

代謝プログラムの理解に基づいた幹細胞操作技術の開発

慶應義塾大学 医学部 坂口光洋記念講座

(発生・分化生物学)

田久保 圭誉

1. はじめに

幹細胞は自己複製と多分化能を持つ細胞で組織ヒエラルキーの頂点で組織恒常性を維持する一方で、細胞老化やがん化における作用点としても知られている。幹細胞の恒常性の維持には微小環境(ニッチ)からのシグナルが重要であり、特に哺乳類成体の骨髄にいる造血幹細胞では他の幹細胞と異なって低酸素環境と低酸素応答シグナルが重要であることを報告してきた(Takubo et al. 2010, 2012)。さらに、新たな造血幹細胞の特性として、骨髄低酸素ニッチで細胞周期を静止状態にするという非古典的なニッチ因子である低酸素環境による制御メカニズムが存在するを見出した。しかし、造血幹細胞の代謝特性と、それを規定する分子機構には不明な点が多い。また、感染や抗がん剤、サイトカイン刺激による造血ストレス負荷や老化、がん化といった状況における代謝動態の変化は明らかではない。そこで本研究提案では造血幹細胞で作動している代謝制御機構とその時間的・空間的あるいは状況依存的な変遷を明らかにし、得られた知見に基づいて造血器系幹細胞の制御技術を開発することを目的として研究を進めた。

2. 方法

本研究に先立って造血幹細胞と造血前駆細胞、それに分化血球細胞を用いたCE-TOFMSによる細胞内代謝産物の網羅的な解析から、低酸素環境にある骨髄の造血幹細胞は解糖系に依存したエネルギー産生特性を保持していることを見出しており、この特性はHIF-1 α によって維持されていることを確認していた。加えて、造血幹細胞ではピルビン酸をアセチルCoAへ変換する反応を触媒するピルビン酸脱水素酵素(PDH)がリン酸化されて不活性化していることを見出した。しかしその責任となる分子機構は明らかではなかった。予備的検討からPDHをリン酸化するPDH kinase(PDK)遺伝子ファミリーのうち、PDK2とPDK4がHIF-1 α 量によって制御されていることを見出したため、本研究計画では『PDK2とPDK4を介したPDHの抑制』という代謝チェックポイントが造血幹細胞の代謝特性維持にいかに関与しているか、ノックアウトマウスを用いた血液学的解析と造血幹細胞の評価を行い、引き続き(2)低分子化合物を用いた代謝制御メカニズム操作と、それによる造血幹細胞への影響を評価し、最後に(3)白血病幹細胞、とりわけ慢性骨髄性白血病(chronic myeloid leukemia; CML)のマウスモデルにおける低酸素応答シグナルが白血病幹細胞の形成・維持や機能に果たす役割についての実験検討を行った。

3. 結果

(1) PDK2/4ダブルノックアウトマウスの作出とその造血幹細胞機能解析

PDK2およびPDK4ノックアウトマウス(共同研究先であるIndiana大学Robert A. Harris博士から供与)を交配しPDK2/4ダブルノックアウトマウスを作出し、造血幹細胞の血液学的異常の検索と代謝プロファイルの異常について検討した。その結果、PDK2/4ダブルノックアウトマウスは軽度の貧血傾向を認めた。さらに、造血幹細胞の寿命について連続移植モデルを用いて詳細に解析を行った結果、ダブルノックアウトマウス由来の造血幹細胞を移植されたレシピエントマウスは1次移植の後期と、2次移植において末梢血キメリズムと骨髄キメリズムの低下を認めた。そして、3次移植においてはほとんど末梢血に寄与できないことを確認した。さらに、連続移植を繰り返すとダブルノックアウトマウス由来の造血幹細胞において、細胞老化の際に上昇することが知られているp16Ink4aの発現が上昇することが見出された。すなわち、PDK2とPDK4の欠損は造血幹細胞の自己複製能を障害して、最終的に細胞老化様の形質を示すことを見出した。また、ダブルノックアウトマウスの造血幹細胞では細胞内ピルビン酸量やLDH活性の低下を認め、解糖系代謝特性が障害されていることを確認した。その一方でPDHのリン酸化が低下し、好氣的エネルギー産生に重要な役割を果たすミトコンドリアの肥大を認めた。すなわち代謝特性が嫌氣的なものから好氣的代謝へとシフトしていることが示唆された。また、定常状態における造血幹細胞の細胞周期静止期状態が失われており、細胞周期への侵入が促進されていることを見出した。

(2) 低分子化合物によるPDH/PDK代謝チェックポイントの操作による幹細胞制御法の開発
PDK2/4ダブルノックアウトマウスによるPDKのloss-of-function実験に並行して、PDHを阻害することでPDK様の効果を発揮する化合物1-aminoethylphosphinic acid (1-AA)を用いてマウス造血幹細胞を培養中で処理した。その結果、短期間の1-AA処理によって造血幹細胞の解糖系活性が維持されることが見出された。1-AA処理を長期間にわたって行った結果、通常の培養中では容易に増殖して細胞周期静止状態を失うところが、1-AA処理によって細胞周期進行の抑制効果が認められ長期にわたって未分化な形態と表面マーカープロファイルを保つことに成功した。さらに通常の培養では幹細胞活性を維持できない1か月間の培養であっても骨髄移植後にレシピエントマウスの骨髄再構築能と末梢血キメリズムへの寄与する能力を維持することが可能になった。

(3) 白血病幹細胞の維持における低酸素シグナルの寄与の検討と治療標的としての有効性の検証

造血幹細胞が融合遺伝子BCR/ABLによってがん化することで発症するCMLの白血病幹細胞における低酸素シグナルの寄与の解明を図った。CMLのモデルにはレトロウイルス(p210BCR/ABL)による造血幹・前駆細胞からの白血病誘導モデルを使用し、低酸素シグナルの影響を検討した。その結果、HIF-1 α 欠損下で作成したCMLモデルでは白血病発症が対照群に比べて遅延し、骨髄や脾臓のFACS解析からCML幹細胞機能の形成・維持にはHIF-1の活性が必要であることが示唆された。さらに、CML幹細胞は正常の造血幹細胞よりも極度の低酸素状態にあることが低酸素プローブpimonidazoleを用いた検討から明らかになり、CML幹細胞は特殊な酸素代謝を行う微小環境にあることが示唆された。

4. まとめ

本研究から、造血幹細胞は低酸素環境である骨髄においてPDK2とPDK4を活性化し、造血幹細胞の解糖系代謝特性と細胞周期静止期を維持していることが見出された。また、PDK2とPDK4は単に解糖系特性を維持するというよりは好氣的なミトコンドリアの代謝を抑制し、ミトコンドリアから産生される活性酸素種を抑制する代謝チェックポイントとして機能していることが示唆された。この代謝チェックポイントは、造血幹細胞の寿命を規定するはたらきをしていることも見出した。一方、PDK様の機能を果たす低分子化合物を用いて培養中の造血幹細胞でこのスイッチを人為的に活性化すると、造血幹細胞の解糖系代謝特性の増強と細胞周期の抑制が可能であることが明らかとなった。この際、長期培養後も移植生着能を維持できたため、代謝チェックポイントの人工調節は新しい造血幹細胞の操作法となりうることが確認できた。今後はヒト造血幹細胞の体外維持・増幅の新しい手法となりうることが期待される。一方、CMLモデルを用いた検討から、造血幹細胞同様白血病幹細胞も低酸素シグナルをその維持に必要とするものの、低酸素状態が正常のものより強度であることが見出された。この酸素化状態の違いが正常幹細胞を防護したまま白血病幹細胞を特異的に標的とする治療の手がかりとなる可能性がある。以上のように本研究によって正常の造血幹細胞の代謝特性を維持する分子機構としての『PDK2とPDK4を介したPDHの抑制』という代謝チェックポイントの重要性が明らかになり、さらに低分子化合物によってその人為的操作法が可能となり、白血病幹細胞との代謝特性の違いへの示唆も得られた。

5. 参考文献(*corresponding author)

*Takubo K, Suda T. Roles of the hypoxia response system in hematopoietic and leukemic stem cells. *Int J Hematol.* 95:478-83, 2012

*Takubo K, Goda N, Yamada W, Iriuchishima H, Ikeda E, Kubota Y, Shima H, Johnson RS, Hirao A, Suematsu M, *Suda T. Regulation of the HIF-1 α level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell.* 7:391-402, 2010

*Takubo K, Nagamatsu G, Kobayashi CI, Nakamura-Ishizu A, Kobayashi H, Ikeda E, Goda N, Rahimi Y, Johnson RS, Soga T, Hirao A, Suematsu M, *Suda T. Regulation of glycolysis by Pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells.

Cell Stem Cell. 12:49-61, 2013