(4):535-48. doi: 10.1016/j.stem.2014.01.011. PubMed PMID: 24529595. 査読有
8. Miyagi S, Koide S, Saraya A, Wendt GR, Oshima M, Konuma T, Yamazaki S, Mochizuki-Kashio M, Nakajima-Takagi Y, Wang C, Chiba T, Kitabayashi I, Nakauchi H, Iwama A. The TIF1beta-HP1 system maintains transcriptional integrity of hematopoietic stem cells. *Stem Cell Reports*. 2014;2(2):145-52. doi: 10.1016/j.stemcr.2013.12.008. PubMed PMID: 24527388; PMCID: 3923190. 査読有
9. Matsunawa M, Yamamoto R, Sanada M, Sato-Otsubo A, Shiozawa Y, Yoshida K, Otsu M, Shiraishi Y, Miyano S, Isono K, Koseki H, Nakauchi H, Ogawa S. Haploinsufficiency of Sf3b1 leads to compromised stem cell function but not to myelodysplasia. *Leukemia*. 2014;28(9):1844-50. doi: 10.1038/leu.2014.73. PubMed PMID: 24535406. 査読有
10. Lai CY, Yamazaki S, Okabe M, Suzuki S, Maeyama Y, Iimura Y, Onodera M, Kakuta S, Iwakura Y, Nojima M, Otsu M, Nakauchi H. Stage-specific roles for CXCR4 signaling in murine hematopoietic stem/progenitor cells in the process of bone marrow repopulation. *Stem Cells*. 2014;32(7):1929-42. doi: 10.1002/stem.1670. PubMed PMID: 24510783. 査読有
11. Ieyasu A, Tajima Y, Shimba S, Nakauchi H, Yamazaki S. Clock gene Bmal1 is dispensable for intrinsic properties of murine hematopoietic stem cells. *J Negat Results Biomed*. 2014;13:4. doi: 10.1186/1477-5751-13-4. PubMed PMID: 24606809; PMCID: 4016489. 査読有

12. Hosoi M, Kumano K, Taoka K, Arai S, Kataoka K, Ueda K, Kamikubo Y, Takayama N, Otsu M, Eto K, [Nakauchi H](#), Kurokawa M. Generation of induced pluripotent stem cells derived from primary and secondary myelofibrosis patient samples. *Exp Hematol*. 2014;42(9):816-25. doi: 10.1016/j.exphem.2014.03.010. PubMed PMID: 24859480. 査読有
13. Yamamoto R, Morita Y, Ooehara J, Hamanaka S, Onodera M, Rudolph KL, Ema H, [Nakauchi H](#). Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. *Cell*. 2013;154(5):1112-26. doi: 10.1016/j.cell.2013.08.007. PubMed PMID: 23993099. 査読有
14. Suzuki N, Yamazaki S, Yamaguchi T, Okabe M, Masaki H, Takaki S, Otsu M, [Nakauchi H](#). Generation of engraftable hematopoietic stem cells from induced pluripotent stem cells by way of teratoma formation. *Mol Ther*. 2013;21(7):1424-31. doi: 10.1038/mt.2013.71. PubMed PMID: 23670574; PMCID: 3705943. 10.1371/journal.pone.0073532. PubMed PMID: 24086284; PMCID: 3781120. 査読有
15. Nakajima-Takagi Y, Osawa M, Oshima M, Takagi H, Miyagi S, Endoh M, Endo TA, Takayama N, Eto K, Toyoda T, Koseki H, [Nakauchi H](#), Iwama A. Role of SOX17 in hematopoietic development from human embryonic stem cells. *Blood*. 2013;121(3):447-58. doi: 10.1182/blood-2012-05-431403. PubMed PMID: 23169777. 査読有
16. Kon A, Shih LY, Minamino M, Sanada M, Shiraishi Y, Nagata Y, Yoshida K, Okuno Y, Bando M, Nakato R, Ishikawa S, Sato-Otsubo A, Nagae G, Nishimoto A, Haferlach C, Nowak D, Sato Y, Alpermann T, Nagasaki M, Shimamura T, Tanaka H, Chiba K, Yamamoto R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Nakamaki T, Ishiyama K, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Chiba S, Mori H, [Nakauchi H](#), Koeffler HP, Aburatani H, Haferlach T, Shirahige K, Miyano S, Ogawa S. Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. *Nat Genet*. 2013;45(10):1232-7. doi: 10.1038/ng.2731. PubMed PMID: 23955599. 査読有
- [学会発表](計 20件)
- [Hiromitsu Nakauchi](#), Japan-US Hematology conference March 16-18, 2015 Hawaii, U.S. "Myeloid-biased hematopoiesis in aged mouse bone marrow"
- [Hiromitsu Nakauchi](#) Gordon Research Conference February 15-20, 2015 Ventura Beach Marriott, Ventura, CA. US. "The Stem Cell Niche"
- [Hiromitsu Nakauchi](#), JST-CIHR Epigenetics F2F Meeting, October 29, 2014 Toronto, Canada "In vivo generation of hematopoietic stem cells from iPSCs"
- [Hiromitsu Nakauchi](#), Till & McCulloch Meetings, October 29, 2014 Ottawa, Canada. "Single cell transplantation and clonal analysis of hematopoietic stem cells: Exploring heterogeneity and hierarchy"
- [Hiromitsu Nakauchi](#), Gordon Research Conference, Apr 25, 2013. Les

Diablerets, Switzerland. “ Novel non-stepwise early differentiation pathways of HSCs revealed by 5-lineage in vivo tracing ”

Hiromitsu Nakauchi, 2013 USA-Japan Science Conference, Mar 25, 2013. Maui, Hawaii. “ In Vivo Clonal Analysis of Hematopoietic Stem Cells Unveils Novel Myeloid Bypass Differentiation Pathways ”

中内啓光、日本分子生物学会シンポジウム 2013年12月4日、兵庫、 Exploring heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment

Hiromitsu Nakauchi, Cold Spring Harbor Asia Conferences, Dec 6, 2012. Suzhou, China. “ Non-myelinating Schwann cells in the mouse bone marrow niche maintain hematopoietic stem cell hibernation through TGF-signaling ”

Hiromitsu Nakauchi, Joint meeting of ISD and NIRM, Nov 8, 2012. Amsterdam, Netherland. “ Rat-mouse interspecific chimeras for study of organogenesis and elucidation of xenogenic barrier ”

Hiromitsu Nakauchi, ESGCT/SFTCG Congress, Oct 28, 2012. Versailles, FRA. “ Glial cell regulation of hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche ”

Hiromitsu Nakauchi, The University of Edinburgh, Sep 5, 2012. Edinburgh,

England. “ Hibernation of Hematopoietic Stem Cells in the Bone Marrow Niche ”

Hiromitsu Nakauchi, EMBL Conference, Stem Cells in Cancer and Regenerative Medicine, Aug 31, 2012. Heidelberg, Germany. “ Stem Cell Niche and TGF-beta signaling ”

Hiromitsu Nakauchi, The Babraham Institute, Aug 20, 2012. Cambridge, England. “ iPS technology and its potential for future medicine ”

Hiromitsu Nakauchi, University of Zurich, Aug 16, 2012. Zurich, Switzerland. “ Stem cell biology and its potentials for future medicine ”

Hiromitsu Nakauchi, University of Geneva Hospital, Aug14, 2012. Geneva, Switzerland. “ iPS technology and its potential for future medicine ”

Hiromitsu Nakauchi, The Sanger Institute, Jul 24, 2012. Cambridge, England. “ iPS technology and its future therapeutic potentials ”

Hiromitsu Nakauchi, Lecture Theatre, Department of Biochemistry, Cambridge Stem Cell Club, Jul 12, 2012. Cambridge, England. “ Generation of functional organs from pluripotent stem cells ”

Hiromitsu Nakauchi, ISSCR 10<sup>th</sup> Annual Meeting, Jun 15, 2012. Yokohama, Japan. “ Generation of Functional

organs from pluripotent stem cells:  
Toward the next generation of  
regenerative medicine”

Hiromitsu Nakauchi, Wellcome Trust  
Centre for Stem Cell Research,  
University of Cambridge, May 24, 2012.  
Cambridge, England. “ Isolation,  
Clonal Characterization and  
Hibernation of Hematopoietic Stem  
Cells ”

Hiromitsu Nakauchi, The 5th Dutch  
Society for Stem Cell Research Meeting  
(DSSCR), April 13, 2012. Amsterdam,  
Holland. “ iPS technology and its  
future therapeutic potentials ”

〔図書〕(計 2件)

中内啓光 編集) 南山堂、幹細胞研究と  
再生医療、2013、238

中内啓光 監修)清田純 編集)羊土社、  
直伝! フローサイトメトリー、2013、278

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: 造血幹細胞を減少させる組成物および  
その製造法

発明者: 中内啓光、山崎聡、田矢祐規

権利者: 国立大学法人東京大学

種類: 特許

番号: 2014-237874

出願年月日: 2014年11月25日

国内外の別: 国内

取得状況(計 0件)

## 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

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: