

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23689049

研究課題名(和文) Phd/VHL/HIF-1 制御系を介した白血病幹細胞の代謝特性解明と標的療法開発

研究課題名(英文) Elucidation of metabolic phenotypes of LICs and development of targeting therapy against LICs through Phd/VHL/HIF-1 regulatory system

研究代表者

田久保 圭誉 (Takubo, Keiyo)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：50502788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,000,000 円

研究成果の概要(和文)：代謝解析から造血幹細胞ニッチの新たな制御機構としてピルビン酸脱水素酵素リン酸化酵素を、白血病幹細胞ニッチの新規シグナルとしてIL-2/CD25シグナルを見出した。前者からは、代謝制御を標的とした感染制御や造血系抗老化技術につながることを期待され、後者からは未だ根絶が難しい慢性骨髄性白血病幹細胞に対する新しい治療法が開発されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：(1) We performed metabolomic analysis in hematopoietic stem cells (HSCs) and found that HSCs generate adenosine-5'-triphosphate by anaerobic glycolysis through a pyruvate dehydrogenase kinase (Pdk)-dependent mechanism. Loss of both Pdk isozymes attenuated HSC phenotypes including cell cycle. Thus, glycolytic metabolic status governed by Pdk acts as a cell cycle checkpoint that modulates HSCs.

(2) Using a CML-like mouse model of myeloproliferative disease, we demonstrate that CML LICs can be divided into CD25(+)FcRI(-) Lineage marker (Lin)(-) Sca-1(+)c-Kit(+) (F(-)LSK) cells and CD25(-)F(-)LSK cells. The CD25(+)F(-)LSK cells had multilineage differentiation capacity, with a preference toward cytokine-producing mast cell commitment. The CD25(+)F(-)LSK cells exhibited higher LIC capacity. Our findings suggest that interleukin-2 derived from the microenvironment and CD25 expressed on CML LICs constitute a novel signaling axis that could be preferentially targeted in therapy for CML.

研究分野：血液学

キーワード：造血幹細胞 白血病幹細胞 幹細胞ニッチ メタボロミクス

1. 研究開始当初の背景

(1) 正常の造血幹細胞は造血システムの開始点に位置して全ての血球細胞を産み出す能力のある細胞である。定常状態の哺乳類成体では造血幹細胞は骨髄の内骨膜近傍で細胞周期を静止期に止めている。その分裂頻度は数ヶ月に1回程度と、増殖・分裂が極めて稀である。この特徴は造血幹細胞の存在する微小環境(ニッチ)に存在する支持細胞(ニッチ細胞)由来のサイトカインやケモカイン、接着分子、あるいは細胞外マトリックスを産生し、直接的・あるいは間接的に造血幹細胞の細胞周期を制御する。

(2) 研究代表者はこれらとは異なる新たなニッチ構成要素として酸素分圧やエネルギー代謝制御に着目してこれまで研究を進めてきた。そもそも古典的に骨髄の内骨膜領域は低酸素かつ低栄養環境であると想像されてきたが、この仮説の精密な実験系に基づいた検証はこれまで行われてこなかった。研究代表者の解析で、未分化造血幹・前駆細胞分画は低酸素状態で、低酸素応答の中心的制御因子 HIF-1 が高発現していることを見いだした。HIF-1 を欠損したマウス造血幹細胞は細胞周期が静止状態の G0 期から離脱して、造血ストレス感受性が亢進し、最終的には細胞老化して失われる。対照的に VHL ホモあるいはヘテロ欠損で HIF-1 を増加させると造血幹細胞は細胞周期を静止期化したため、HIF-1 量が造血幹細胞の細胞周期を精密に調節していると考えられる。この際、VHL ホモ欠損では細胞周期の完全停止により幹細胞活性が失われるが、その一方、VHL のヘテロ欠損では野生型よりも幹細胞活性が上昇し、ストレス耐性も上昇していた。すなわち VHL/HIF-1 制御系の精密な制御は正常造血幹細胞の維持に必須の制御機構であることが見出された。

(3) 一方、正常の造血幹細胞と白血病幹細胞には共通の生物学的な性質があると考えられている。例えば、白血病幹細胞は、その由来(造血幹細胞・前駆細胞・終末分化細胞)を問わず比較的正常の造血幹細胞に近似した性質(静止期維持・自己複製能・多分化能)を保持して、その結果病態の進展や抗がん剤耐性の獲得を行っていると考えられている。研究代表者の検討から、白血病幹細胞は正常幹細胞よりも低酸素応答シグナルについて強い依存をしていることが示唆され、しかも極度の低酸素状態に耐えるための特殊なエネルギー代謝を行っていると考えられた。これらも含めた白血病幹細胞の特性の全貌を解明することは白血病幹細胞の有望な治療標的発見につながると考え本研究計画を着想した。

2. 研究の目的

本研究では、低酸素環境にある白血病幹細胞の特性と微小環境(ニッチ)を明らかにし、これらを制御する標的療法開発を目的とした。

具体的には正常マウスやレトロウイルスを用いたマウス慢性骨髄性白血病を主たる解析モデルとして、そのニッチを介した白血病幹細胞維持機構を解析し、固有の分子マーカーと制御メカニズムを新たに同定することを目指した。得られた知見はヒト慢性骨髄性白血病細胞において外挿可能であるか検証し、それと同時に慢性骨髄性白血病マウスモデルにおける実験的治療も試みる。これらの知見を収集整理することで、低酸素ニッチからのシグナルを標的とする方法論を見出す。そして最終的には未だ根絶が難しい各種白血病幹細胞の根絶法の端緒をつかむことを目標とした。

3. 研究の方法

本研究では、慢性骨髄性白血病幹細胞における制御系の機能を分子遺伝学的アプローチから検討することを計画した。これまで慢性骨髄性白血病幹細胞分画の維持を行う遺伝子としていくつかの分子機構が明らかになってきているが、慢性骨髄性白血病幹細胞の静止状態維持機構や、正常の造血幹細胞に障害を与えない治療標的検討はまだ端緒についたばかりであったため4年度をかけて以下の4項目の方法論から研究を行い実験的な検証を進めた。

(1) 白血病幹細胞と正常造血幹細胞の特性をそれぞれトランスクリプトーム解析やメタボローム解析から見出す。

(2) 慢性骨髄性白血病幹細胞特異的表面マーカーの同定

(3) 低酸素応答機構を含む慢性骨髄性白血病幹細胞特異的シグナルの機能解析とそのニッチからの制御機構の同定

(4) ヒト慢性骨髄性白血病病態への影響の解明

これらの研究計画から得られた知見を総合して、ニッチにある慢性骨髄性白血病幹細胞の維持メカニズムについて総合的に検討し、治療標的としての妥当性を検証した。

4. 研究成果

骨髄造血幹細胞における新規の細胞特性を見出すべくメタボローム解析を実施して検討した結果、造血幹細胞は成体骨髄の造血幹細胞では転写因子 HIF-1 を軸にした低酸素応答システムによって解糖系が活性化し、ミトコンドリアの代謝が抑制していることを見出した。その分子機構としてはピルビン酸脱水素酵素(pyruvate dehydrogenase; PDH)のリン酸化酵素(PDH kinase; Pdk)の4種類あるアイソザイムのうち、Pdk2 と Pdk4 が HIF-1 によって転写活性化されて造血幹細胞で嫌気性解糖の活性化とミトコンドリアの代謝の抑制をしていることを見出された。ノックアウトマウスの解析から、Pdk2 と Pdk4 の共欠損では造血幹細胞の細胞周期静止期性が失われて細胞周期が回転することが見出された。すなわち、低酸素ニッチによる代

謝制御は造血幹細胞の代謝特性維持のみならず細胞周期制御にも寄与していることが示唆された。実際、Pdk 様の機能を果たす物質 1-aminoethylphosphonic acid を用いて試験管内で造血幹細胞を処理・培養すると、通常酸素分圧下であっても骨髓ニッチ同様に増殖が抑制され、未分化性をそのまま保つことが可能であった。

一方、慢性骨髓性白血病の in vivo モデルの検討から、新規の慢性骨髓性白血病幹細胞のマーカーとして IL-2 受容体 鎖である CD25 を見出した。CD25 陽性の白血病幹細胞分画は、CD25 陰性分画に比べてマウスにおける白血病発症能が高く保持されており、悪性度の高い細胞であった。遺伝子発現的には既知の白血病幹細胞制御因子である TGF- β の受容体を含むサイトカイン受容体を発現していた。さらに、CD25 陽性白血病幹細胞はマスト細胞への高い分化能を保持しており、Th2 サイトカインなどを分泌することで白血病特有のニッチ環境を形成するために機能している可能性が示唆された。IL-2 を培養中に加えると白血病幹細胞の維持・増殖に働くことが示唆された。これはヒト慢性骨髓性白血病細胞でも同様であった。さらに、IL-2 や CD25 に対する中和抗体をマウス慢性骨髓性白血病モデルに投与すると、生存期間の延長が可能であった。また、慢性骨髓性白血病患者検体のトランスクリプトームデータベースのメタ解析から、病気が進展するについて CD25 の発現が急上昇することが見出された。これらを総合すると、IL-2/CD25 シグナルは慢性骨髓性白血病のニッチシグナルとして機能しており、実験的な治療標的となりうることが示唆された。

本研究から、造血幹細胞ニッチの新たな制御機構と、白血病幹細胞ニッチの新規シグナルが見出された。前者からは、代謝制御を標的とした感染制御や造血系抗老化技術につながることを期待され、後者からは未だ根絶が難しい慢性骨髓性白血病幹細胞に対する新しい治療法が開発されることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計22件)

Kobayashi H, Kobayashi CI, Nakamura-Ishizu A, Karigane D, Haeno H, Yamamoto KN, Sato T, Ohteki T, Hayakawa Y, Barber GN, Kurokawa M, Suda T, Takubo K. Bacterial c-di-GMP Affects Hematopoietic Stem/Progenitors and Their Niches through STING. Cell Rep. 査読有、11、2015、71-84. doi: 10.1016/j.celrep.2015.02.066.

Nakamura-Ishizu A, Takubo K, Fujioka M, Suda T. Megakaryocytes are essential for HSC quiescence through the production of

thrombopoietin. Biochem Biophys Res Commun. 査読有、454、2014、353-7.

doi:10.1016/j.bbrc.2014.10.095

Kobayashi CI, Takubo K, Kobayashi H, Nakamura-Ishizu A, Honda H, Kataoka K, Kumano K, Akiyama H, Sudo T, Kurokawa M, Suda T. The IL-2/CD25 axis maintains distinct subsets of chronic myeloid leukemia-initiating cells. Blood. 査読有、123、2014、2540-9.

doi: 10.1182/blood-2013-07-517847.

Takubo K, Suda T. Opening the door for HIF1 tuning. Blood. 査読無、123、2014、151-2.

doi: 10.1182/blood-2013-11-536995.

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. 査読有、12、2013、49-61.

doi: 10.1016/j.stem.2012.10.011.

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

doi: 10.1007/s12185-012-1071-4.

Iriuchishima H, Takubo K, Miyakawa Y, Nakamura-Ishizu A, Miyauchi Y, Fujita N, Miyamoto K, Miyamoto T, Ikeda E, Kizaki M, Nojima Y, Suda T. Neovascular niche for human myeloma cells in immunodeficient mouse bone. PLoS One. 査読有、7、2012、e30557.

doi: 10.1371/journal.pone.0030557.

Suda T, Takubo K, Semenza GL. Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. Cell Stem Cell. 査読有、9、2011、298-310.

[学会発表](計45件)

Keiyo Takubo, Maintenance of distinct chronic myeloid leukemia initiating subsets by IL-2/CD25 axis, The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, 2013年10月13日、ロイトン札幌(北海道札幌市)

Keiyo Takubo, Regulatory mechanisms of metabolism in hematopoietic stem cells, 72nd Annual Meeting of the JCA, 2013年10月5日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Keiyo Takubo, Regulation of Leukemia Initiating Cells in the Hypoxic Niche, JCA2012 Core Symposia 5, 2012年9月20日、札幌芸文館(北海道札幌市)

田久保圭誉, 低酸素ニッチによる幹細胞制御、第9回日本病理学会カンファレンス、平成24年8月4日、山口・湯田温泉(山口

県山口市)

Keiyo Takubo, PDK Plays a Critical Role in Maintaining Quiescence of HSCs Through Glycolytic Metabolism, ISSCR 10th Annual Meeting, 2012年6月14日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.careerpath-prj.keio.ac.jp/sa>

kaguchi/scholar/k_takubo/

<http://web.sc.itc.keio.ac.jp/cellldiff/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田久保 圭誉 (TAKUBO, Keiyo)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号: 50502788