

令和 6 年 4 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16295

研究課題名（和文）S-アデノシルメチオニンの造血幹細胞分化での役割の解明

研究課題名（英文）Role of S-adenosylmethionine in the Maintenance of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells

研究代表者

加藤 浩貴 (Kato, Hiroki)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：50801677

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、造血細胞特異的にS-アデノシルメチオニン（SAM）合成酵素の欠損誘導が可能なマウスを作成した。造血細胞でSAM合成酵素の欠損誘導が可能であることを遺伝子発現解析などで確認した。酵素活性の低下については、質量分析を用いた代謝物量変化測定で確認した。欠損誘導を行った後に、継続的に造血組織を採取し、造血への影響を解析した。その結果、欠損誘導後、わずか数日で造血幹細胞および前駆細胞分画の細胞数が減少することが明らかとなった。追加の解析により、細胞自律的なSAM合成が造血幹細胞および前駆細胞の維持に必要であることが明らかとなり、そこには、p53経路の活性化調節が関わる可能性を見出している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、生体内造血でのSAM合成の意義には不明な点が多かった。今回我々は、造血細胞特異的にSAM合成酵素の欠損誘導が可能なマウスを作成し、その表現型を解析した。その結果、細胞自律的なSAM合成が造血幹前駆細胞の維持に必要であることが明らかとなり、そこにp53経路活性の調整が関わる可能性を見出した。SAMは栄養のシグナルである可能性があり、栄養の供給量に応じて、細胞の数や分化が調節されている可能性が考えられ、その実現機構としてSAM代謝が進化上重要な可能性がある。SAM代謝はがんの治療標的としても近年注目されており、今後の新規治療法の開発において、今回の研究による知見が役立つと期待される。

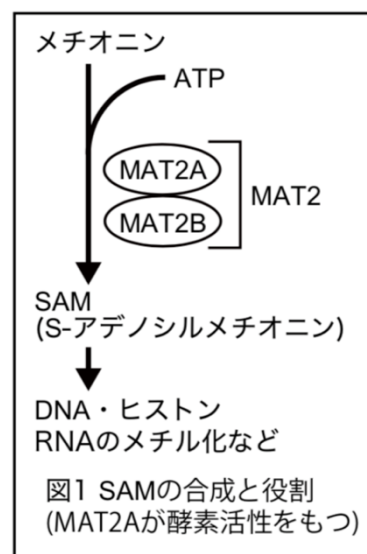
研究成果の概要（英文）：In this study, we developed the drug-inducible and hematopoietic cell-specific S-adenosylmethionine (SAM) synthase knock-out mouse. We confirmed the knock-out efficiency by gene expression analysis and mass spectrometry analysis. We found that the SAM synthase knock-out induced hematopoietic stem and progenitor cell (HSPC) reduction within several days. Additional analyses revealed that cell-intrinsic SAM synthesis is inevitable for the maintenance of HSPCs. p53 pathway alteration might be involved in the loss of HSPCs induced by this SAM synthase knock-out.

研究分野：造血

キーワード：メチオニン代謝 SAM MAT2A 遺伝子発現調節

1. 研究開始当初の背景

造血組織は、造血幹細胞がさまざまな機能をもつ細胞に分化、成熟することで構築されている。全ての細胞は、同一の遺伝情報を持つが、それぞれ異なる働きをしている。これを可能とするものが、DNAやヒストン、RNAのメチル化といったエピゲノム・エピトランスクリプトーム修飾による遺伝子発現調節である。実は、これらの分子のメチル化には、共通のメチル基供与体である、S-アデノシルメチオニン (SAM) が必要である。ここで、SAMは、メチオニンとATPから酵素MAT2 (MAT2AとMAT2Bの複合体でMAT2Aが酵素活性をもつ) により合成される (図1)。よってSAMは、エピゲノム・エピトランスクリプトーム修飾を介して、造血幹細胞の分化制御に重要であると予想される。造血幹細胞の分化制御の理解は、造血の異常が関わるさまざまな疾患 (貧血や自己免疫疾患、がんなど) の克服に重要なだけでなく、多細胞生物の成立に必要な遺伝子発現制御機構の解明にも欠かせない。しかし、造血幹細胞の分化制御でのSAMの役割は、これまでほとんど不明であった。そこで、本研究では、造血細胞特異的および薬剤誘導性にSAM合成酵素を欠損できるマウスを作成し、その表現型の解析を通して、造血幹前駆細胞でのSAMの重要性の解明を試みた。メチオニン制限やSAM合成の阻害は自己免疫疾患、がん、老化などの難治性病態を克服する方法として近年注目を集めており、本研究に基づく知見は、臨床上也も非常に有用なものとなると考えられた。



2. 研究の目的

SAM合成が生体内での造血幹前駆細胞の維持や分化に重要であるか明らかにし、重要である場合、なぜ重要であるのか、その機序を解明することを本研究の目的とした。「造血幹細胞分化におけるSAMの役割」という、基本的かつ重要な問題に着目した点で、本研究は新しく、これまでにはない視点から、造血における栄養と代謝の意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(方法1) SAMが造血幹前駆細胞の維持や分化の制御に重要か

まず、薬剤誘導型の造血細胞特異的SAM合成酵素欠損マウスに欠損誘導薬剤を投与し、継続的に造血組織を採取し、SAM合成酵素欠損の造血への影響を評価する。SAM合成酵素欠損自体の評価として、質量分析を用いる。さらに、細胞自律的なSAM合成の重要性を明らかにするために、造血細胞を移植後にSAM合成酵素を欠損させた場合の変化も観察する。また、非造血細胞でのSAM合成酵素欠損の影響を検証するために、野生型造血細胞を移植後に欠損誘導薬剤を投与した場合の変化も検証する。

(方法2) SAMが造血幹細胞の維持や分化に重要である場合その機序は何か

上記の解析で、細胞自律的なSAM合成が、造血幹前駆細胞の維持や分化に重要であることが明らかとなった場合、その機序を解明する。まず、どのような遺伝子発現変化が起きているか、野生型とSAM合成酵素欠損マウス由来の造血幹前駆細胞に対して、網羅的遺伝子発現解析 (RNAシーケンズ解析) を行い評価する。具体的には、GSEA (Gene set enrichment analysis) などの手法を用いる。遺伝子発現に変化が起きている場合、それがエピゲノム変化によるものか、網羅的オープンクロマチン解析 (ATACシーケンズ解析) で明らかにする。RNAのメチル化変化が関与する可能性も考え、エピトランスクリプトーム変化に対する解析も行う。必要に応じてDNAやヒストンのメチル化変化に関する解析も実施する。各解析を統合し、SAMが選択的に影響を与えているゲノム領域やメチル化変化がないか、ある場合その特徴は何か明らかにする。これらの解析により、SAMがどのように造血幹前駆細胞の分化を制御するか、その全貌を解明する。

4. 研究成果

(方法 1 の結果) SAM が造血幹前駆細胞の維持や分化の制御に重要な

まず、欠損誘導薬剤の投与により、実際に造血幹前駆細胞において、SAM 合成酵素が欠損されているか確認した。はじめに、定量 PCR にて、SAM 合成酵素の発現が、SAM 合成酵素の欠損誘導により抑制されていることを確認した。つづいて、質量分析によって、実際に、造血幹前駆細胞において、SAM 合成が低下しているか確認した。その結果、SAM 合成酵素の欠損誘導により、メチオニン量が増加した一方で、SAM 量が低下していたことから、実際に、本実験系において、生体内造血細胞で SAM 合成の抑制ができていたものと考えられた (図 2)。一方で、欠損マウス由来の細胞でも SAM 自体は一定量検出されている。これは、必ずしも欠損効率を反映しているものではないと考えている。すなわち、後述の如く、SAM 合成の阻害は、細胞の増殖や生存に対して負の影響を与えるため、欠損誘導薬剤投与後に、SAM 合成が阻害された細胞の割合が少なくなることから、SAM 合成阻害を免れた細胞の割合が増加し、実際よりも SAM 合成阻害効率が低く検出されている可能性があると考えられる。

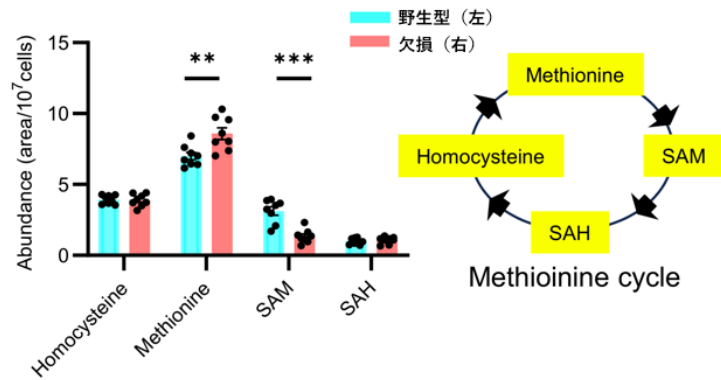


図2 SAM合成酵素欠損のSAM代謝への影響
造血幹前駆細胞に対して、SAM代謝関連代謝物に関し、質量分析を実施した。SAM合成酵素の欠損により、メチオニンからのSAM合成が阻害されていると考えられる。

つづいて、SAM 合成酵素の欠損誘導により、造血にどのような影響が出るかフローサイトメトリーにて解析した。その結果、まず、骨髄における造血幹細胞数が顕著に低下することが明らかとなった (図 3)。また、末梢血において、白血球数、ヘモグロビン濃度および血小板数が顕著に低下することが明らかとなった。これらの所見に一致して、骨髄においても、B 細胞数 (B220 陽性細胞数)、T 細胞数 (CD4 陽性細胞数、CD8a 細胞数) およびミエロイド細胞数 (Gr1 陽性細胞数) が、野生型マウスと比較して SAM 合成酵素欠損マウスで低下していることが明らかとなった。これらのことから、SAM 合成酵素の欠損は、比較的短期間で、造血幹細胞からの造血障害を引き起こすと考えられた。また、前述の各種移植実験の結果から、細胞自律的な SAM 合成が、造血幹前駆細胞からの造血の維持に必要であることが明らかとなった。

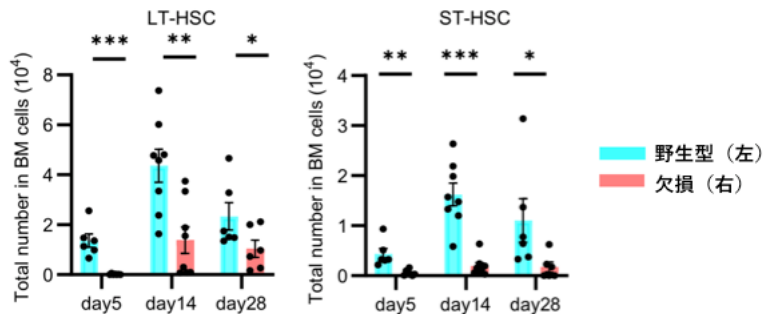


図3 SAM合成酵素欠損の生体内造血への影響
欠損誘導後、5日目、14日目、28日目の骨髄での造血幹細胞数を示す (LT-HSC: long term-hematopoietic stem cell, ST-HSC: short term-hematopoietic stem cell)。

(方法 2 の結果) SAM が造血幹細胞の維持や分化に重要である場合その機序は何か

上述の結果から、細胞自律的な SAM 合成が造血幹細胞の維持 (生存または増殖、もしくはその両方) に必要であることが明らかとなった。そこで、その機序を解明するために、野生型および SAM 合成酵素欠損マウスから造血幹前駆細胞を分取して、網羅的遺伝子発現解析を実施した。その結果、造血幹前駆細胞における SAM 合成酵素の欠損が、広範な遺伝子発現変化を引き起こすことが明らかとなった (図 4)。さらに、GSEA (Gene set enrichment analysis) を実施したところ、大変興味深いことに、SAM 合成酵素の欠損誘導により、細胞の生存や増殖に重要な因子である p53 経路の活性化が起きていることが明らかとなった。本所見に一致して、SAM 合成酵素の欠損により、造血幹前駆細胞での、アネキシン V 陽性細胞 (アポトーシス細胞) の割合が増加し、Ki-67 陽性細胞 (増殖細胞) の割合が低下することが確認された。これらの結果から、SAM 合成が阻害された造血細胞では、p53 経路の活性化により、細胞死の誘導および増殖の停止が起きているものと考えられた。一方で、p53 自体の mRNA 発現量は変化しておらず、p53 の上流遺

伝子の発現変化も限定的であったことから、p53 経路の活性化はこれらとは別の機序によりもたらされていると考えられた。一方で、DNA やヒストン、RNA のメチル化に対して、全体量としてのメチル化変化を解析したところ、SAM 合成阻害により DNA のメチル化が低下していた一方で、ヒストンや RNA については、明らかなメチル化変化は確認されなかった。この結果は、局所のメチル化変化を否定するものではない。今後、より詳細な網羅解析により、細胞内 SAM 濃度変化に感受性の高い、メチル化の種類や場所をさらに検証する必要があると考えられる。

網羅的オープンクロマチン解析 (ATAC シークエンス解析) の結果からは、SAM 合成酵素の欠損誘導により、広範なクロマチン変化が起きており、p53 の標的領域もオープンになっていることが確認された。この結果は、SAM 合成阻害により、p53 経路が活性化されることを一層支持していると考えられた。

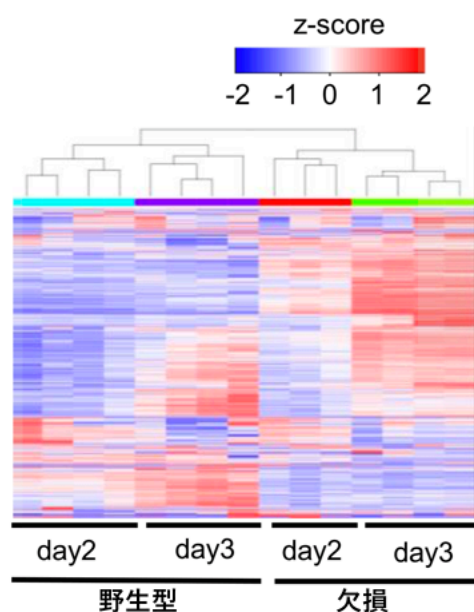


図4 SAM合成酵素欠損による、造血幹前駆細胞での遺伝子発現変化
欠損誘導後、2日目および3日目に、造血幹前駆細胞を分取し、網羅的遺伝子発現解析を実施した。発現変動遺伝子に対するクラスタリング解析の結果を示す。

結語

今回の研究から、生体内造血において、細胞自律的な SAM 合成が、造血幹前駆細胞からの造血の維持に必要であることが明らかとなった。SAM 合成の低下は、p53 経路の活性化を介して、造血幹前駆細胞の生存や増殖を負に制御すると考えられる。SAM 合成が低下した場合、なぜ p53 経路が活性化するのか、その機序は依然として未解明であり、今後の検討課題の一つである。DNA やヒストン、RNA のメチル化変化についても、今後各種の網羅解析を追加することにより、SAM 濃度の変化に感受性の高いメチル化の種類や領域を明らかにする必要があると考えられる。

今回の研究から、SAM 合成の低下は細胞の生存や増殖を負に制御することが考えられた。これが、造血細胞特異的なものであるのか、そのほかの細胞でも同様であるのか、がん細胞ではどうなるのかなど、細胞の種類や状態に応じた SAM 合成の重要性の違いについて、今後さらに検証していく必要があると考えられる。細胞や個体は、環境中の栄養素の量に応じて、その増殖や生存を適切に調節する必要がある。その機構の一つとして、細胞が SAM をシグナル因子として捉え、環境中の栄養素の量を、SAM 量を介して認識している可能性がある。よって、SAM による細胞増殖制御機構の解明は、生態が進化の過程で飢餓に対して対応してきた機構の理解に繋がることが期待されると同時に、飽食の時代に、それに伴う各種疾患の克服につながることを期待される。一方で、メチオニン制限や SAM 合成の阻害は自己免疫疾患、がん、老化などの難治性病態を克服する方法として近年注目を集めている。今回の研究からは、過度なメチオニン制限や SAM 合成の阻害が造血不全を招く可能性が示唆される。今後の SAM 代謝を標的とした治療法開発において、注意すべき課題であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suzuki Chie, Fujiwara Tohru, Shima Hiroki, Ono Koya, Saito Kei, Kato Hiroki, Onodera Koichi, Ichikawa Satoshi, Fukuhara Noriko, Onishi Yasushi, Yokoyama Hisayuki, Nakamura Yukio, Igarashi Kazuhiko, Harigae Hideo	4. 巻 42
2. 論文標題 Elucidation of the Role of FAM210B in Mitochondrial Metabolism and Erythropoiesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mcb.00143-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ikeda Masatoshi, Kato Hiroki, Shima Hiroki, Matsumoto Mitsuyo, Furukawa Eijiro, Yan Yan, Liao Ruiqi, Xu Jian, Muto Akihiko, Fujiwara Tohru, Harigae Hideo, Bresnick Emery H., Igarashi Kazuhiko	4. 巻 118
2. 論文標題 Heme-dependent induction of mitophagy program during differentiation of murine erythroid cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Experimental Hematology	6. 最初と最後の頁 21 ~ 30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exphem.2022.11.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ochi Tetsuro, Fujiwara Tohru, Ono Koya, Suzuki Chie, Nikaido Maika, Inoue Daichi, Kato Hiroki, Onodera Koichi, Ichikawa Satoshi, Fukuhara Noriko, Onishi Yasushi, Yokoyama Hisayuki, Nakamura Yukio, Harigae Hideo	4. 巻 12
2. 論文標題 Exploring the mechanistic link between SF3B1 mutation and ring sideroblast formation in myelodysplastic syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-18921-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ono Koya, Fujiwara Tohru, Saito Kei, Nishizawa Hironari, Takahashi Noriyuki, Suzuki Chie, Ochi Tetsuro, Kato Hiroki, Ishii Yusho, Onodera Koichi, Ichikawa Satoshi, Fukuhara Noriko, Onishi Yasushi, Yokoyama Hisayuki, Yamada Rie, Nakamura Yukio, Igarashi Kazuhiko, Harigae Hideo	4. 巻 12
2. 論文標題 Congenital sideroblastic anemia model due to ALAS2 mutation is susceptible to ferroptosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-12940-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sasaki Katsuyuki, Fujiwara Tohru, Ochi Tetsuro, Ono Koya, Kato Hiroki, Onodera Koichi, Ichikawa Satoshi, Fukuhara Noriko, Onishi Yasushi, Yokoyama Hisayuki, Miyata Toshio, Harigae Hideo	4. 巻 257
2. 論文標題 TM5614, an Inhibitor of Plasminogen Activator Inhibitor-1, Exerts an Antitumor Effect on Chronic Myeloid Leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Tohoku Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 211 ~ 224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1620/tjem.2022.J036	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Eiji Furukawa, Hiroki Kato, Sayaka Sano, Yan Yan, Daigo Michimata, Yuya Tanaka, Kazuki Sakurai, Koichi Onodera, Satoshi Ichikawa, Noriko Fukuhara, Yasushi Onishi, Hisayuki Yokoyama, Daisuke Saigusa, Tohru Fujiwara, Kazuhiko Igarashi, Hideo Harigae
2. 発表標題 HEMATOPOIETIC STEM AND PROGENITOR CELL INTRINSIC SAM SYNTHESIS IS REQUIRED TO PREVENT P53 PATHWAY ACTIVATION BY MAINTAINING DNA STABILITY
3. 学会等名 第65回米国血液学会 (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------