

ミトコンドリア恒常性による造血幹細胞維持機構の解析

東京女子医科大学 医学部
顕微解剖・形態形成分野 教授
石津 綾子

健康な造血システムにおいて、骨髄における造血幹細胞 (hematopoietic stem cell: 造血幹細胞) が分化・増殖せずに維持されることが不可欠である。一方、造血幹細胞は胎生期・新生児期に増殖性を示し、生体に必要な造血幹細胞数を獲得したのち、成人期にはストレス造血時に備え、自己複製能を保持し、細胞周期静止期状態で維持されている。炎症などのストレス造血時に再び増幅した造血幹細胞はストレス造血からの回復後、再度静止状態へもどる。一個体において、一つの造血幹細胞は最小限の増殖回数しか経験せず、増殖に関わるDNAダメージや代謝亢進による活性酸素種産生など様々なストレスより保護されている。この様に造血幹細胞は一生涯を通し、様々な細胞運命の選択に直面する。造血幹細胞の細胞運命決定は細胞内因性と環境からの外因性要因があげられ、その相互的作用にて決定されると考えられている。生体内で産生されるサイトカイン、Thrombopoietin (Thpo)は外因性要因として骨髄造血幹細胞の維持及び分化・増殖の双方に関与しているが、その詳細なメカニズムや制御機構は解明されていない。当研究は、Thpoによるエネルギー代謝制御に焦点を当て、ミトコンドリアの恒常性による造血幹細胞の骨髄内での維持と分化の運命決定制御機構を解析する。当研究の結果は、再生不良性貧血など造血幹細胞の機能不全をきたす様々な血液疾患の病態解明及び新規治療開発に応用することが可能と考えている。

多系統の血球への分化能を有する造血幹細胞は、比較的早期に巨核球に直接分化することが知られている。報告者はこれまで、造血幹細胞がどのように巨核球系統の細胞に分化するのかを解析した。Thpoシグナルは造血幹細胞のミトコンドリア活性を増加させ、また、ミトコンドリア活性が高い造血幹細胞は巨核球系統への分化が有意に高いことを確認した。これらより、造血幹細胞の巨核球分化にはThpoシグナルを介したミトコンドリア代謝制御が強く関わっていることを報告した (Cell Reports 2018)。また、成人期のThpo遺伝子欠損マウスやMpl遺伝子欠損マウスにおいて、造血幹細胞の増殖障害より、造血幹細胞数の著しい減少が認められる (Qian CSC 2007)。また、Thpoシグナルの活性化は造血幹細胞の静止性の維持や自己複製

の促進を行うことも報告されている。

成人期に造血幹細胞が存在する骨髄の微小環境(ニッチ)は他組織と比較し酸素濃度が低く、生体内において造血幹細胞は低酸素条件下で維持されており、静止期にある造血幹細胞は主に嫌氣的な解糖系に依存したエネルギー産生を行い、好氣的にATPを産生するミトコンドリアでの酸化リン酸化 (oxidative phosphorylation: OXPHOS)は抑制されていると考えられてきた。これに伴い、ミトコンドリアOXPHOSを反映するミトコンドリア膜電位の高い造血幹細胞は競合的骨髄移植実験にてミトコンドリア膜電位の低い造血幹細胞と

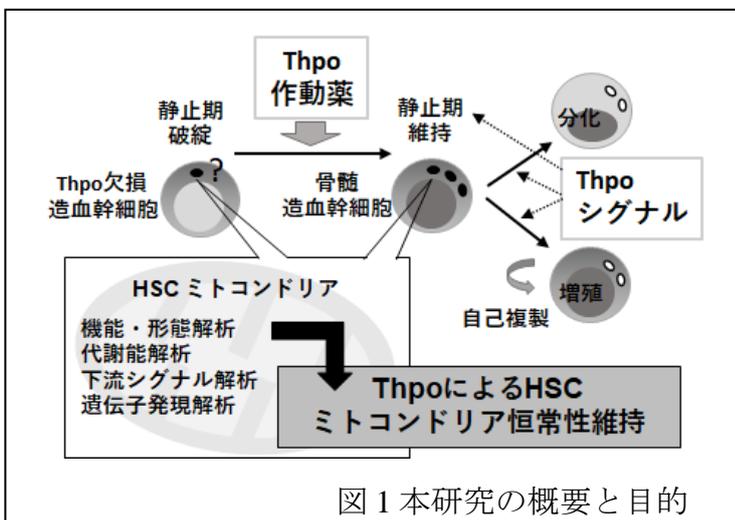


図1 本研究の概要と目的

比較し競合的骨髄移植実験にてミトコンドリア膜電位の低い造血幹細胞と比較し造血幹細胞能が低い (Simsek, Cell Stem Cell 2010)。しかしながら、近年、前駆細胞と比較し、造血幹細胞はミトコンドリア体積量が高いことが指摘された (de Almeida, Cell Stem Cell 2017)。また、報告者らは、造血幹細胞能が低い細胞内にミトコンドリアを多く保有する造血幹細胞は幹細胞能が高いことを報告した (Takahara, Blood Adv 2019)。しかし、幹細胞能が高い造血幹細胞はミトコンドリア活性が低いことは定説からは、ミトコンドリア活性を高めるThpoの作用はThpoの幹細胞能維持機能と矛盾する。よって、本研究では、Thpoシグナルがどのように造血幹細胞のミトコンドリア代謝を制御し、造血幹細胞の維持・分化のバランスを保っているのか不明な点が多く、本研究はThpoの作用メカニズムを明らかにしていく (図1) ことを目的とした。

報告者は、Thpoが造血幹細胞に与える影響をThpo遺伝子欠損マウスモデルを作成し検証した。過去の報告と同様、成人期Thpo遺伝子欠損マウスでは著明な血小板減少とともに通常の10分の1程度まで造血幹細胞数の減少を認めた。また、過去の報告と同様、Thpo遺伝子欠損マウス由来の造血幹細胞の静止期頻度の有意な低下していた。細胞周期の状態を詳細に解析した結果、Thpo遺伝子欠損マウス由来造血幹細胞ではSubG1期の頻度の有意な上昇がみられ、Annexin V染色性の上昇もみられたため、Thpo欠損に伴い、

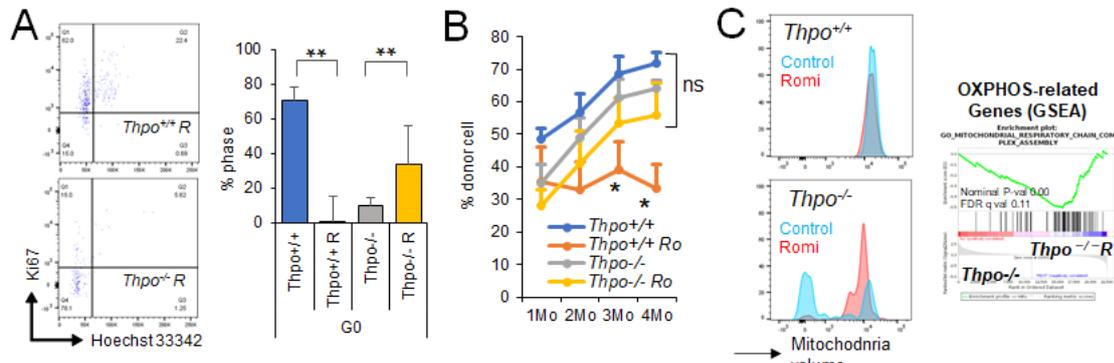


図2: (A) *Thpo*^{-/-} HSCはRomiplostim(R)投与により、Hoechst-Ki67-のG0期(静止期)にある頻度が有意に増加する。(B) 競合的骨髄移植により*Thpo*^{-/-} HSCはRomiplostim投与後も高い再構築能を示した。(C) 静止性を獲得とともに*Thpo*^{-/-} HSCのmitochondria体積量や遺伝子発現が改善する

造血幹細胞のアポトーシス誘導が促進することが示唆された。これらのことは、*Thpo*欠損による造血幹細胞数の減少は、*Thpo*欠損に伴う静止期性維持の破綻とともに、造血幹細胞における増幅障害とアポトーシス誘導が根底にあることを示している。さらに、*Thpo*遺伝子欠損マウスの造血幹細胞機能が*Thpo*作動薬のRomiplostimにより回復可能かを検証した。*Thpo*遺伝子欠損マウス及び、野生型マウスにRomiplostimを連日投与し、造血の反応性を解析した。Romiplostimを10日間連続で静脈投与したところ、野生型マウスではRomiplostim投与とともに増殖期造血幹細胞の増加とそれに伴う静止期造血幹細胞の減少が認められた(図2A)。*Thpo*遺伝子欠損マウスでも、造血幹細胞数の増加がみられたものの、増殖期ではなく静止期にある造血幹細胞数の増加がみられた。また、*Thpo*遺伝子欠損マウス由来の造血幹細胞の競合的骨髄移植を行ったところ、野生型マウスと比較し著変なくレシピエントマウスに生着することを認めた(図2B)。同時に、Romiplostimを投与した*Thpo*遺伝子欠損マウス由来の造血幹細胞も高い生着率を示していた。これらのことは、*Thpo*遺伝子欠損マウス由来の造血幹細胞は造血幹細胞能を*Thpo*欠損下においても保持し、野生型マウス由来造血幹細胞と異なった*Thpo*反応性を有していることを示している。これらの結果をまとめ、2021年にBlood誌(Nakamura-Ishizu A, Chin WLD, Matsumura T, Tan DQ, Mochizuki-Kashio M, Jianwen D, Suda T. Prolonged maintenance of hematopoietic stem cells that escape from thrombopoietin deprivation. . Blood 2021 May 13;137(19):2609-2620.)に報告した。

*Thpo*欠損下また、Romiplostim投与後の造血幹細胞の遺伝子発現解析を*Thpo*遺伝子欠損および野生型マウスから分離した造血幹細胞のRNAシーケンス解析で行った。その結果、*Thpo*欠損造血幹細胞ではミトコンドリア代謝、オートファジー、タンパク産生など広く代謝に関わる遺伝子発現の変動が認められた。同時にこれらの遺伝子発現パターンはRomiplostim投与により野生型に近寄ることを認めた。また、*Thpo*遺伝子欠損マウス由来の造血幹細胞は野生型造血幹細胞と比較し、ミトコンドリア体積量が低く、細胞内のATP濃度も低値を示したことから、*Thpo*シグナルの欠損により、造血幹細胞のエネルギー産生が障害されると考えられた(図2C)。Romiplostim投与後の*Thpo*遺伝子欠損マウス由来造血幹細胞ではミトコンドリア体積量の増幅とATP産生の増加がみられたが、活性酸素種の増加は野生型マウスのRomiplostim投与時に見られる程度と比較し、少ない傾向にあった。これらのことは、*Thpo*シグナルの回復に伴う造血幹細胞の静止性の獲得には一定のエネルギー産生と細胞内代謝状態の正常化が必要であることを示唆していた。また、*Thpo*欠損下の造血幹細胞のエピゲノム状態を解析するため、染色体のAccessibilityを解析するATACシーケンス解析を行った。この結果、*Thpo*遺伝子欠損マウス由来の造血幹細胞は、野生型マウスの由来の造血幹細胞と比較して有意にopen chromatin領域が少ないことを認めた。また、有意にaccessibilityに違いがあった領域においては*Thpo*-Mplをはじめとしたサイトカインシグナル下流因子の発現調整に関わる領域が検出された。これらのことから*Thpo*シグナルが、造血幹細胞のepigenetic制御に関与し、シグナル下流因子の発現制御を通して、*Thpo*シグナル応答性を規定している可能性が示唆された。今後この解析をさらに進めていく方針である。

さらに、*Thpo*遺伝子欠損マウス造血幹細胞のRNA sequence 結果を詳細に解析した。その結果、*Thpo*欠損マウス由来の造血幹細胞において鉄代謝関連遺伝子の有意なEnrichmentが認められた(図3A)。*Thpo*欠損マウス由来の造血幹細胞は正常マウスと比較し反応性のある細胞内遊離鉄の減少が認められた。また、*Thpo*欠損マウス由来造血幹細胞は野生型マウスと比較しミトコンドリア機能活性が低いことを認めた。鉄イオンはミトコンドリアに集積し、その機能に関わることが知られていることから、*Thpo*欠損マウスと野生型マウスのミトコンドリア鉄含有量を比較した。その結果、*Thpo*欠損マウス由来の造血幹細胞では野生型造血幹細胞と比較してミトコンドリア鉄含有量が有意にひくく、Romiplostim投与とともに変動しにくいことを認めた。さらにミトコンドリア鉄含有量と造血幹細胞幹細胞能を比較検証した(図3B)。造血幹細胞において、ミトコンドリア含有量の高い群は低い群と比較して生体内外における幹細胞能が低い結果をえた。また、ミトコンドリア含有量の高い造血幹細胞はミトコンドリアやライソソームなど細胞内小器官を多く保有していることを認めた(図3C)。これらの結果は*Thpo*シグナルによる造血幹細胞機能調整がミトコンドリア鉄調整と密接に関連していることを示唆していた。現在、造血幹細胞のミトコンドリア鉄量がどの様に調整されているのか、特にミトコンドリア上の鉄transporterタンパク発現、阻害を通してメカニズムをさらに検証している。また、鉄過剰、鉄欠乏モデルにおける造血幹細胞機能の変化と*Thpo*シグナルの関連性も検証している。本研究結果は、今後、論文にまとめ、

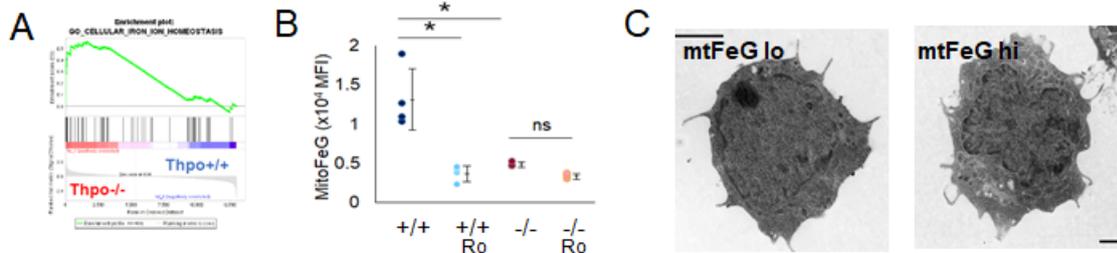


図3: (A) *Thpo*^{-/-}-HSC RNAseq 解析における鉄関連遺伝子の Enrichment. (B) *mitoFeG*プローブによる *Thpo*^{+/+}と *Thpo*^{-/-}-HSC の染色。 *Thpo*^{-/-}-HSC は *MtFeG* が低く、*Romiplostim* 投与によって変動が少ない。(C) *mtFeG*^{hi} HSC は電子顕微鏡像にて *mtFeG*^{lo} HSC と比較してオルガネラ構造が多く複雑である。

発表予定である。

一定の幹細胞のプールを維持するために、幹細胞は過度に増殖することなく細胞周期静止期の状態で維持される。この様な幹細胞の維持機構は造血組織のみならず、様々な組織幹細胞や癌幹細胞の維持機構として多く研究されている。造血幹細胞においては、様々な造血サイトカインの内、*Thpo* を含めたごく少数のサイトカインに静止期の維持機能があることが報告されている (Yoshihara *CSC* 2007, Qian *CSC* 2007)。しかしながら、*Thpo* 作動薬にて造血幹細胞を刺激した際、造血幹細胞は細胞周期静止期状態より増殖期に誘導され、自己複製が促進されることも報告されている (Walter et al. *Nature* 2015)。同時に、造血幹細胞から多分化前駆細胞を経由することなく直接巨核球に分化するという内容のいくつかの報告がなされている (Yamamoto *Cell* 2013, Sanjuan-Pla *Nature* 2013)。造血幹細胞の制御には *Thpo* は不可欠な因子として確立されているものの、*Thpo* シグナルがどの様に造血幹細胞の静止期維持と自己複製増殖をバランスよく制御しているのかは明らかになっていない。一方、休止状態にあるにもかかわらず、造血幹細胞は造血前駆細胞と比較し多くのミトコンドリアを保有することも報告され (de Almeida *CSC* 2017)、造血幹細胞におけるミトコンドリアの状態も解析され始めているが、ミトコンドリアの様々な機能がどの様に制御され、どの様に造血幹細胞の維持・分化に関わるのかは解明されていない。また、近年、再生不良性貧血など骨髄不全症候群の治療に *Thpo* 作動薬が使用され始めている (Young *NEJM* 2018, Kao *Sci Transl Med* 2018) が、*Thpo* シグナルがどの様に障害された造血幹細胞の機能を回復させるのか詳細な解析はされていない。本研究を遂行することで、これまでミトコンドリア代謝に依存することが少ないとされてきた造血幹細胞の維持機構とは異なり、ミトコンドリアの代謝状態を解析することで、*Thpo* によるミトコンドリアのエネルギー恒常性に依存した幹細胞能制御という新分野を開拓できると考えている。