

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08724

研究課題名(和文) 脂質の質による造血幹細胞および白血病制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of hematopoietic regulatory mechanisms via lipid balance

研究代表者

加藤 貴康 (Kato, Takayasu)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：20646591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は細胞内脂肪酸組成が急性骨髄性白血病(AML)の治療標的になりうるか検討することを目的としている。脂肪酸の炭素数を伸長する酵素ELOVL6が脂肪酸組成に影響を与えることから、Elovl6欠損(E6KO)マウスを用い、造血幹細胞やAMLへの影響を検討した。E6KOマウスの造血は正常であったが、造血幹細胞移植をおこなうと生着不全をきたした。また白血病遺伝子をE6KO骨髄細胞に導入し、野生型マウスに移植してもAMLを発症しなかった。これらは脂肪酸組成の変化により細胞運動を司るシグナルが低減していることを発見した。以上より、脂肪酸組成を変化させることが、AMLの治療につながる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性骨髄性白血病(AML)の治療率は向上しましたが、その恩恵を受けてきたのは主に若・壮年者です。しかしAMLを発症しやすい60歳代以降にも適用できる副作用の少ない新規治療法の開発が必須です。本研究ではElovl6による「脂質の質」の変化が、造血幹細胞の生着とAMLの発症を制御していることを発見しました。すなわち、ELOVL6制御によって脂肪酸バランスを変化させることで、AML新規治療法につながる可能性を世界で初めて示しました。Elovl6を阻害する治療法では、副作用で造血抑制を生じる可能性は小さいと予想されます。今後「脂肪酸の質」を標的とした新規白血病治療法開発への進展が期待されます。

研究成果の概要(英文)：This study examined whether altering intracellular fatty acid composition could be a novel treatment for acute myeloid leukemia (AML). Since ELOVL6, an enzyme that elongates the carbon number of fatty acids, affects fatty acid composition, this study used Elovl6-deficient (E6KO) mice to examine its effects on hematopoietic stem cells and AML. When E6KO bone marrow cells were transplanted into normal mice, no hematopoiesis was observed in the bone marrow. Furthermore, when leukemia genes were introduced into E6KO bone marrow cells and transplanted into wild-type mice, they did not develop AML. These findings indicate that the signals controlling cell motility are reduced by changes in fatty acid composition. These results indicate that altering fatty acid composition may lead to the treatment of AML.

研究分野：造血器腫瘍

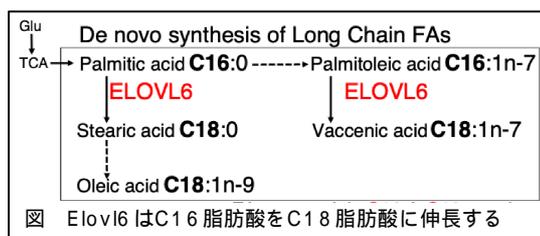
キーワード：Elovl6 白血病 造血幹細胞 PI3K CXCL12 急性骨髄性白血病 遊走

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病 (AML) の治癒率は、化学療法や造血幹細胞移植などの強力な治療により向上したが、こうした治療は副作用が大きく、主に 50 歳代以下の若・壮年者に恩恵があった。しかし、AML は 60 歳代以降が好発年齢であり、高齢者の治癒率向上のためには副作用の少ない新たな治療法の開発が必要とされる。

脂質代謝とがんの関連については、エネルギー代謝の側面が主に注目されてきたが、脂質はエネルギー源だけでなく、生体膜構成成分やシグナル分子としての働きも有している。一方、脂質分子は 4 万種以上あるとされるが、こうした脂質分子の多様性に基づく細胞機能の変化が報告され、がん研究でも注目を集めている。脂肪酸は脂質を構成する主要な要素であり、これらを構成する炭素鎖長や炭素二重結合の有無・数・部位、炭素鎖の角度によってさまざまな種類が存在する。細胞中に存在する脂肪酸は、炭素数 16、18、20 の長鎖脂肪酸分子が主体で、炭素数に応じて異なる酵素が脂肪酸の炭素鎖伸長を担っている。特に、脂肪酸酵素 ELOVL6 は、炭素数を 16 から 18 に伸長することで脂肪酸組成に大きな影響を与えることが知られている。共同研究者の島野・松坂らは、脂肪酸代謝を制御する転写因子の標的として ELOVL6 を同定した。彼らは ELOVL6 を欠損させたマウス (E6K0 マウス) (文献 1) を作製し、E6K0 マウスは、肝臓などで炭素鎖長 18 の脂肪酸であるステアリン酸やオレイン酸の割合が減り、代わりに炭素鎖長 16 のパルミチン酸やパルミトオレイン酸の割合が増えることを示した。これらの脂肪酸組成の変化は糖尿病、非アルコール性肝硬変、動脈硬化、肺線維症などの発症に影響を及ぼすことが報告されているが (文献 2)、造血幹細胞や白血病との関連についてはこれまで不明であった。



### 2. 研究の目的

本研究は「脂肪酸の質」が変化する E6K0 マウスを用い「脂肪酸の質」の変化がどのようなメカニズムで造血幹細胞や白血病を制御するのかを解明し、脂肪酸の質が白血病の新規治療標的となりうるかを検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

マウス: 8~16 週齢の Elov16 欠損マウス (E6K0 文献 1) C57BL/6-Ly5.2 マウス (Ly5.2) C57BL/6-Ly5.1 マウス (Ly5.1) および Ly5.2/5.1 マウスを筑波大学動物資源センター内で繁殖させ使用。競合的骨髄再構築能アッセイ (CRA): Ly5.2 もしくは E6K0 マウスの骨髄細胞と Ly5.2/5.1 マウス骨髄細胞を任意の比率で混合し、致死量照射照射 Ly5.1 マウスに移植し、移植後 1 ヶ月毎に末梢血で Ly5.2 キメラリズムを測定。

脂肪酸組成解析: 1~5 × 10<sup>6</sup> 細胞から脂肪を抽出し、ガスクロマトグラフィーにより測定。

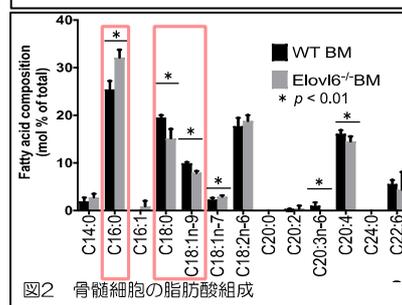
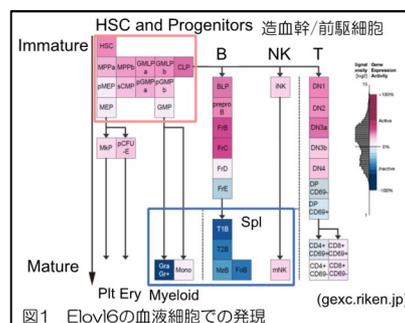
遊走能アッセイ: 5.0 μM ポアの Transwell®96 ウエルプレートを用いて CD34-LSK 細胞もしくは MLL:AF9 導入細胞を 100ng/ml CXCL12 で刺激。刺激 4h 後に遊走した細胞を AIRA® で測定。

その他; MLL:AF9 マウスモデル、RT-qPCR、Flow cytometry、コロニーアッセイ、増殖アッセイ、RNA-seq、ウエスタンブロッティング、パラビオシス、ホスファチジルイノシトール解析等の詳細については文献 3 を参照。

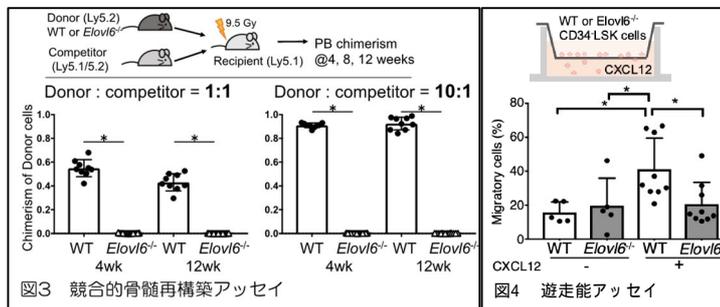
### 4. 研究成果

#### Elov16 は造血幹細胞の生着に重要である。

最初に各分化段階の血液細胞の Elov16 発現量をデータベースで解析すると、末梢血の血液細胞と比べて、骨髄内の造血幹細胞や造血前駆細胞で Elov16 の発現が高いことを同定した (図 1)。実際に野生型マウスの血液と骨髄から、各成熟段階の細胞を AIRA® で単離し、Elov16 の発現を確認すると同様の結果を得た。次に E6K0 マウス骨髄の脂肪酸組成を解析したところ、予想通り、炭素数 16 と 18 の脂肪酸の組成バランスが変化していた。これまでの報告と同様に、野生型と比べて E6K0 骨髄細胞でパルミチン酸の増加と C18/C16 比の減少をみとめた (図 2)。E6K0 マウスの血球数、白血球分画、骨髄での造血細胞分画については野生型と同等であった。E6K0 造血幹細胞の機能解析のため CRA を施行し、移植後 12 週の E6K0 由来細胞割合を確認したところ、E6K0 由来の細胞は全くみとめなかった (図 3)。E6K0 細胞と競合細胞割合を 10:1 にしても同様であり、E6K0 造血幹細胞は生着能が低下していることが示唆された。造血幹細胞



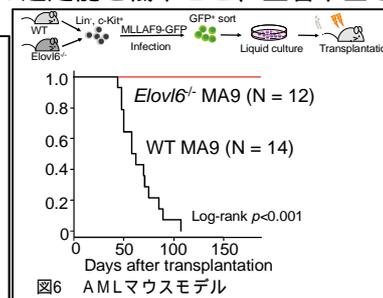
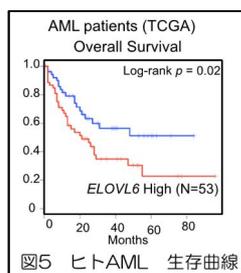
を多く含む CD34<sup>+</sup>LSK (Lineage 陰性、Sca-1 陽性、c-Kit 陽性) 細胞でのコロニー形成能を評価したところ、E6KO 細胞でコロニー形成能の亢進をみとめた。次に CD34<sup>+</sup>LSK 細胞で RNA-seq を施行し発現変動遺伝子について GO 解析を行ったところ、細胞移動に関する複数のタームが抽出された。Elovl6 は造血幹細胞の遊走に影響を与えていることが示唆された。



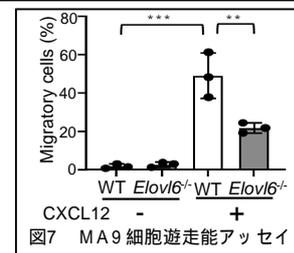
造血幹細胞の遊走に重要なケモカインは CXCL12 があり、CXCL12 下で遊走能アッセイをおこなったところ、E6KO CD34<sup>+</sup>LSK 細胞は野生型に比べて遊走能の低下をみとめた (図 4)。さらに Steady state での造血幹細胞の遊走能を検討するため、パラピオースアッセイを施行した。パラピオース施行 1 ヶ月後に野生型もしくは E6KO マウス (Ly5.2) を Ly5.1 マウスから単離し、Ly5.1 マウス骨髄内の Ly5.2 陽性造血幹細胞分画を ARIA<sup>®</sup> で確認したところ、野生型由来の CD34<sup>+</sup>LSK 細胞は認められたが、E6KO 由来の細胞は認めなかった。これらの結果より Elovl6 欠損による脂肪酸組成変化が造血幹細胞の遊走能を低下させ、着生不全をきたしている可能性が示唆された。

### Elovl6 は AML の発症に必須である。

ヒト AML における ELOVL6 の臨床的意義をパブリックデータベースで解析した。The Cancer Genome Atlas から得られた AML 患者の ELOVL6 mRNA 発現を評価したところ、Elovl6 高発現群は予後不良であった。(図 5)。別の AML コホートである Beat AML データベースからも同様の結果



をえた。次に ELOVL6 が AML にどのような影響を与えるかを白血病マウスモデルで検討した。野生型および E6KO マウスの骨髄から採取した造血前駆細胞に、白血病融合遺伝子 MLL::AF9 (MA9) をレトロウイルスで導入し、白血病細胞 (MA9 細胞) を作成した。脂肪酸組成を解析すると、E6KO MA9 細胞では野生型 (WT MA9) に比べて C18:0/C16:0 比の減少を認めた。これらの細胞の増殖能には差をみとめなかった。さらに致死放射線照射マウスに、4~8 週間培養した WT または E6KO MA9 細胞を移植し白血病発症につき解析した。WT MA9 細胞移植マウスは、16 週以内に AML を発症し死亡したが、E6KO MA9 細胞移植マウスでは AML の発症をみとめず、移植後 6 ヶ月まですべて生存していた (図 6)。



白血病発症抑制の機序を解明するため、WT および E6KO MA9 細胞で RNA-seq を施行した。発現変動遺伝子による GO 解析では、CD34<sup>+</sup>LSK 細胞と同様に「動き」に関するタームが抽出された。CD34<sup>+</sup>LSK 細胞と同様に CXCL12 下で遊走能アッセイをおこなったところ、E6KO MA9 細胞も野生型に比べ遊走能の低下をみとめた (図 7)。次に E6KO MA9 細胞のホーミングを解析すると、WT または E6KO MA9 細胞移植後 48 時間におけるレシピエントマウスの骨髄中の白血病細胞は、WT MA9 細胞移植マウスでは検出されたが、E6KO MA9 細胞移植マウスでは検出されず、E6KO MA9 細胞の遊走能の低下が示唆された。

### Elovl6 は CXCL12 下で PI3K-RAC シグナルを介した血液細胞の遊走を制御する。

E6KO CD34<sup>+</sup>LSK および MA9 細胞の遊走能低下のメカニズムを明らかにするために、RNA-seq 結果を GSEA で解析すると、WT MA9 細胞に比べて E6KO MA9 細胞では CXCR4 経路、PI3K-AKT や RAC 関連遺伝子の異常な発現変動を認めた (図 8)。造血幹細胞に作用するケモカインとして最も特徴的な CXCL12 は、CXCR4 リガンドで、E6KO CD34<sup>+</sup>LSK や MA9 細胞で CXCL12 に対する遊走能が低下していることから CXCL12-CXCR4 経路の異常が考えられた。WT および E6KO MA9 細胞の CXCR4 発現量は同程度であった。次に ELOVL6 が MA9 細胞の遊走能に影響を与えるか検討するため、ELOVL6 阻害剤を用いて遊走アッセイを施行した。WT MA9 細胞で ELOVL6 阻害剤の濃度依存的に遊走能の低下を認めた。さらに Elovl6 欠損によって CXCL12-CXCR4 の下流でどのようなシグナルが影響を受けているかを検討した。受容体である CXCR4 の下流では、「PI3K 経路」や「RAS-MAPK 経路」などのシグナル経路が働き、遊走の他に増殖や細胞の生死の制御などを行っている。Elovl6 のターゲットとして脂質の一種であるホスファチジルイノシトール 4,5-ビスフォスフェート (PI(4,5)P<sub>2</sub>) からホスファチジルイノシトール 3,4,5-トリフォスフェート

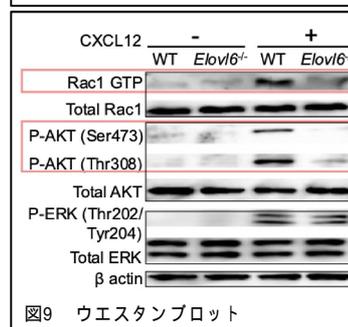
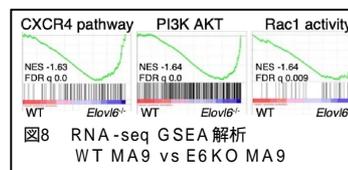


図9 ウェスタンブロット

(PIP<sub>3</sub>) への変換を触媒する PI3K に着目した。まず、CXCL12 刺激前後の WT および E6KO MA9 細胞で PI3K 活性の指標である AKT リン酸化を確認した。CXCL12 刺激により、WT MA9 細胞で Ser473/Thr308 の AKT リン酸化を認めしたが、E6KO 細胞では著しく低下した。ERK リン酸化については WT と E6KO 細胞で同程度であった。さらに Rac1 の活性化を検討すると、WT MA9 細胞では活性化を認めしたが、E6KO 細胞では低下していた(図 9)

### PI3K-AKT ではなく、PI3K-RAC が MA9 細胞の遊走を制御する。

PI(4,5)P<sub>2</sub> と PIP<sub>3</sub> は PI3K のそれぞれの基質と生成物であることから、ホスファチジルイノシトール (PI) とそのリン酸化種について脂肪酸組成を解析した。PIP<sub>2</sub> および PIP<sub>3</sub> の脂肪酸組成は、E6KO MA9 で WT MA9 に比べて C36.1 量 (脂肪酸 2 種のトータル) の減少を確認した (図 10)。

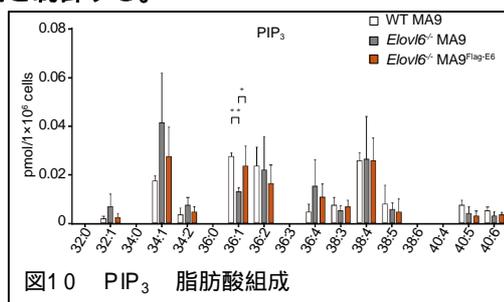


図10 PIP<sub>3</sub> 脂肪酸組成

次に、PI3K、AKT、または RAC 阻害剤による遊走能を検討した。遊走能アッセイでは、PI3K 阻害剤および RAC 阻害剤により、WT MA9 細胞の遊走割合が減少した。しかし、すでに低下していた E6KO MA9 細胞の遊走は影響を受けなかったことから、その効果は WT 細胞に特異的

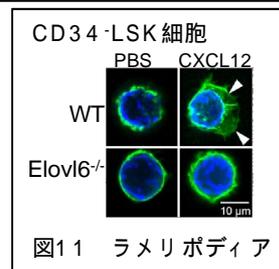


図11 ラメリポディア

であることが示唆された。対照的に、AKT 阻害剤は WT または E6KO MA9 細胞の遊走に影響しなかった。したがって Elov6 は PI3K-RAC 経路を制御していることが示唆された。E6KO 細胞では PI3K-Rac1 シグナル低下を介し遊走能が低下していることから、これらの細胞のアクチンリモデリングを検討した。CXCL12 刺激下で、WT CD34<sup>+</sup>LSK 細胞はラメリポディアを形成したが、KO CD34<sup>+</sup>LSK 細胞ではラメリポディアの形成を認めなかった(図 11)。したがって、ELOVL6 は、CXCL12-CXCR4-PI3K-Rac1 を介した細胞骨格のリモデリングと遊走を制御すると考えられた。

### Elov6 を再導入すると E6KO MA9 細胞は白血病を発症する。

外因的に再導入した Elov6 が E6KO MA9 細胞の表現型をレスキューできるか検討するために、Flag-ELOVL6 を発現する E6KO MA9 細胞 (E6KO MA9<sup>Flag-E6</sup>) およびコントロール (E6KO MA9<sup>mock</sup>) 細胞を作成した。E6KO MA9<sup>Flag-E6</sup> 細胞では骨髓細胞内の脂肪酸組成の改善および PIP<sub>2</sub>・PIP<sub>3</sub> の C36:1 量の増加を認めた。さらに CXCL12 刺激後の E6KO MA9<sup>Flag-E6</sup> 細胞で Rac1 の再活性化および遊走能の回復を認めた。最後に、AML 発症を評価するために、E6KO MA9<sup>mock</sup> 細胞または E6KO MA9<sup>Flag-E6</sup> 細胞を致死照射マウスに移植したところ、E6KO MA9<sup>mock</sup> 細胞を移植したレシピエントは AML を発症しなかったが、一方、E6KO MA9<sup>Flag-E6</sup> 細胞移植後のレシピエント 14 匹中 10 匹が AML を発症した (図 12)。

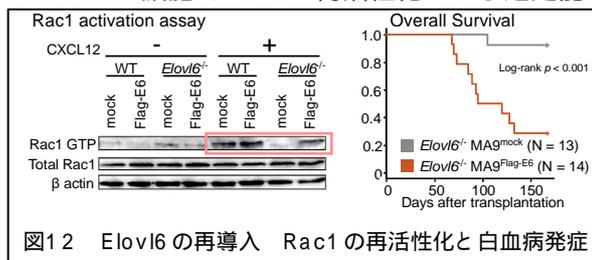


図12 Elov6 の再導入 Rac1 の再活性化と白血病発症

以上より Elov6 の再発現により白血病発症能が再獲得されることが示唆された。

最後に私達は本研究で、Elov6 による脂肪酸組成バランスの変化が、CXCL12-CXCR4-PI3K-RAC 経路を介して、造血幹細胞の生着と AML の発症を制御していることを報告した(図 13、文献 3)。すなわち、ELOVL6 制御によって脂肪酸組成バランスを変化させることで、AML 治療につながる可能性を世界で初めて示した。

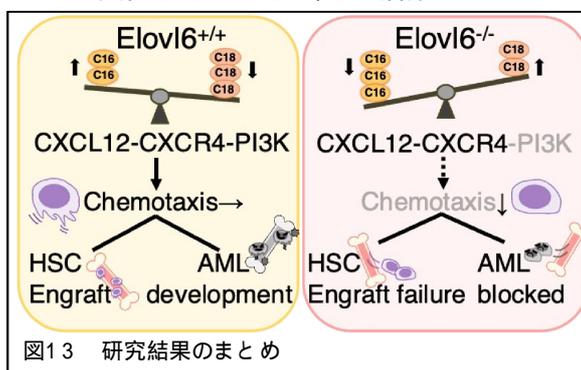


図13 研究結果のまとめ

なお、E6KO マウス骨髓細胞の移植では正常造血が観察されなかったが、E6KO マウスそのものの造血は正常であり、Elov6 は正常造血に必須ではないことも確認した。従って、Elov6 を阻害する治療法では、造血が強く抑制されるという、白血病治療で最も問題になる副作用を生じる可能性は小さいと予想される。今後は Elov6 阻害剤による白血病治療モデルの解析およびヒト白血病検体における脂肪酸組成の解析を継続していく予定である。

文献) 1 Matsuzaka T, Shimano H et al. *Nature Medicine*. 13(10):1193-1202, 2007  
 2 Shimano H, Sato R. *Nat Rev Endocrinol*. 13:710-30, 2017  
 3 Kiyoki Y, Kato T, Kito S et al. *Leukemia*. 37:910-913, 2023

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kiyoki Yusuke, Kato Takayasu, Kito Sakura, Matsuzaka Takashi, Morioka Shin, Sasaki Junko, Makishima Kenichi, Sakamoto Tatsuhiro, Nishikii Hidekazu, Obara Naoshi, Sakata-Yanagimoto Mamiko, Sasaki Takehiko, Shimano Hitoshi, Chiba Shigeru	4. 巻 37
2. 論文標題 The fatty acid elongase Elovl6 is crucial for hematopoietic stem cell engraftment and leukemia propagation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 910 ~ 913
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-023-01842-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yusuke Kiyoki, Takayasu Kato, Sakura Kito, Takashi Matsuzaka, Shin Morioka, Junko Sasaki, Tatsuhiro Sakamoto, Hidekazu Nishikii, Naoshi Obara, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Takehiko Sasaki, Hitoshi Shimano, Shigeru Chiba
2. 発表標題 ELOVL6 regulates engraftment of hematopoietic cells through the PI3K pathway
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takayasu Kato, Yusuke Kiyoki, Sakura Kito, Takashi Matsuzaka, Shin Morioka, Junko Sasaki, Tatsuhiro Sakamoto, Hidekazu Nishikii, Naoshi Obara, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Takehiko Sasaki, Hitoshi Shimano, Shigeru Chiba
2. 発表標題 Elongation of Long-Chain Fatty Acids Is Crucial for Hematopoietic Stem Cell Engraftment and Leukemia Propagation
3. 学会等名 64th ASH Annual Meeting and Exposition (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takayasu Kato
2. 発表標題 Elongation of long-chain fatty acids is crucial for hematopoietic stem cell engraftment and leukemia propagation
3. 学会等名 第20回 幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takayasu Kato, Yusuke Kiyoki, Sakura Kito, Takashi Matsuzaka, Shin Morioka, Junko Sasaki, Tatsuhiro Sakamoto, Hidekazu Nishikii, Naoshi Obara, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Takehiko Sasaki, Hitoshi Shimano and Shigeru Chiba
2. 発表標題 Elongation of Long-chain Fatty Acids is Crucial for Hematopoietic Stem Cell Engraftment and Leukemia Propagation.
3. 学会等名 The 13th JSH International Symposium 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 造血器腫瘍の治療又は予防剤	発明者 千葉滋、加藤貴康等	権利者 筑波大学
産業財産権の種類、番号 特許、21-099	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関