

課題番号 : 26指001
研究課題名 : 幹細胞ニッチの低酸素制御の研究
主任研究者名 : 田久保 圭誉

キーワード : 造血幹細胞、幹細胞ニッチ、低酸素応答、メタボロミクス

研究成果 :

臓器幹細胞は自己複製能と多分化能を持つ細胞集団で、多くの臓器の組織発生や恒常性維持のために機能する。また、再生医療に不可欠の細胞ソースとして人為的な操作・増殖技術の確立は重要である。幹細胞性を規定する転写因子ネットワークは、幹細胞に特有の生物現象(自己複製、非対称分裂、静止期維持、分化、遊走、ニッチへのホーミングなど)を実行するためのエネルギーを供給する代謝プログラムを起動する。近年、主任研究者らは幹細胞特有の代謝特性とそれを維持する分子機構が存在していることを低酸素環境である骨髄に存在する造血幹細胞の解析から見出してきた。しかし、その全貌や、各種病態における寄与や機能、標的治療・診断技術開発の可能性は不明である。本研究課題においては定常状態とストレス下の造血幹細胞における代謝特性とそれを維持する分子機構を解明することでこれらの問題の解決を図り、新規の診断・治療法に寄与しうる知見を見出すことを目指すものである。本年度は主に下記の2つの研究成果を得た:

1) 全身性の細菌感染時に造血幹・前駆細胞とそのニッチが多様に障害されることを見出し、その分子機構を解明した。これらの造血変容を引き起こす分子機構として、原核生物が2分子のGTPから合成する代謝産物cyclic-di-GMPの重要性を見出し、宿主側の受容体であるSTINGを介したシグナルの活性化が中心的なシグナルであることを見出した。cyclic-di-GMPのマウスへの投与によって、下記に示す造血変容が引き起こされ、これらの変容はSTING欠損マウスにおいてキャンセルされた。まず、骨髄の造血幹細胞は定常状態における細胞周期が静止期から、細胞周期に進入して活発に増殖している状態となる。これらのcyclic-di-GMPに曝露された造血幹細胞を致死量放射線照射したレシピエントマウスへと移植すると、末梢血への寄与と骨髄を再構築する能力を失っていた。細胞内代謝特性に関してはcyclic-di-GMPは解糖系を亢進させて、その一方細胞内のATP量は減少していた。一方、骨髄の多能性前駆細胞はcyclic-di-GMP投与によって活発に増殖し、骨髄から遊走して末梢血や脾臓に出現する。そして脾臓においては髄外造血を行う。前駆細胞においても幹細胞と同様の代謝変動を呈していた。血球分化能に目を向けると、多能性前駆細胞は骨髄球系への分化が亢進する一方、赤芽球・巨核球系への分化は抑制されており、自然免疫系の細胞を産生するのに好都合な分化能の変容が確認された。こうした血球側への影響だけでなく、ニッチ側にもSTING依存性の変容が誘導される。まず、骨髄の血管腔の拡張が認められる。さらに、骨髄の各種のニッチ細胞(間葉系前駆細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞)が減少する。これらのニッチ側の異常の中心はSTINGを高発現する間葉系前駆細胞(CD140a⁺CD51⁺CD45⁺Ter119⁺CD31⁺)分画であると考えられた。この分画で造血幹細胞ニッチ因子セットの発現が統一的に低下しており、造血幹・前駆細胞の骨髄における変容と髄外への移行の一因であると考えられた。トランスクリプトーム解析から、間葉系前駆細胞においてTGF- β シグナルの活性化と血清中のG-CSF上昇を認めた。実際、cyclic-di-GMP投与の際に阻害剤によるTGF- β シグナルの遮断や、G-CSF受容体欠損マウスの使用によって造血前駆細胞の髄外への移行は抑制された。以上の知見は全身性細菌感染時における造血変容とその分子機構を明らかにする知見である。

2) これまで若年齢(10週齢)の造血幹細胞と分化血球の代謝プロファイルをメタボローム解析から得てきた。これは現存する未分化幹細胞における唯一の統合的な代謝解析結果である。しかし、造血幹細胞が発生時期を通じて代謝動態の変動を起こすかは不明であった。また、造血幹細胞から分化していく過程で各血球系統に運命が決まった前駆細胞における代謝特性についてもリファレンスとなる代謝データは得られてこなかった。これらの問題を打開するために、本年度はキャピラリー電気泳動で代謝物を分離したうえで四重極型質量分析計を用いたメタボローム解析を行うことでマウス発生時期の造血幹細胞と各種造血前駆細胞のメタボロームデータの取得を行った。その結果、造血幹細胞は発生時期を通じてダイナミックに代謝プロファイルを変化させることが明らかになった。とりわけ、細胞周期が静止期化する3週齢から4週齢にかけて代謝プロファイルが変容することが明らかになった。

Subject No. : 26-001(Project research)

Title : Elucidation of stem cell niche regulation by the hypoxia-response system

Researchers : Keiyo Takubo (Project director, Department of Stem Cell Biology, Research Institute, National Center for Global Health and Medicine)

Key word : hematopoietic stem cell, stem cell niche, hypoxia response, metabolomics

Abstract :

Stem cells exhibit a number of characteristic features, including the capacity for self-renewal and differentiation into multiple cell types, stress resistance, and drug efflux activity. These specific biological characteristics are supported by signals from the surrounding niche and the stem cell-specific transcription factor set, including hypoxia and the machinery that senses low oxygen levels. These properties are essential for normal stem cells, and when defective may induce cellular senescence and tumorigenesis. In this project research, we will focus on the regulatory mechanism of hematopoietic stem cell (HSC) system that maintain lifelong hematopoiesis. We investigated the following topics in FY2014.

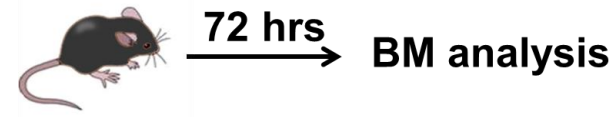
1) Upon systemic bacterial infection, hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) migrate to the periphery in order to supply a sufficient number of immune cells. Although pathogen-associated molecular patterns reportedly mediate HSPC activation, how HSPCs detect pathogen invasion in vivo remains elusive. Bacteria use the second messenger bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP) for a variety of activities. We found that c-di-GMP comprehensively regulated both HSPCs and their niche cells through an innate immune sensor, STING, thereby inducing entry into the cell cycle and mobilization of HSPCs while decreasing the number and repopulation capacity of long-term hematopoietic stem cells. Furthermore, we clarified that type I interferon acted as a downstream target of c-di-GMP to inhibit HSPC expansion in the spleen, while transforming growth factor- β was required for c-di-GMP-dependent splenic HSPC expansion. These results define machinery underlying the dynamic regulation of HSPCs and their niches during bacterial infection through c-di-GMP/STING signaling.

2) Defining the metabolic programs that underlie stem cell maintenance will be essential for developing strategies to manipulate stem cell capacity. We previously reported that glycolytic metabolic status governed by Pdk acts as a cell cycle checkpoint that modulates HSC quiescence and function in steady state. However, how metabolic features change during development is still unclear. Also, how metabolome differs among HSPC fractions is totally unknown. We directly investigated these issues using metabolomic analysis. We found that HSCs change their metabolic phenotype during ontogeny. In addition, HSCs and various progenitor cells showed different metabolic profiles. Notably, proliferating HSCs in the fetus and neonates and proliferating progenitors showed different metabolic profiles, suggesting that cell cycle status is not the cause of metabolic difference among fractions.

Researchers には、分担研究者を記載する。

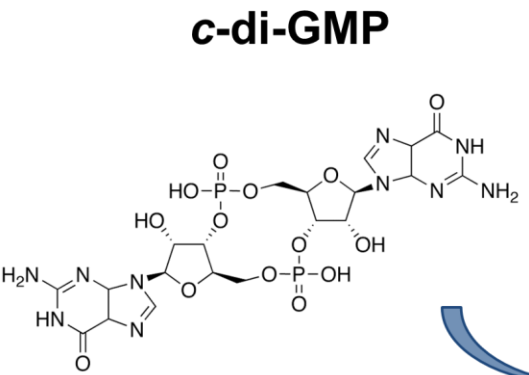
細菌由来の代謝物cyclic-di-GMPは造血幹・前駆細胞とニッチ細胞の動態を変化させる

★cyclic-di-GMPによる造血幹・前駆細胞への影響の解析

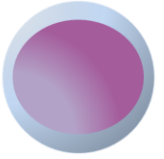


200 nmol cdG ip

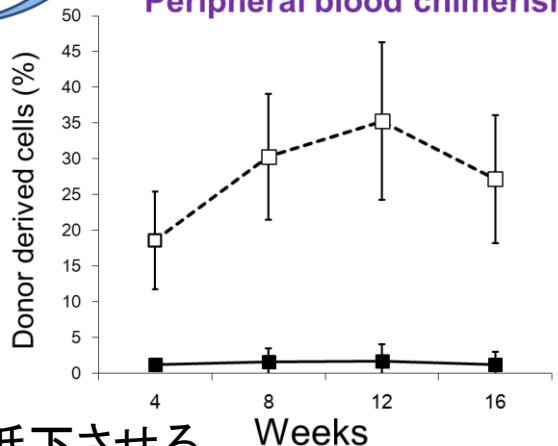
Lin- c-Kit+ Sca-1+ (LSK) gated



HSPCs

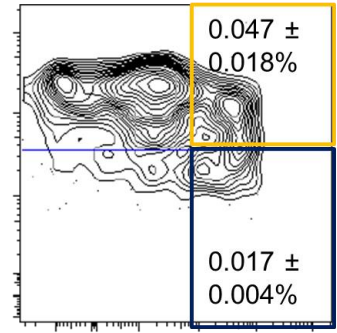


Peripheral blood chimerism

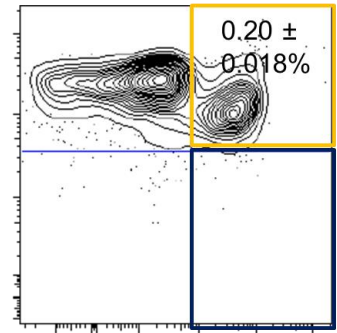


Ctrl

cdG



CD41/CD48



CD150

--細菌由来の代謝産物cyclic-di-GMPは骨髄の造血幹細胞を減少させ、

多能性前駆細胞を増加させる

--造血幹細胞の骨髄移植能を低下させる。

--造血幹細胞ニッチ細胞の数と機能を低下させることで造血幹前駆細胞による髓外造血を亢進させる

--これらの変容はホストのc-di-GMP受容体STING依存的である。

造血幹・前駆細胞のメタボローム解析に基づいた代謝プロファイル取得とその変容同定

★CE-QqQMS解析による造血幹・前駆細胞の解析

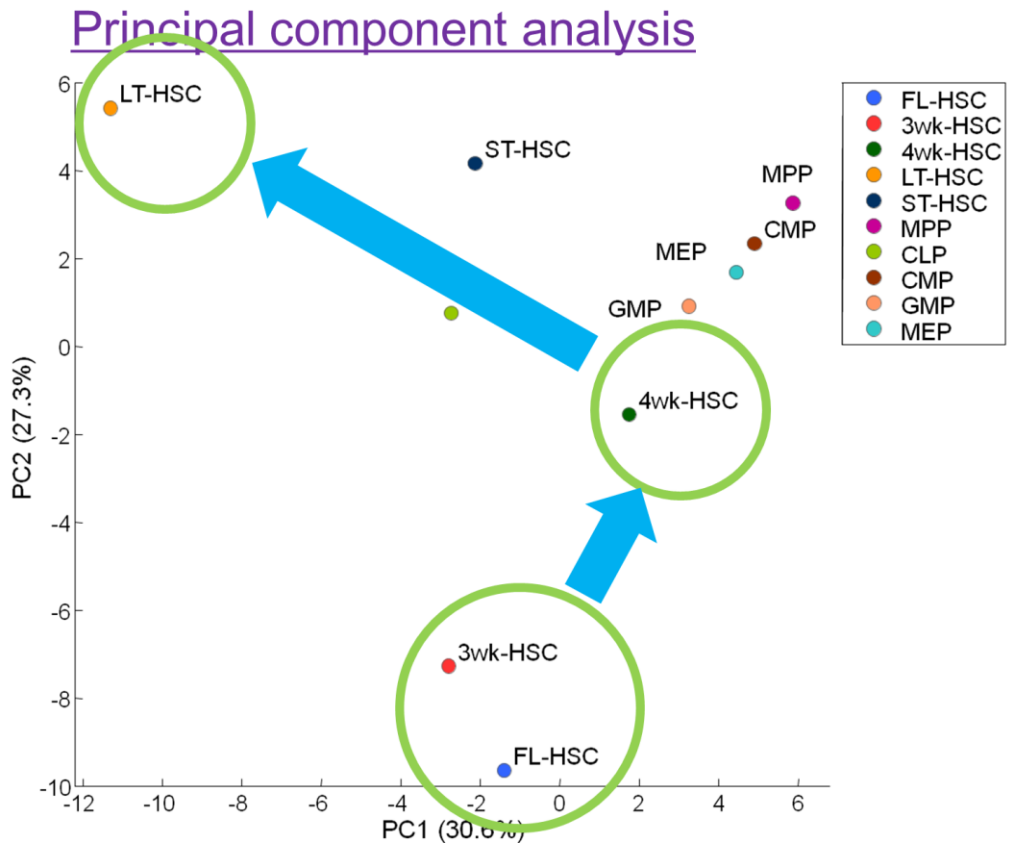
- 解析した細胞分画の増加することで統合的なデータセットを取得。
- 高感度な手法の採用によって新規に検出された代謝産物が増加した。
- 時期特異的な代謝産物プロファイル取得、時期ごとの造血幹細胞代謝特性変遷を同定した

- ★ Fetal liver HSC (E14.5)
- ★ BM HSC (3 week)
- ★ BM HSC (4 week)
- ★ BM LT-HSC (10 week)
- ★ BM ST-HSC (10 week)
- ★ BM MPP (10 week)
- ★ BM CLP (10 week)
- ★ BM CMP (10 week)
- ★ BM GMP (10 week)
- ★ BM MEP (10 week)

Metabolite extraction



CE-QqQMS analysis



研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 26指001

研究課題名： 幹細胞ニッチの低酸素制御の研究

主任研究者名： 田久保 圭登

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Megakaryocytes are essential for HSC quiescence through the production of thrombopoietin.	#Nakamura-Ishizu A, #*Takubo K (#equal contribution), Fujioka M, Suda T.	Biochem Biophys Res Commun.	454(2):353-7.	2014

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
低酸素シグナルによる造血幹細胞の恒常性維持機構	田久保圭登	第103回日本病理学会総会	広島国際会議場	2014年4月
造血器腫瘍による骨髄ニッチの変容制御	田久保圭登	第87回日本内分泌学会学術総会	福岡サンパレス	2014年4月
ニッチによる造血幹細胞のエネルギー代謝特性制御	田久保圭登	日本生化学会平成26年度関東支部例会	茨城大学	2014年6月
造血幹・前駆細胞の解糖系代謝によるストレス造血制御	田久保圭登	第2回がんと代謝研究会	東京理科大学葛飾キャンパス	2014年7月
巨核球ニッチによる造血幹細胞制御	田久保圭登	新学術領域研究「細胞運命制御」領域会議	東京大学医科学研究所	2014年9月
造血幹細胞ニッチによる造血恒常性制御	田久保圭登	第13回熊本血液感染免疫フォーラム	ANAクラウンプラザホテル熊本ニュースカイ	2014年9月
Megakaryocyte: a novel niche cell for hematopoietic stem cells	Keiyo Takubo	第73回日本癌学会学術総会	パシフィコ横浜	2014年9月
ニッチ-幹細胞相互作用による造血系抗老化システムの解明	田久保圭登	新学術領域「幹細胞老化と疾患」第1回領域班会議	千葉大学医学部	2014年10月
Megakaryocyte: a novel niche cell for hematopoietic stem cells	Keiyo Takubo	第87回日本生化学会大会	京都国際会館	2014年10月
Stress response signaling in maintenance of hematopoietic stem cells	Keiyo Takubo	第76回日本血液学会学術集会	大阪国際会議場	2014年11月
Roles of the hypoxia response system in hematopoietic stem cells	Keiyo Takubo	第37回日本分子生物学会年会	パシフィコ横浜	2014年11月
造血幹細胞の恒常性維持とストレス応答	田久保圭登	大学院特別セミナー	愛媛大学医学部	2015年2月
造血幹細胞とニッチの感染ストレス応答	田久保圭登	慶應義塾大学医学部テニュアトラック成果発表会	慶應義塾大学医学部	2015年3月
ニッチにある造血幹細胞のエネルギー代謝制御	田久保圭登	第14回日本再生医療学会総会	パシフィコ横浜	2015年3月

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当なし				

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者)(共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。