

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 :

組織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。組織幹細胞の数や機能の異常は、各種の疾患発症や個体老化につながると考えられている。また、組織幹細胞は再生医療に不可欠の細胞ソースであることから、人為的な操作・増殖技術の確立は重要な課題である。組織幹細胞の性質(幹細胞性と呼ばれる)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)を実行する際に必要なエネルギーや代謝物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、組織幹細胞特有の代謝特性とそれを維持する分子機構がニッチに存在していることを見出してきた。しかし、その分子機構の全貌や、各種病態における変容や意義、標的治療・診断技術開発としての有用性は不明である。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ニッチの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。本年度はこの研究計画の一部として、主に下記の2つの研究成果を得た：

(1) 造血幹細胞のニッチを構成する新たな要素として、ニッチ細胞・巨核球を同定した。巨核球は分化の際にC型レクチン・CLEC-2シグナルを発現して、その結果多倍体化し終末分化する。巨核球はCLEC-2依存の多倍体化の際に、巨核球分化に必要なサイトカイン・トロンボポエチンを発現するようになる。CLEC-2を巨核球で欠損したマウスを用いた解析から、巨核球は自身のトロンボポエチンを自身の多倍体化のみならず、造血幹細胞にサイトカイン・トロンボポエチンを供給し、幹細胞を骨髄に維持し細胞周期の静止期性を維持するという新たな機能を持つことを見出した。実際、このマウスにトロンボポエチンを投与することで、造血幹細胞の細胞周期の異常とニッチからの離脱を抑制できた。これらの知見は分化血球である巨核球が造血幹細胞ニッチとして機能するために必要なシグナルをはじめて同定したものである。巨核球は造血幹細胞から分化してできる血球細胞であり、1978年にSchofieldが世界で初めて幹細胞ニッチのコンセプトを提案した際に記述していた、「分化血球細胞が造血幹細胞ニッチとして機能しうる」という予想を図らずも40年近く後に遺伝学的方法論を用いて実証したことになる。今後各種の造血器病態の理解や、体外での造血幹細胞増幅を行う際における基盤的な知見であると考えている。本研究はシンガポール国立大学および山梨大学との共同研究として実施した。

(2) 加齢関連造血器疾患の病態理解のための造血幹細胞1細胞トランスクリプトーム解析  
これまでの造血幹細胞の解析は主として集団ベースの解析が主であり、一つ一つの細胞間の異同や、幹細胞集団内の各亜集団の構成割合の変化については無視されてきた。現実的にはこれらの精密な理解は造血幹細胞の動態や、病態における役割の理解のために必須である。とりわけ加齢に関連した造血器病態の理解は1細胞レベルの検討が不可欠と考えられたことから、加齢に際して造血幹細胞一つ一つのトランスクリプトームがいかに変容するか検討した。具体的には、マウス若年・加齢造血幹細胞を単離し、Fluidigm C1システムを用いたライブラリ作成と、次世代シーケンサーによる十分なリード数取得に基づいた1細胞RNA-seq解析を実施した。時期特異的な転写プロファイルの取得と、得られたデータのインフォマティクス解析を実施した結果、若年・加齢造血幹細胞では複製老化関連遺伝子の発現変化はみられなかった。また、造血幹細胞エイジングに寄与すると他グループから報告がされていた遺伝子についても我々の1細胞解析では発現変化がなかった。これらの解析結果は、造血幹細胞は一般的な体細胞(線維芽細胞など)でみられる複製老化とは異なるメカニズムの加齢変化を呈することを示唆している。さらに、既存の造血幹細胞エイジング理論を超えたメカニズムによる加齢変化が起こっていることが示唆された。今後はさらなるインフォマティクス解析に加えて、中間段階の造血幹細胞集団の1細胞発現プロファイルの検討や、分裂回数と幹細胞加齢変化の関連についての検証を実施することでより精密な検証を実施する予定である。

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 :

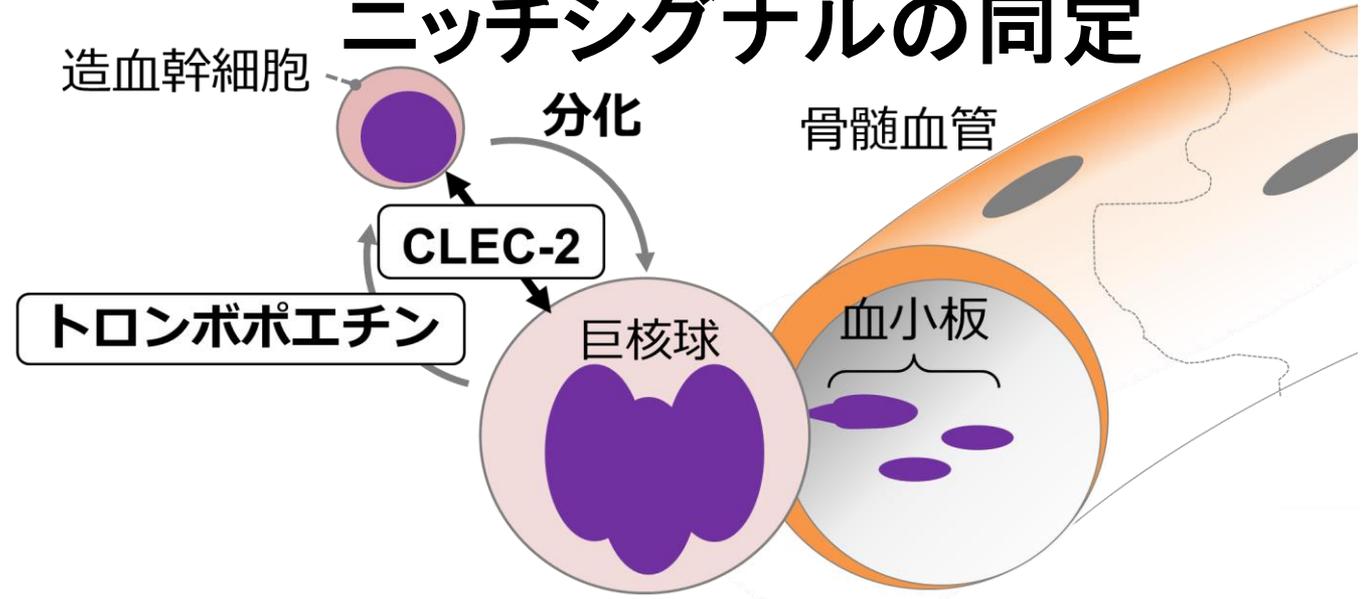
Tissue stem cells exhibit a variety of characteristics, including self-renewal capacity and differentiation ability into multiple cell types, stress resistance, and drug efflux activity. These specific biological characteristics (or so-called “stemness”) are supported by signals from the surrounding 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. Hematopoietic stem cells (HSCs) depend on the bone marrow (BM) niche for their maintenance, proliferation, and differentiation. In this project research, we will focus on the regulatory mechanism of HSC system that maintains lifelong hematopoiesis. We investigated the following topics in FY2015.

(I) The BM niche is composed of nonhematopoietic and mature hematopoietic cells, including megakaryocytes (Mks). Thrombopoietin (Thpo) is a crucial cytokine produced by BM niche cells. However, the cellular source of Thpo, upon which HSCs primarily depend, is unclear. Moreover, no specific molecular pathway for the regulation of Thpo production in the BM has been identified. Here, we demonstrate that the membrane protein C-type lectin-like receptor-2 (CLEC-2) mediates the production of Thpo and other factors in Mks. Mice conditionally deleted for CLEC-2 in Mks (Clec2(Mk $\Delta\Delta$ )) produced lower levels of Thpo in Mks. CLEC-2-deficient Mks showed down-regulation of CLEC-2-related signaling molecules Syk, Lcp2, and Plcg2. Knockdown of these molecules in cultured Mks decreased expression of Thpo. Clec2(Mk $\Delta\Delta$ ) mice exhibited reduced BM HSC quiescence and repopulation potential, along with extramedullary hematopoiesis. The low level of Thpo production may account for the decline in HSC potential in Clec2(Mk $\Delta\Delta$ ) mice, as administration of recombinant Thpo to Clec2(Mk $\Delta\Delta$ ) mice restored stem cell potential. Our study identifies CLEC-2 signaling as a novel molecular mechanism mediating the production of Thpo and other factors for the maintenance of HSCs.

(II) Physiological aging of hematopoietic stem cells (HSCs) underlies multiple age-related disorders. It is unclear whether functional decline in aged HSC is due to uniform alteration in genetic program or increased heterogeneity with expansion of dysfunctional cells. Also, molecular mechanism responsible for HSC aging is unknown. To address these issues, we performed single-cell RNA-sequence of young and aged HSCs. None of aged HSCs exhibited increase in cellular senescence-associated genes nor previously reported HSC aging-related genes, suggesting that physiological aging of HSCs differs from cellular senescence. Thus, aged HSCs possess distinct genetic programming which can be potential targets for HSC rejuvenation.

Researchers には、分担研究者を記載する。

# 造血幹細胞の“分化細胞ニッチ”の存在の実証と ニッチシグナルの同定



- ・骨髄の巨核球の分化にC型レクチン・CLEC-2シグナルが重要であることを見出した。
- ・巨核球はCLEC-2シグナルを介して造血幹細胞にサイトカイン・トロンボポエチンを供給し、幹細胞を骨髄に維持し細胞周期の静止期性を維持するという新たな機能を持つことを見出した。
- ・分化血球である巨核球が造血幹細胞ニッチとして機能するために必要なシグナルをはじめて同定した。
- ・シンガポール国立大学, 山梨大学との共同研究。

**CLEC-2 in megakaryocytes is critical for maintenance of hematopoietic stem cells in the bone marrow.**

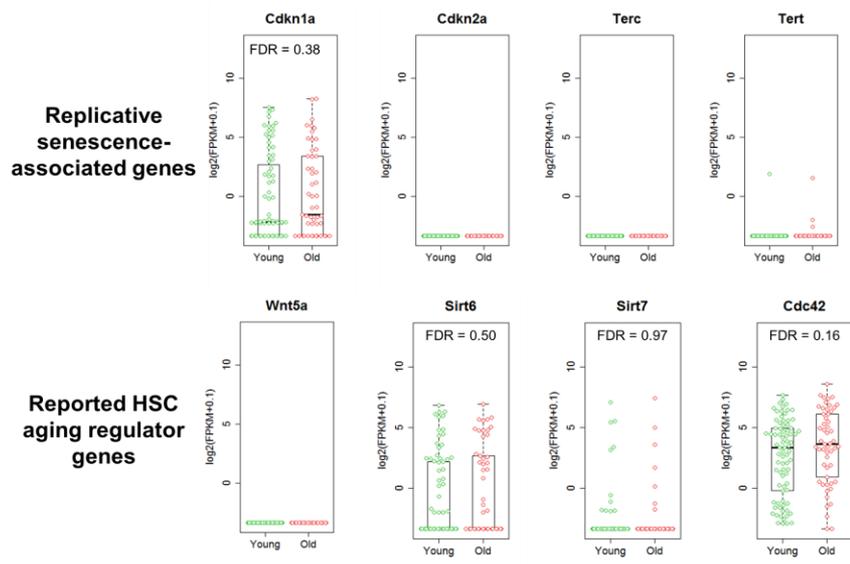
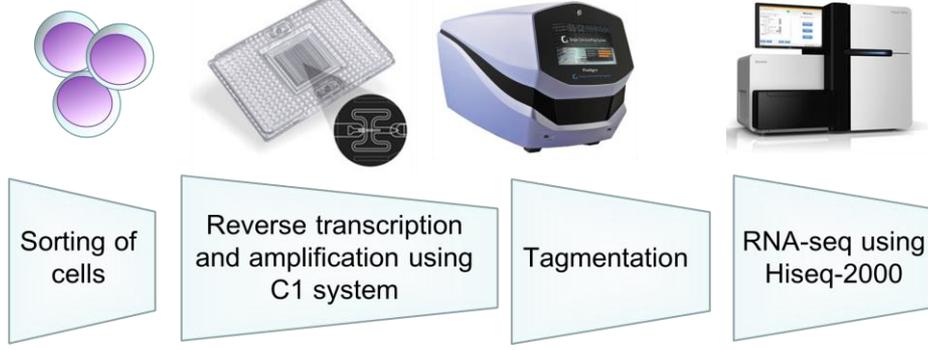
#Nakamura-Ishizu A, #Takubo K (equal contribution), Kobayashi H, Suzuki-Inoue K, Suda T. *J Exp Med.* 212:2133-2146, 2015.

# 1細胞RNA-seq解析に 基づいた造血幹細胞集団の加齢変化の検証

★加齢関連造血器疾患の病態理解のための造血幹細胞1細胞トランスクリプトーム解析

- Fluidigm C1システムを用いたライブラリ作成と、次世代シーケンサーによる十分なリード数取得に基づいてマウス若年・加齢造血幹細胞集団の1細胞RNA-seq解析を実施した。
- 時期特異的な転写プロファイルの取得と、得られたデータのインフォマティクス解析の結果、若年・加齢造血幹細胞では複製老化関連遺伝子や、造血幹細胞エイジングに寄与するのではと想像されていた遺伝子のいずれもが発現変化が無いことから、既存の理論を超えたメカニズムによる加齢変化が起こっていることが示唆された。
- 今後さらなるインフォマティクス解析に加えて、中間段階の造血幹細胞集団の1細胞発現プロファイルの検討や、分裂回数と幹細胞加齢変化の関連についての検証を実施する。

Young and old HSCs  
CD150+CD48-CD34- LSK cells  
(\*CD41 was added for young HSC sorting)



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
Histological Characterization of the Tumorigenic "Peri-Necrotic Niche" Harboring Quiescent Stem-Like Tumor Cells in Glioblastoma.	Ishii A, Kimura T, Sadahiro H, Kawano H, Takubo K, Suzuki M, Ikeda E.	PLoS One	11:e0147366	2016
How hematopoietic stem/progenitors and their niche sense and respond to infectious stress.	Kobayashi H, Suda T, Takubo K.	Exp Hematol	44:92-100	2016
Hypoxia regulates the hematopoietic stem cell niche.	Morikawa T, Takubo K.	Pflugers Arch	468:13-22	2016
CLEC-2 in megakaryocytes is critical for maintenance of hematopoietic stem cells in the bone marrow.	#Nakamura-Ishizu A, #Takubo K, Kobayashi H, Suzuki-Inoue K, Suda T. (#equal contribution)	J Exp Med	212: 2133-2146	2015
Excessive reactive oxygen species are therapeutic targets for intervertebral disc degeneration.	Suzuki S, Fujita N, Hosogane N, Watanabe K, Ishii K, Toyama Y, Takubo K, Horiuchi K, Miyamoto T, Nakamura M, Matsumoto M.	Arthritis Res Ther	17:316	2015
ADAM12 and ADAM17 are essential molecules for hypoxia-induced impairment of neural vascular barrier function.	Cui D, Arima M, Takubo K, Kimura T, Horiuchi K, Minagawa T, Matsuda S, Ikeda E.	Sci Rep	5:12796	2015
Integrative Analysis of the Acquisition of Pluripotency in PGCs Reveals the Mutually Exclusive Roles of Blimp-1 and AKT Signaling.	Nagamatsu G, Saito S, Takubo K, Suda T.	Stem Cell Reports	5:111-124	2015
Fbx110 overexpression in murine hematopoietic stem cells induces leukemia involving metabolic activation and upregulation of Nsg2.	Ueda T, Nagamachi A, Takubo K, Yamasaki N, Matsui H, Kanai A, Nakata Y, Ikeda K, Konuma T, Oda H, Wolff L, Honda Z, Wu X, Helin K, Iwama A, Suda T, Inaba T, Honda H.	Blood	125:3437-3446	2015

研究発表及び特許取得報告について

Bacterial c-di-GMP affects hematopoietic stem/progenitors and their niches through STING.	Kobayashi H, Kobayashi CI, Nakamura-Ishizu A, Karigane D, Haeno H, Yamamoto KN, Sato T, Ohteki T, Hayakawa Y, Barber GN, Kurokawa M, Suda T, Takubo K.	Cell Rep	11:71-84	2015
Proliferation following tetraploidization regulates the size and number of erythrocytes in the blood flow during medaka development, as revealed by the abnormal karyotype of erythrocytes in the medaka TFDP1 mutant.	Taimatsu K, Takubo K, Maruyama K, Suda T, Kudo A.	Dev Dyn	244:651-668	2015

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
Stress response mechanisms of hematopoietic stem cells in the bone marrow niche	Keiyo Takubo	BMB2015	神戸	2015年12月
代謝から読み解く造血幹細胞	田久保 圭誉	第8回先進血液学レクチャー	東京	2015年11月
ニッチによる造血幹細胞の制御機構	田久保 圭誉	第22回日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム	軽井沢	2015年10月
幹細胞の代謝制御機構	田久保 圭誉	第77回日本血液学会学術集会	金沢	2015年10月
Homeostatic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche	Keiyo Takubo	The 3rd Conference of the Japanese Association for Hypoxia Biology	東京	2015年7月
網羅的解析に基づいた造血幹細胞とニッチの運命決定制御研究	田久保 圭誉	第12回日本病理学会カンファレンス	六甲	2015年7月
Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the bone marrow niche	Keiyo Takubo	Lund Stem Cell Center Seminar Series	Lund, Sweden	2015年6月
Deciphering the regulatory mechanism for hematopoietic stem cells in the hypoxic bone marrow niche	Keiyo Takubo	The 9th Aso International Meeting	阿蘇	2015年5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。