

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に寄与する。組織幹細胞の数や機能の異常は、各種の疾患発症や老化に伴う臓器や個体の機能低下につながると思われる。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、その分子機構や、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、特に下記(1)の研究成果を得た:

(1) ストレス負荷時の造血幹細胞の代謝プログラムの変容とその責任分子機構を同定した。定常状態では細胞周期が静止期に保たれている造血幹細胞は様々な造血ストレス(感染、炎症、出血、抗がん剤投与、放射線照射など)によって細胞周期が活性化して、失われた分化血液細胞を供給するために増殖を開始する。このストレス造血のメカニズムの理解は種々の病態生理の解明に寄与すると考えられるが、その詳細は不明であった。本年度はストレス応答タンパク質の1つである p38MAPK に着目してストレス造血の機序の一端の解明を試みた。p38MAPK のアイソザイムの中で p38 $\alpha$  のみが造血器に発現していたため、p38 $\alpha$  のコンディショナルノックアウトマウスを用いて解析した。このマウスは定常状態の造血に差はないが、移植後キメラリズムが低下するなど明らかにストレスに対して脆弱だった。脆弱性を解明するため、p38MAPK 活性化の時期や移植後の生物学的変化について検討し、p38 $\alpha$  欠損造血幹細胞は移植後早期の細胞周期が遅延することを見出した。近年、造血幹細胞の細胞周期制御における代謝特性が注目されており、細胞周期遅延の機序解明のためにメタボローム解析を行った。その結果、移植後の p38 $\alpha$  欠損造血幹細胞で、プリン代謝の材料となるアミノ酸の貯留とプリン最終代謝産物の減少を認めた。これらの結果からプリン代謝異常が示唆され、プリン代謝関連酵素の発現を検討したところ、グアニン合成の律速段階酵素である Impdh2 (inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2) の発現が移植後の p38 $\alpha$  欠損造血幹細胞で低下していた。そして、この酵素発現を回復させる事で、細胞周期遅延や造血幹細胞移植後の生着率が回復した。またこれらを仲介する転写因子として Mitf を同定した。Mitf 変異造血幹細胞においても細胞周期遅延、Impdh2 の発現低下を認め、Impdh2 の発現を回復させる事で細胞周期遅延や造血幹細胞移植後の生着率が回復した。これらの結果より p38 $\alpha$  は Mitf を介してプリン代謝を制御し、最終的には造血幹細胞の細胞周期を進める事によって幹細胞性を維持している事が見出され、急性ストレス応答において重要な役割を果たしていることが示唆された。これまで p38MAPK は造血幹細胞のエージングを誘導する悪玉シグナルと信じられてきたが、主任研究者らのノックアウトマウスを用いた遺伝学的に厳密な検証がもたらした知見はこの過去のモデルを書き換えるものである。また、細胞周期の静止期性こそが造血幹細胞の幹細胞性維持のための必須要件であると考えられてきた造血幹細胞研究分野において、必要に応じて代謝プログラムを変化させて細胞周期を起動させるという新しい造血幹細胞像を提供するものでもある。これらの知見は、今後様々な病態の治療法への示唆を与えるだけでなく、一種のストレス造血ともいえる造血幹細胞の増幅法の最適化にも寄与す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キングスカレッジロンドン、東京医科歯科大学や慶應義塾大学を含む多くの施設・研究室との国際共同研究として実施した。また、NCGM 内でも分子代謝制御研究部(松本道宏部長)との機関内共同研究として実施されたものである。

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. Recent studies using metabolomics technologies reveal that metabolic regulation plays an essential role in HSC maintenance. Metabolic pathways provide energy and building blocks for other factors functioning at steady state and in stress. In this project research, we will focus on the metabolic regulation of HSC system that maintains lifelong hematopoiesis. We especially investigated the following topic (I) in FY2016.

(I) We reported a critical role for the p38MAPK family isoform p38 $\alpha$  in initiating hematopoietic stem and progenitor cell (HSPC) proliferation during stress hematopoiesis in mice. We found that p38MAPK is immediately phosphorylated in HSPCs after a hematological stress, preceding increased HSPC cycling. Conditional deletion of p38 $\alpha$ , the major isozyme in hematopoietic cells including HSPCs, led to defective recovery from hematological stress and a delay in initiation of HSPC proliferation. Mechanistically, p38 $\alpha$  signaling in HSPCs increases expression of inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2 (Impdh2), the rate-limiting enzyme in purine metabolism, leading to altered levels of amino acids and purine-related metabolites and changes in cell-cycle progression in vitro and in vivo. We also found that Mitf upregulates Impdh2 expression in stressed HSPCs. Our studies have therefore identified p38 $\alpha$  as a cell cycle and metabolic regulator of HSPCs in hematological stress. p38 $\alpha$  is required for HSPC cell cycle initiation, especially during stress settings including transplantation, bone marrow recovery, and ex vivo proliferation. In addition, hematological stresses activate p38 $\alpha$ -dependent purine metabolism to initiate cycling of quiescent HSCs. Artificial regulation of the p38 $\alpha$ /Mitf/purine metabolism axis could be a novel modulator of HSPCs during hematological stress or ex vivo expansion. This study reinforces the importance of cellular metabolism in stem cell regulation and is the first study of metabolic requirements of HSPCs during stress.

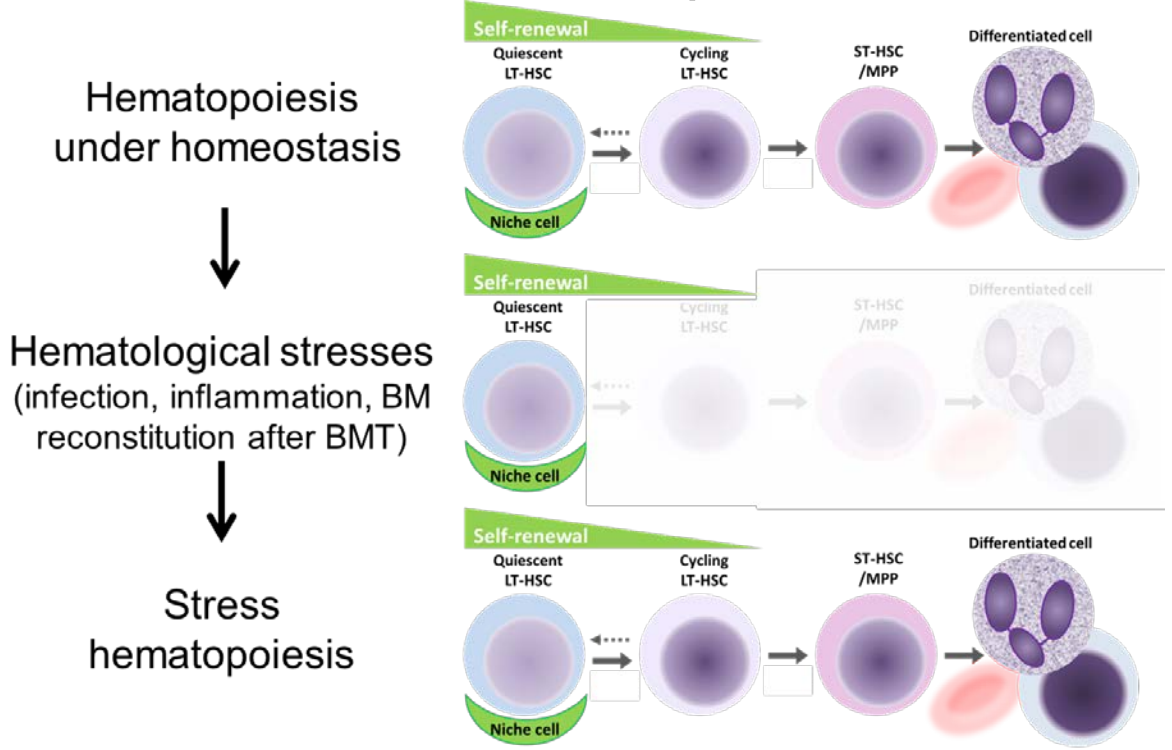
Researchers には、分担研究者を記載する。

# ストレス造血時の造血幹細胞代謝プログラムの 変容とその責任分子機構、生物学的意義の同定

【背景】造血幹細胞はストレス負荷時に代謝特性を変化することでストレス造血(感染, 放射線照射, 移植後の造血システム再生)を行う(下図)。その分子機構の解明は各種疾患の病態生理の解明や治療法開発につながるが、これまで不明な点が多かった。

【方法】生体で主要なストレス応答シグナル経路として知られているp38MAPK経路に着目し、造血幹細胞を含む血液細胞における主たるアイソザイムであるp38αを欠損したモデルを中心にしたストレス造血時の造血幹細胞や前駆細胞の血液学的・幹細胞生物学的解析を実施した。

## ストレス造血による造血恒常性の維持



# ストレス造血時の造血幹細胞代謝プログラムの 変容とその責任分子機構、生物学的意義の同定

【結果】ストレスが負荷された造血幹細胞では下記のような一連のシグナル経路を活性化することで、ストレス造血を実行していることが見出された。

## ストレス負荷時の造血幹細胞の代謝プログラム

造血ストレス(抗がん剤, 放射線照射, 幹細胞移植, サイトカイン刺激)

・プリン体代謝活性化により,  
グアニンヌクレオチドやGTP供給  
・NADPH, α-ケトグルタル酸供給

P  
p38α

Mitf

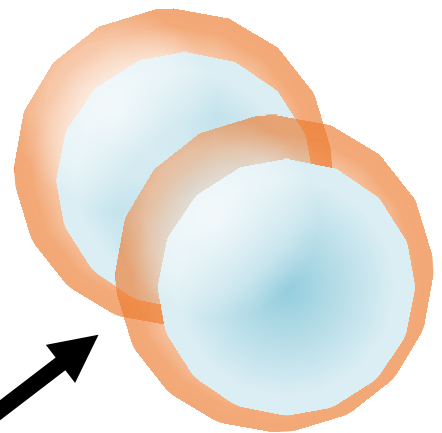
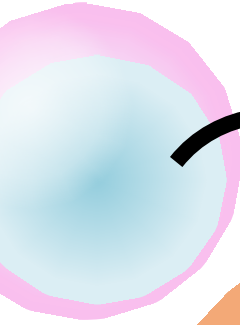
Impdh2

Mitf

Impdh2

- 造血幹細胞が増殖
- 移植時の生着改善
- 抗がん剤投与  
・放射線照射後の  
骨髄再生の促進

(Karigane et al., *Cell Stem Cell* 2016)



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
Maintenance of the functional integrity of mouse hematopoiesis by EED and promotion of leukemogenesis by EED haploinsufficiency.	Ikeda K, Ueda T, Yamasaki N, Nakata Y, Sera Y, Nagamachi A, Miyama T, Kobayashi H, Takubo K, Kanai A, Oda H, Wolff L, Honda Z, Ichinohe T, Matsubara A, Suda T, Inaba T, Honda H.	Sci Rep.	6:29454	2016
p38 $\alpha$ Activates Purine Metabolism to Initiate Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Cycling in Response to Stress.	Karigane D, Kobayashi H, Morikawa T, Ootomo Y, Sakai M, Nagamatsu G, Kubota Y, Goda N, Matsumoto M, Nishimura EK, Soga T, Otsu K, Suematsu M, Okamoto S, Suda T, Takubo K.	Cell Stem Cell.	19(2):192-204	2016
Setdb1 maintains hematopoietic stem and progenitor cells by restricting the ectopic activation of nonhematopoietic genes.	3. Koide S, Oshima M, Takubo K, Yamazaki S, Nitta E, Saraya A, Aoyama K, Kato Y, Miyagi S, Nakajima-Takagi Y, Chiba T, Matsui H, Arai F, Suzuki Y, Kimura H, Nakauchi H, Suda T, Shinkai Y, Iwama A.	Blood.	128(5):638-649	2016

研究発表及び特許取得報告について

Chordoma-derived cell line U-CH1-N recapitulates the biological properties of notochordal nucleus pulposus cells.	Fujita N, Suzuki S, Watanabe K, Ishii K, Watanabe R, Shimoda M, Takubo K, Tsuji T, Toyama Y, Miyamoto T, Horiuchi K, Nakamura M, Matsumoto M.	J Orthop Res.	34(8):1341-1350	2016
Loss of Folliculin Disrupts Hematopoietic Stem Cell Quiescence and Homeostasis Resulting in Bone Marrow Failure.	Baba M, Toyama H, Sun L, Takubo K, Suh HC, Hasumi H, Nakamura-Ishizu A, Hasumi Y, Klarmann KD, Nakagata N, Schmidt LS, Linehan WM, Suda T, Keller JR.	Stem Cells.	34(4):1068-1082	2016
Angiopoietin-like Protein 2 Is a Multistep Regulator of Inflammatory Neovascularization in a Murine Model of Age-related Macular Degeneration.	Hirasawa M, Takubo K, Osada H, Miyake S, Toda E, Endo M, Umezawa K, Tsubota K, Oike Y, Ozawa Y.	J Biol Chem.	291(14):7373-7385	2016

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
Metabolic regulation of hematopoietic stem cell function	Keiyo Takubo	第94回日本生理学会シンポジウム	浜松アクトシティコングレスセンター	2017年3月

研究発表及び特許取得報告について

ストレス時の造血幹細胞の代謝特性を規定する分子機構	田久保圭誉	第4回 新学術領域研究「酸素生物学」公開シンポジウム	九州大学	2017年2月
Metabolic and transcriptional control of hematopoietic stem cell fate during stress	Keiyo Takubo	千葉大学再生医療研究センターセミナー	千葉大学	2016年12月
Transcription factor program for hematopoietic stem cell aging	Keiyo Takubo	第39回日本分子生物学会年会シンポジウム	パシフィコ横浜	2016年11月
代謝から読み解く造血幹細胞	田久保圭誉	早稲田大学TWinsセミナー	早稲田大学	2016年11月
代謝から読み解く造血幹細胞	田久保圭誉	横浜市立大学大学院医学セミナー	横浜市立大学	2016年10月
造血幹細胞の急性・慢性ストレス応答の分子機構	田久保圭誉	中部大学生命健康科学研究所慢性炎症セミナー	中部大学	2016年10月
p38 $\alpha$ Activates Purine Metabolism to Initiate Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Cycling in Response to Stress	Keiyo Takubo	第89回日本生化学会大会シンポジウム	仙台国際センター	2016年9月
Identification of aging program for hematopoietic stem cells at single cell level	Keiyo Takubo	Hematopoietic Stem Cell Researcher Symposium	東京大学医科学研究所	2016年9月
ストレス造血を支える造血幹細胞の代謝制御機構	田久保圭誉	第26回日本サイトメトリー学会学術集会シンポジウム	九州大学医学部百年講堂	2016年7月
Aged hematopoietic stem cells enhance self-renewal program at single cell level	Keiyo Takubo	International Symposium of Center for Animal Disease Models 2016	東京ガーデンパレス	2016年7月
Metabolic regulation of hematopoietic stem cells during stress	Keiyo Takubo	1st International Symposium on Stem Cell Aging and Disease	東京大学伊藤謝恩ホール	2016年6月
造血幹細胞を支える細胞内代謝マシナリー	田久保圭誉	第35回セルセラピーセミナー	群馬ロイヤルホテル	2016年6月
低酸素環境による造血幹細胞の制御と変容	田久保圭誉	第16回日本抗加齢医学会総会	パシフィコ横浜	2016年6月

## 研究発表及び特許取得報告について

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