

貧血ストレスに対する造血幹細胞の応答機構の解明

齋藤清香

熊本大学 国際先端医学研究機構

【研究の背景】

骨髄中に存在する造血幹細胞は自己複製能によりその幹細胞性を維持し、多分化能により全ての血液細胞に分化する能力を持つことで、各種血液細胞の供給を一生涯に渡って担っている。生涯において生体内で起こる様々なストレスに応答するために、造血幹細胞の性質や機能及び特定の血液細胞に偏った造血が行われることが多くの研究から明らかとなっている。中でも、赤血球は1日に約2000億個が新たに産生されており、大量の赤血球を供給するために造血前駆細胞のみならず造血幹細胞も異なるメカニズムで制御されていると想定される。しかし、重度貧血のようなストレス環境下における赤血球造血では制御機構がどのように変化するかについては未だ解明されていない。我々はこれまでに、貧血マウスの造血幹細胞では定常状態の造血幹細胞と比べて赤血球系へ分化し易くなることを明らかにした。一方で、赤血球造血に重要な転写因子である Gata1 や液性因子エリスロポエチン(EPO)の受容体など既知の赤血球分化に関する制御因子の発現増強は認められていない。そこで、本研究課題では造血幹細胞における赤血球分化を促進する独自のメカニズムを解明する。

【目 的】

重度貧血マウスモデルを用いて、造血幹細胞における Apolipoprotein E (ApoE)を起点とした脂質代謝と赤血球造血の制御機構を解明する目的で本研究課題を遂行する。

【方 法】

溶血性貧血を誘導するフェニルヒドラジン (PHZ)の投与による急性貧血モデルマウスを用いて、その骨髄中に存在する造血幹細胞の機能や性質を解析した。分化能力の検討には *in vitro* コロニー形成法とフローサイトメトリーを組み合わせた手法 (CFU-FACS)を用いた。

【結 果】

マウスに急性貧血を誘導すると造血幹細胞が増殖し、これらの造血幹細胞からはより多くの赤血球系細胞が産生された。遺伝子発現解析の結果、貧血マウスの造血幹細胞では脂質代謝関連遺伝子である Very low density lipoprotein receptor (Vldlr)の発現が増強されていた。また、VLDLR のリガンドである Apolipoprotein E (ApoE)が貧血誘導時の末梢血中で増加していた。ApoE を添加して正常マウス造血幹細胞を培養すると、赤血球分化能の亢進が認められた。一方で ApoE 欠損マウスに PHZ を投与しても造血幹細胞の赤血球分化亢進が認められなかった。さらに、VLDLR^{high}造血幹細胞は VLDLR^{low}細胞に比べて赤血球分化能が高いことがわかった。そこで、VLDLR^{high} および VLDLR^{low}造血幹細胞のクロマチンアクセシビリティを比較したところ、VLDLR^{high}造血幹細胞では幹細胞性と巨核球分化能の維持に必要な Erg 遺伝子の結合配列を含む領域のアクセシビリティが相対的に低下していることが分かった。また、急性貧血の誘導や *in vitro* での ApoE 添加によってこれらの領域のアクセシビリティはさらに低下していた。更に、Erg 阻害剤を添加して正常マウス造血幹細胞を培養すると、コントロールと比較して有意に赤血球分化能の亢進が認められた。

【考 察】

急性貧血誘導により、未分化な造血幹細胞において Gata1 や EPO レセプターのような既知の赤血球分化制御因子の関与が認められないにも関わらず、赤血球への分化能が増加することが明らかとなった。これにより、急性貧血時の造血幹細胞では新たな制御因子の存在が考えられ、我々は ApoE を起点とした脂質代謝がその役割を果たしていることを明らかにした。また、詳細な分子機構の解析により、急性貧血の誘導や *in vitro* での ApoE 添加によって Erg 遺伝子の結合配列を含む領域のアクセシビリティが相対的に低下していることが分かった。Erg 遺伝子の発現自体は貧血誘導によって変化しておらず、急性貧血誘導時は造血幹細胞に存在する Erg の標的領域への結合が一時的に低下することで巨核球造血が減少し、相対的に赤血球分化が亢進している可能性が示唆された。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

以上の研究成果は、ApoE を起点とした脂質代謝による新しい赤血球分化の制御機構と考えられ、既存の薬剤に対して不応であった重度貧血に対する新たな治療法の開発に繋がると期待される。

【参考・引用文献】

Baldrige, M.T., King, K.Y., Boles, N.C., Weksberg, D.C., and Goodell, M.A. (2010). Quiescent haematopoietic stem cells are activated by IFN- γ in response to chronic infection. *Nature* 465, 793–797.

Bennett, L.F., Liao, C., Paulson RF. (2018). Stress erythropoiesis model systems. *Methods Mol Biol.* 1698, 91–102.

Buenrostro, J.D., Giresi, P.G., Zaba, L.C., Chang, H.Y., and Greenleaf, W.J. (2013). Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nat Methods* 10, 1213–1218.

Knudsen, K.J., Rehn, M., Hasemann, M.S., Rapin, N., Bagger, F.O., Ohlsson, E., Willer, A., Frank, A.K., Søndergaard, E., Jendholm, J., et al. (2015). ERG promotes the maintenance of hematopoietic stem cells by restricting their differentiation. *Genes Dev.* 29, 1915–1929.

Kruse, E.A., Loughran, S.J., Baldwin, T.M., Josefsson, E.C., Ellis, S., Watson, D.K., Nurden, P., Metcalf, D., Hilton, D.J., Alexander, W.S., et al. (2009). Dual requirement for the ETS transcription factors Fli-1 and Erg in hematopoietic stem cells and the megakaryocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 13814–13819.

Loughran, S.J., Kruse, E.A., Hacking, D.F., de Graaf, C.A., Hyland, C.D., Willson, T.A., Henley, K.J., Ellis, S., Voss, A.K., Metcalf, D., et al. (2008). The transcription factor Erg is essential for definitive hematopoiesis and the function of adult hematopoietic stem cells. *Nat Immunol* 9, 810–819.

Miharada, K., Hiroshima, T., Sudo, K., Nagasawa, T., and Nakamura, Y. (2005). Lipocalin 2 functions as a negative regulator of red blood cell production in an autocrine fashion. *FASEB J.* 19, 1881–1883.

Mossadegh-Keller, N., Sarrazin, S., Kandalla, P.K., Espinosa, L., Stanley, E.R., Nutt, S.L., Moore, J., and Sieweke, M.H. (2013). M-CSF instructs myeloid lineage fate in single haematopoietic stem cells. *Nature* 497, 239–243.

Ng, A.P., Loughran, S.J., Metcalf, D., Hyland, C.D., de Graaf, C.A., Hu, Y., Smyth, G.K., Hilton, D.J., Kile, B.T., and

Alexander, W.S. (2011). Erg is required for self-renewal of hematopoietic stem cells during stress hematopoiesis in mice. *Blood* 118, 2454–2461.

Orkin, S.H. and Zon, L.I. (2008). Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 132, 631–44.

Piedrahita, J.A., Zhang, S.H., Hagaman, J.R., Oliver, P.M., and Maeda, N. (1992). Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4471–4475.

Pietras, E.M., Mirantes-Barbeito, C., Fong, S., Loeffler, D., Kovtonyuk, L.V., Zhang, S., Lakshminarasimhan, R., Chin, C.P., Techner, J.M., Will, B., et al. (2016). Chronic interleukin-1 exposure drives haematopoietic stem cells towards precocious myeloid differentiation at the expense of self-renewal. *Nat Cell Biol.* 18, 607–618.

Pimkin, M., Kossenkov, A.V., Mishra, T., Morrissey, C.S., Wu, W., Keller, C.A., Blobel, G.A., Lee, D., Beer, M.A., Hardison, R.C., et al. (2014). Divergent functions of hematopoietic transcription factors in lineage priming and differentiation during erythro-megakaryopoiesis. *Genome Res.* 24, 1932–1944.

Reddy, E.S., Rao, V.N., and Papas, T.S. (1987). The erg gene: a human gene related to the ets oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 6131–6135.

Sender, R., Fuchs, S., and Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* 14, e1002533.

Stankiewicz, M.J., and Crispino, J.D. (2009). ETS2 and ERG promote megakaryopoiesis and synergize with alterations in GATA-1 to immortalize hematopoietic progenitor cells. *Blood* 113, 3337–3347.

Subramanian, A, Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., et al. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 15545–15550.

Takizawa, H., Fritsch, K., Kovtonyuk, L.V., Saito, Y., Yakkala, C., Jacobs, K., Ahuja, A.K., Lopes, M., Hausmann, A., Hardt, W.D., et al. (2017). Pathogen-Induced TLR4-TRIF Innate Immune Signaling in Hematopoietic Stem Cells Promotes Proliferation but Reduces Competitive Fitness. *Cell Stem Cell* 21, 225–240.e5.

Yamashita, M., and Passegué, E. (2019). TNF- α coordinates hematopoietic stem cell survival and myeloid regeneration. *Cell Stem Cell* 25, 357–372.