

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09455

研究課題名(和文) Prdm16を介したミトコンドリア代謝経路の造血幹細胞制御における役割の解明

研究課題名(英文) Role of Prdm16 in hematopoiesis via mitochondrial metabolic pathway

研究代表者

亀崎 健次郎 (KAMEZAKI, KENJIRO)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：70380433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究にて、ミトコンドリア代謝経路が造血幹細胞の維持に機能的にも働いていることが示された。また、ヒト白血病幹細胞を用いた解析で、白血病幹細胞が細胞の生存に対して不利に働く活性酸素種に対応するために、正常造血幹細胞に比べて、還元型グルタチオンを大量に産生しており、それは、アミノ酸トランスポーターの発現亢進を介している可能性を示した。このことは、白血病に対する副作用の少ない標的治療の可能性を示す重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：We revealed that mitochondrial metabolic pathway plays an important role in the maintenance of hematopoietic stem cells. Leukemia stem cells produce glutathione-SH to compete with reactive oxygen species that can be harmful to stem cells. That can be provided via increased expression of amino acid transporters. These findings can lead to establish the targeted therapy of leukemia without any severe adverse effects.

研究分野：血液内科学

キーワード：白血病幹細胞

1. 研究開始当初の背景

申請者は、t(1;3)(p36;q21)を有する急性骨髄性白血病 (AML)の融合遺伝子の一部である Prdm16 が造血幹細胞の自己複製に重要であることを示してきた (Blood, 2011)。Prdm16 欠損胎仔肝細胞では、造血幹細胞分画が減少しており、同系移植による造血再構築能も低下していた。つまり、Prdm16 は造血幹細胞の維持、自己複製を正に制御していると考えられる。また、予後不良 AML において、Prdm16 の発現が上昇しているとの報告も見られ、Prdm16 は白血病の発症に関与していることが示唆されている。Prdm16 は褐色脂肪細胞分化に必須の調節因子であり、ミトコンドリアの生合成を正に調節している。申請者は、以下に述べるように、Prdm16 はミトコンドリアの動的変化、とりわけ、融合、分裂を調節することによって、造血幹細胞の維持に関与していることを見出した。

ミトコンドリアは好氣的呼吸により真核細胞のほとんどのエネルギーを産生しているだけでなく、脂質やステロイドホルモンなど多様な代謝に関与している。またアポトーシス制御において中心的な機能を持つこと、ATP 合成に伴って副次的に産生される酸化ストレスの主要な発生源として多様な病態に関与していると考えられるが、ミトコンドリアの形態変化の生理的意義や分子機構に関しては不明な点が多い。

2. 研究の目的

幹細胞の性質を規定する転写因子は、下流分子の発現を調節し、幹細胞の固有性を維持するためのエネルギー代謝プログラムを活性化する。申請者はミトコンドリア代謝経路が造血幹細胞の維持に重要であるという知見を得ているが、造血幹細胞維持におけるミトコンドリア代謝の詳細な役割は未だ不明である。本研究は、造血幹細胞及び白血病幹細胞維持におけるミトコンドリア代謝の

役割を解明することを目的とする。また、本研究により造血幹細胞及び白血病幹細胞特異的な代謝プログラムが解明され、幹細胞特異的な標的治療や、体外での増幅技術の革新につながるものと確信する。

3. 研究の方法

(1)ミトコンドリア分裂阻害による造血幹細胞体外増幅の可能性

MDivi-1 投与によるミトコンドリア分裂の抑制、すなわちミトコンドリア融合の促進が造血幹細胞機能へ与える影響を、*in vitro*でのコロニー形成能、競合的骨髄移植及び連続移植を行い評価し、体外培養条件下での造血幹細胞の維持や増幅の可能性を検討する。申請者は、予備実験にて、Mdivi-1 存在下での液体培養にて、CD150⁺Flt3⁻LSK の長期造血幹細胞分画が、培養7日目にも維持されていることを確認している。すなわち、この表面抗原上は長期造血幹細胞の特徴を有する細胞分画が、実際に長期造血支持能を有するかを *in vitro*でのコロニー形成能、競合的骨髄移植及び連続移植を行い評価する。

(2)ヒト造血幹細胞や白血病幹細胞におけるミトコンドリア代謝の役割

ヒト骨髄 CD34⁺38⁻分画を用いて、ヒト造血幹細胞や白血病幹細胞での Prdm16 の発現、及び、ミトコンドリアの膜構造の動的変化を Mitotracker を用いて評価する。マウス造血幹細胞と同様にヒト造血幹細胞や白血病幹細胞分画でミトコンドリアの融合の促進が見られた場合は、MDivi-1 による体外増幅、維持の可能性を、*in vitro*でのコロニー形成能や、免疫不全マウスへの移植を用いて検討する。当科において、C57/BL6 をバックグラウンドに持つ新規免疫不全マウス (BRGS マウス)を開発しており (Yamauchi T, et al, Blood, 2013)、従来の NOG ラインよりも長期の造血能の評価が可能となっている。また、MDivi-1 によって維持される幹細胞分画と、

無刺激状態での幹細胞分画との遺伝子発現変化をマイクロアレイで検討し、ミトコンドリア融合による幹細胞維持に関わる遺伝子群を同定し、新規造血幹細胞マーカーの探索や、標的治療の可能性の基盤とする。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリア分裂阻害による造血再構築能の回復

ミトコンドリア分裂阻害剤である Mdivi1 存在下で培養した Prdm16+/- 骨髄細胞、野生型 (Prdm16+/+) 骨髄細胞を用いて、競合的骨髄移植を行った。Mdivi1 を投与した Prdm16+/- 骨髄細胞では、競合的骨髄移植後のドナー由来の造血細胞をより多く認めており、低下した Prdm16+/- 骨髄細胞の造血再構築能は、Mdivi1 投与により回復した。

また、野生型骨髄細胞を用いて、Mdivi1 存在下で、7日間培養したのち、競合的骨髄移植を施行した。Mdivi1 存在下で培養した骨髄細胞では、競合的骨髄移植後のドナー由来細胞が有意に増加しており、長期培養後の造血再構築能が維持されていた。ミトコンドリア分裂阻害剤である Mdivi1 を加えることで、低下した Prdm16 欠損骨髄細胞の造血再構築能は回復し、また、長期培養での骨髄細胞の造血再構築能が保たれたことにより、ミトコンドリアの分裂の阻害が、機能的にも造血幹細胞能の回復、維持に働いていることが示された。

(2) ヒト白血病幹細胞でのエネルギー代謝プロファイルの解析

我々は今回、正常造血幹細胞分画としてヒト骨髄 CD34+細胞と、白血病幹細胞分画としてヒト AMLCD34+細胞において、CE-TOF/CE-QpQ MS 質量分析装置を用いて、解糖系、ミトコンドリア呼吸経路、グルタチオン代謝、アミノ酸代謝経路などの116種類の代謝物質について網羅的メタボローム解析を行った。解糖系は、グルコースから中間代謝産物

である Fructose 1, 6-biphosphate (F1, 6BP), Phosphoenolpyruvate (PEP), Pyruvate を経て、嫌氣的代謝経路として Lactate を経て、ATP が産生され、好氣的ミトコンドリア代謝経路として Pyruvate から、Acetyl-CoA、Citrate を経て、最終産物として ATP が産生される。ヒト AMLCD34+細胞では、F1, 6BP、PEP、Pyruvate の産生が高く、ヒト骨髄 CD34+細胞よりも糖代謝が亢進していると考えられ、Lactate はヒト骨髄 CD34+細胞で高く、Citrate はヒト AMLCD34+細胞で高いため、ヒト AMLCD34+細胞はグルコースをより好氣的に代謝している可能性が考えられた。また、酸素消費速度 (Oxygen Consumption Rate; OCR)、活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS) の産生量ともにヒト AMLCD34+細胞で高く、ヒト AMLCD34+細胞はヒト骨髄 CD34+細胞も好氣的な代謝を行っているという結果に矛盾しないことが裏付けられた。好氣的グルコース代謝によって副次的に産生される ROS は酸化ストレスとして細胞の生存には悪影響を与えることが考えられるため、AML 細胞の生存において、ROS に対抗する手段として、抗酸化物質であるグルタチオン代謝に着目した。ヒト AMLCD34+細胞は、ヒト骨髄 CD34+細胞よりも多くの還元型グルタチオン (GSH) を有しており、好氣的代謝によって産生される ROS に対抗していると考えられる。また、当研究室の Kikushige (Cancer Cell, 2013) らは CD34+CD38- 造血幹細胞と CD34+CD38- 白血病幹細胞でのアミノ酸トランスポーターの遺伝子発現プロファイルを検証しており、ASCT2 が白血病幹細胞で 4.13 倍発現が高いことを見出しており、今回の解析で実際に、CD45dim AML 細胞で、正常骨髄 CD34+細胞と比較し、ASCT2 陽性細胞が増加しており、ASCT2 の発現が亢進していることを確認した。ヒト AML 細胞では、好氣的代謝により発生し、細胞の生存に対して不利に働く ROS に対応するためにグルタチオン、とりわ

け還元型グルタチオン (GSH)を大量に産生しており、それは、アミノ酸トランスポーター(ASCT2)の発現亢進を介している可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

Uchida M, Nakamura T, Hata K, Watanabe H, Mori Y, Kato K, Kamezaki K, Takenaka K, Shiratsuchi M, Hosohata K, Miyamoto T, Akashi K Antiemetic efficacy and safety of granisetron or palonosetron alone and in combination with a corticosteroid for ABVD therapy-induced nausea and vomiting. J Pharm Health Care Sci. 査読有 2018 DOI: 10.1186/s40780-017-0097-4

Sasaki K, Mori Y, Yoshimoto G, Sakoda T, Kato K, Inadomi K, Kamezaki K, Takenaka K, Iwasaki H, Maeda T, Miyamoto T, Akashi K Successful treatment of Ph ALL with hematopoietic stem cell transplantation from the same HLA- haploidentical related donor of previous liver transplantation Leuk Lymphoma. 査読有 1-3, 2017 DOI: 10.1080/10428194.2017.1403021

Uchida M, Mori Y, Nakamura T, Kato K, Kamezaki K, Takenaka K, Shiratsuchi M, Kadoyama K, Miyamoto T, Akashi K Comparison between Antiemetic Effects of Palonosetron and Granisetron on Chemotherapy-Induced Nausea and Vomiting in Japanese Patients Treated with R-CHOP. Biol Pharm Bull. 査読有 (40) 1499-1505,2017 DOI: 10.1248/bpb.b17-00318

Sakoda T, Kanamitsu Y, Mori Y, Sasaki K, Yonemitsu E, Nagae K, Yoshimoto G, Kamezaki K, Kato K, Takenaka K, Miyamoto T, Furue M, Iwasaki H, Akashi K Recurrent Subcutaneous

Sweet's Disease in a Myelofibrosis Patient Treated with Ruxolitinib before Allogeneic Stem Cell Transplantation. Intern Med. 査読有 (56) 2481-2485, 2017 DOI: 10.2169/internalmedicine.8491-16

Yoshihiro T, Tsuchihashi K, Kusaba H, Nakashima T, Obara T, Nio K, Takayoshi K, Kodama H, Tsuruta N, Kiyohara H, Asai K, Harada E, Kamezaki K, Arita T, Sato M, Yamamoto H, Arita S, Ariyama H, Odashiro K, Oda Y, Akashi K, Baba E. Cardiac metastasis of squamous cell carcinoma of the thyroid gland with severe disseminated intravascular coagulation: A case report. Mol Clin Oncol. 査読有 (6) 91-95, 2017 DOI: 10.3892/mco.2016.1091

Tochigi T, Aoki T, Kikushige Y, Kamimura T, Ito Y, Shima T, Yamauchi T, Mori Y, Yoshimoto G, Kamezaki K, Kato K, Takenaka K, Iwasaki H, Akashi K, Miyamoto T. Mobilization of human immature hematopoietic progenitors through combinatory use of bortezomib and immunomodulatory drugs. Int J Hematol. 査読有 (106) 423-432, 2016 DOI: 10.1007/s12185-016-2148-2

Shima T, Kamezaki K, Higashioka K, Takashima S, Yoshimoto G, Kato K, Muta T, Takenaka K, Iwasaki H, Miyamoto T, Akashi K. Ascites Retention during Mogamulizumab Treatment in a Patient with Adult T-cell Leukemia/lymphoma. Intern Med. 査読有 (55) 1793-1796, 2016 DOI: 10.2169/internalmedicine.55.5987

Sugio T, Kato K, Aoki T, Ohta T, Saito N, Yoshida S, Kawano I, Henzan H, Kadowaki M, Takase K, Muta T, Miyawaki K, Yamauchi

T, Shima T, Takashima S, Mori Y, Yoshimoto G, Kamezaki K, Takenaka K, Iwasaki H, Ogawa R, Ohno Y, Eto T, Kamimura T, Miyamoto T, Akashi K. Mogamulizumab Treatment Prior to Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Induces Severe Acute Graft-versus-Host Disease. Biol Blood Marrow Transplant. 査読有 (22) 1608-1614, 2016 DOI: 10.1016/j.bbmt.2016.05.017

Minami M, Shima T, Kato K, Yamamoto H, Tsuchihashi K, Oku S, Shimokawa T, Tochigi T, Yoshimoto G, Kamezaki K, Takenaka K, Iwasaki H, Oda Y, Miyamoto T, Akashi K. Successful treatment of adult Langerhans cell histiocytosis with intensified chemotherapy. Int J Hematol. 査読有 (102) 244-248, 2015 DOI: 10.1007/s12185-015-1778-0

6 . 研究組織

(1)研究代表者

亀崎健次郎 (KAMEZAKI, Kenjiro)
九州大学病院・遺伝子細胞療法部・講師
研究者番号：70380433