

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461411

研究課題名(和文) カロリー制限による造血幹細胞動態制御の分子基盤の解析

研究課題名(英文) Regulation of hematopoietic stem cell function by calorie restriction

研究代表者

田所 優子 (Tadokoro, Yuko)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：00447343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、造血幹細胞を含む複数の組織幹細胞において、個体レベルでのカロリー摂取量はその動態に大きな影響を及ぼすことが判明し、新たな幹細胞制御機構として注目されている。本研究課題では造血幹細胞をモデル系として、カロリー摂取制限がいかに幹細胞の自己複製や分化に影響を与えるのか、またそれが幹細胞に直接作用しているのか或いはニッチ細胞を介しているのかを明らかにすることを目的として解析を行なった。その結果、カロリー摂取制限は表現型的には造血幹細胞の数を増やす傾向にあったが、機能的には大きな影響を与えないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have indicated that calorie restriction affects the regulation of tissue specific stem cells. Thus, calorie control has been thought as a novel regulatory machinery of stem cell regulation. In this study, I have investigated how calorie restriction influences regulation of hematopoietic stem cell system. I found that calorie restriction phenotypically increased the number of hematopoietic stem cells, while there is no advantage in stem cell function.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：幹細胞 カロリー制限

### 1. 研究開始当初の背景

これまでショウジョウバエ・線虫のようなモデル生物をはじめ、様々な生物を用いた研究において、食餌によるカロリー制限が個体寿命の延長に寄与することが示されている。カロリー制限によって働くエネルギー代謝調節に関わる分子が個体の寿命に影響を及ぼしていることが明らかとなってきた (*Current Biology* 17, p1646, 2007; *Nature* 457, p726, 2009)。カロリー摂取制限は、メタボリック症候群や老化防止という身近な問題から国内外を問わず精力的に行われており、細胞生物学的観点からも注目されている。興味深いことに、カロリー制限によって、造血幹細胞、神経幹細胞、腸管幹細胞、筋肉幹細胞など、様々な組織幹細胞において、その数の増加や機能の亢進が見られることが報告され、幹細胞を取り巻く栄養・エネルギー環境の変化が、幹細胞およびニッチ細胞に影響し、幹細胞システムが大きく影響を受けることが明らかとなっている。これらの現象は、その制御機構に未知の点が多く、詳細は不明であるが、幹細胞制御と個体寿命との深い関連を示唆し、今後、幹細胞研究の新たな展開として研究の進展が期待されている。カロリー制限には、様々な分子・経路の関与が知られているが、その代表的な経路は、AMP/ATP 比を検知して活性制御を受けるセリンスレオニンキナーゼ AMPK (AMP-activated protein kinase) である。申請者はこれまで、造血幹細胞における「細胞内 ATP 調節による造血幹細胞制御機構の解明」を行ってきた。特に、造血幹細胞内の ATP 濃度および AMPK の活性化状態、グルコース濃度と ATP の関連を詳細に検討してきた結果、(1) 短期間の絶食により、造血幹細胞において AMPK が活性化されること、同時に(2) オートファジーの活性化も見られ、カロリー制限における AMPK とオートファジー経路の関連を示唆するデータを得た (未発表データ)。さらに、(3) AMPK $\alpha$  欠損造血幹細胞の競合的移植実験では、移植後緩やかにそのキメリズムの低下が見られた。このことから、AMPK は定常状態では顕著な機能を示さないものの、造血幹細胞のエネルギー環境が大きく変化した際には増殖・分化に重要な役割を果たすのではないかと考え研究を進めている。またカロリー制限状態では、AMPK 以外にも LKB1-AMPK 経路、FoxO 経路、mTOR 経路などの関与が示唆されており (*Nature* 468, p653, 2010; *Nature* 486, p490, 2012)、これらの分子との関連にも取り組んでいる。以上のような研究動向と経緯から、これまでの申請者の研究成果をさらに発展させ、カロリー制限下で作用するエネルギー代謝や寿命の調節に関わる分子 AMPK $\alpha$ , FoxO3a, Rheb, Atg5 の役割に焦点を当てることにより、カロリー制限による造血幹細胞動態制御の分子基盤を明らかにできると考え、本研究

課題の着想に至った。

### 2. 研究の目的

組織幹細胞は、幹細胞ニッチと呼ばれる微小環境から、増殖・生存・分化などの調節を受け、未分化性を維持している。本研究では、造血幹細胞をモデル系として、カロリー摂取制限がいかに関与する幹細胞の自己複製や分化に影響を与えるのか、その分子機構の解明を目的とする。特に、エネルギー代謝や寿命の調節に関わる AMPK $\alpha$ , FoxO3a, Rheb, Atg5 に焦点を当て、カロリー制限とこれら分子の働きによる造血への影響を、幹細胞側・ニッチ側の両方から明らかにする。本研究は、以下に示す 4 つの課題を設定して進めていく。

- ・カロリー制限下における mTORC1 及び AMPK-FoxO3 シグナルによる造血幹細胞の機能調節と微小環境制御の解析。
- ・カロリー制限下におけるオートファジーによる代謝調節と造血幹細胞制御機構の解析。
- ・カロリー制限によるストレス耐性の解析。
- ・ヒト臍帯血造血幹細胞におけるカロリー制限と幹細胞機能解析。

### 3. 研究の方法

(1) マウスにおけるカロリー制限処置  
RosaCreER-タモキシフェン投与の系によりそれぞれのマウスの遺伝子欠損誘導を行なった。野生型マウスも含めて通常の食餌 2 日・絶食 2 日の食餌制限を 4 週間繰り返した。これらのマウスの末梢血および骨髄を食餌制限無しのマウスと比較し、解析を行なった。

#### (2) フローサイトメトリー解析

採取した末梢血および骨髄細胞から赤血球等を除き、抗体染色を行なった。その後フローサイトメーターを用いて、細胞の分化、未分化細胞の数、移植後のキメリズム等の解析を行なった。

#### (3) 骨髄細胞移植解析

レシピエントマウスに対して致死量 (9 Gy) の X 線を照射した。ドナー細胞は処置をしたマウスからの骨髄細胞と処置を行っていない正常野生型のマウス骨髄細胞を 1:1 の割合で混合し、レシピエントマウスに対して尾静脈より骨髄細胞移植を行なった。移植後、4 週・8 週・12 週・16 週で末梢血採取を行ない、フローサイトメトリー解析を行なった。移植後 16 週ではレシピエントマウスから骨髄細胞を採取し、フローサイトメトリー解析を行なった。

#### (4) X 線照射によるストレス耐性解析

通常の食餌 2 日・絶食 2 日の食餌制限を 4 週間繰り返したマウスに対して、0 Gy, 1 Gy, 3 Gy の X 線照射を行なった。これらのマウス骨髄細胞を採取し、フローサイトメトリー解析および致死量の放射線照射処置を行なった野生型マウスに対して処置を行っていない

い正常野生型骨髄細胞とともに競合的に移植を行なった。

#### (5) ケモセラピー効果の解析

野生型マウスを2日間絶食させた後シクロホスファミドを投与した。その後12日間通常食餌を採る、という処置を1サイクルとして2から6サイクルを行なった。これらのマウス骨髄細胞を採取し、フローサイトメトリー解析および致死量の放射線照射処置を行なった野生型マウスに対して処置を行っていない正常野生型骨髄細胞とともに競合的に移植を行なった。

#### 4. 研究成果

(1) カロリー制限の造血幹細胞に及ぼす影響を調べるために、野生型マウス造血幹細胞における絶食の影響について解析を行なった。その結果フローサイトメーターによる細胞表面マーカーの表現型解析においては、絶食を受けたマウスにおいて造血幹細胞画分の増加が認められた。また骨髄細胞移植による造血幹細胞の機能解析においても、造血幹細胞の増加傾向が観察された。

(2) カロリー制限による造血幹細胞のストレス耐性を調べるために、X線照射によるダメージの影響について解析を行なった。その結果、X線照射のストレスに対しては絶食の効果による優位性は見られなかった。

(3) カロリー制限の造血幹細胞に直接及ぼす影響と分子機構を調べるために、AMPK $\alpha$ 1 $\alpha$ 2欠損造血幹細胞の維持・増殖・分化におけるカロリー摂取制限の影響について解析を行なった。方法としては、AMPK $\alpha$ 1 $\alpha$ 2コンディショナルノックアウトマウスを準備し、これらのマウス骨髄細胞を致死量の放射線照射処置を行なった野生型マウスに対して野生型骨髄細胞とともに競合的に移植を行なった。造血が安定したところで絶食を行ない、血液のキメリズムのモニターを行なった。その結果、食餌制限無しのコントロールと比較してどちらの欠損細胞も優位な差は観察されなかった。

(4) 最近、絶食を繰り返したマウスの造血幹細胞はケモセラピー(化学療法)に対して耐性を示すことが報告されたことから、X線照射によるダメージの影響を調べた結果に引き続き、上記の報告を検証するために野生型マウス造血幹細胞を用いて絶食を繰り返したマウス造血幹細胞におけるケモセラピーに対する効果について解析を行なった。方法としては、野生型マウスを2日間絶食させた後シクロホスファミドを投与し12日間通常食餌を採る、という処置を1サイクルとして2から6サイクルを行なった。これらのマウス骨髄細胞を採取し、FACS解析および致死量の放射線照射処置を行なった野生型マウス

に対して処置を行っていない正常野生型骨髄細胞とともに競合的に移植を行なった。その結果、食餌制限無しのコントロールと比較して絶食を繰り返したマウスの造血幹細胞ではシクロホスファミド投与に対する耐性について優位な差は観察されなかった。

(5) カロリー制限とエネルギー代謝や寿命の調節に関わる分子の働きによる造血への影響を明らかにするために、FoxO3a欠損造血幹細胞の維持・増殖・分化におけるカロリー摂取制限の影響について検討を行った。絶食を繰り返したマウス造血幹細胞の機能を競合的移植法により解析を行った結果、食餌制限無しのコントロールおよび食餌制限を行った野生型マウス造血幹細胞と比較してFoxO3a欠損造血幹細胞ではその機能に対するカロリー制限の影響において優位な差は観察されなかった。

以上の結果、カロリー摂取制限は表現型的には造血幹細胞の数を増やす傾向にあったが、造血幹細胞の機能やストレス耐性に対しては大きな影響を与えないことが明らかとなった。

#### 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 5件)

Shingo Tanaka, Mitsutoshi Nakada, Daisuke Yamada, Ichiro Nakano, Tomoki Todo, Yasushi Ino, Takayuki Hoshii, Yuko Tadokoro, Kumiko Ohta, Mohamed A. E. Ali, Yutaka Hayashi, Jun-ichiro Hamada, Atsushi Hirao, "Strong therapeutic potential of  $\alpha$ -secretase inhibitor MRK003 for CD44-high and CD133-low glioblastoma initiating cells" *Journal of Neuro-Oncology*, 査読有, 巻 121, 2015, 239-250  
doi:10.1007/s11060-014-1630-z

Mohamed A.E. Ali, Kazuhito Naka, Akiyo Yoshida, Kyoko Fuse, Atsuo Kasada, Takayuki Hoshii, Yuko Tadokoro, Masaya Ueno, Kumiko Ohta, Masahiko Kobayashi, Chiaki Takahashi, Atsushi Hirao, "Association of a murine leukaemia stem cell gene signature based on nucleostemin promoter activity with prognosis of acute myeloid leukaemia in patients" *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 巻 450, 2014, 837-843  
doi:10.1016/j.bbrc.2014.06.066

Takayuki Hoshii, Atsuo Kasada, Tomoki Hatakeyama, Masashi Ohtani, Yuko Tadokoro,

Kazuhito Naka, Tsuneo Ikenoue, Tomokatsu Ikawa, Hiroshi Kawamoto, Hans Joerg Fehling, Kimi Araki, Ken-ichi Yamamura, Satoshi Matsuda, and Atsushi Hirao, "Loss of mTOR complex 1 induces developmental blockage in early T-lymphopoiesis and eradicates T-cell acute lymphoblastic leukemia cells" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 査読 有, 巻 111, 2014, 3805-3810  
doi: 10.1073/pnas.1320265111

Daisuke Yamada, Takayuki Hoshii, Shingo Tanaka, Ahmed M. Hegazy, Masahiko Kobayashi, Yuko Tadokoro, Kumiko Ohta, Masaya Ueno, Mohamed A.E. Ali and Atsushi Hirao, "Loss of *Tsc1* accelerates malignant gliomagenesis when combined with oncogenic signals" *The Journal of Biochemistry*, 査読 有, 巻 155, 2013, 227-233  
doi: 10.1093/jb/mvt112.

Noriyuki Uema, Takako Ooshio, Kenichi Harada, Masako Naito, Kazuhito Naka, Takayuki Hoshii, Yuko Tadokoro, Kumiko Ohta, Mohamed A.E. Ali, Miyuki Katano, Tomoyoshi Soga, Yasuni Nakanuma, Akihiko Okuda, Atsushi Hirao, "Abundant Nucleostemin Expression Supports the Undifferentiated Properties of Germ Cell Tumors" *The American Journal of Pathology*, 査読 有, 巻 183, 2013, 592-603  
doi: 10.1016/j.ajpath.2013.04.018.

〔学会発表〕(計 8 件)

Yuko Tadokoro, Akihiko Yoshimura, Hiromitsu Nakauchi, Atsushi Hirao, "Spred1 regulates the self-renewal activity of hematopoietic stem cells" 第 77 回 日本血液学会学術集会, 2015 年 10 月 16~18 日, 石川県立音楽堂(石川県)

Yuko Tadokoro, Akihiko Yoshimura, Hiromitsu Nakauchi, Atsushi Hirao, "Role of Spred1 in the regulation of self-renewal and aging of hematopoietic stem cells" ISEH 44rd Annual Scientific Meeting, 2015 年 9 月 17~19 日, 国立京都国際会館(京都府)

Yuko Tadokoro, Akihiko Yoshimura, Hiromitsu Nakauchi, Atsushi Hirao, "Spred1 regulates the self-renewal activity in hematopoietic stem cells" The 10<sup>th</sup> International Symposium of the Institute Network, 2015 年 7 月 23~24 日, 北海道大学 遺伝子病制御研究所(北海道)

Yuko Tadokoro, Akihiko Yoshimura, Hiromitsu Nakauchi, Atsushi Hirao, "Quality control of undifferentiated status in hematopoietic stem cells during cell division by Spred1" The 13<sup>th</sup> Stem Cell Research Symposium, 2015 年 5 月 29~30 日, 東京大学 伊藤国際学術研究センター(東京)

Yuko Tadokoro, Koji Eto, Hideo Ema, Satoshi Yamazaki, Akihiko Yoshimura, Hiromitsu Nakauchi, Atsushi Hirao, "Control of self-renewal activity of hematopoietic stem cells by Spred1" 日本癌学会シンポジウム/共同利用・共同研究拠点シンポジウム, 2015 年 1 月 21 日-22 日, 石川県立音楽堂交流ホール(石川県)

Yuko Tadokoro, Koji Eto, Hideo Ema, Satoshi Yamazaki, Akihiko Yoshimura, Hiromitsu Nakauchi, Atsushi Hirao, "Control of self-renewal activity of hematopoietic stem cells by Spred1" ISEH 43rd Annual Scientific Meeting, 2014 年 8 月 21 日-24 日, Montreal, Canada

Yuko Tadokoro, Takayuki Hoshii, Kazuhito Naka, Koji Eto, Hideo Ema, Satoshi Yamazaki, Akihiko Yoshimura, Hiromitsu Nakauchi, Atsushi Hirao, "Inhibitory effect of Spred1 on self-renewal activity mediated by cell-cell interaction determines size of hematopoietic stem cell pool" 12th Stem Cell Research Symposium, 2014 年 5 月 30 日-31 日, 九州大学百年講堂(福岡県)

Yuko Tadokoro, Atsushi Hirao, Takayuki Hoshii, Kazuhito Naka, Koji Eto, Hideo Ema, Satoshi Yamazaki, Akihiko Yoshimura, Hiromitsu Nakauchi, "Spred-1 regulates the competitive advantage of hematopoietic stem cells in the bone marrow microenvironment" International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa & Symposium on Drug Discovery in Academics, 2014 年 1 月 23 日-24 日, 金沢エクセルホテル東急(石川県)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:

国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://cri-mol-gen.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

田所 優子 (TADOKORO, Yuko)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：00447343

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：