

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860150

研究課題名(和文) 巨核球・血小板分化における低酸素応答制御機構の解明

研究課題名(英文) The regulation of in vitro megakaryocyte differentiation and platelet production by hypoxia

研究代表者

金井 麻衣 (KANAI, MAI)

早稲田大学・ナノ理工学研究機構・招聘研究員

研究者番号：30528526

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)：数万人規模の血小板異常の疾患に対して、人工的(in vitro)な血小板を作る技術が求められている。本研究課題では、脂肪組織由来前駆細胞より巨核球・血小板を誘導産生する技術の向上を目指して、どのような代謝機構が巨核球分化に関与しているのか表現型解析、遺伝子発現解析を行った。その結果、巨核球分化に、解糖系の活性化、コレステロール濃度の上昇、ミトコンドリアバイオジェネシスの関与が示唆された。また、造血幹細胞の維持機構とは異なり、酸素応答システムの中心的な分子である転写制御因子Hypoxia inducible factor (HIF)は巨核球分化に関与しないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The skill of producing platelets in vitro is needed for over tens of thousands of patients with various kinds of platelet disorders. In this study, we aimed to investigate relevance of metabolic systems to megakaryocyte(MK) differentiation and their regulatory mechanism in MK differentiation using preadipocytes isolated from subcutaneous adipose tissues of mice. In MK differentiation, we found characteristic metabolic alterations such as activation of glycolysis, increased cholesterol levels, and enhanced mitochondrial biogenesis. Moreover, hypoxia-inducible factor (HIF), a central transcription factor that controls adaptive response to hypoxic stress in normal and pathological conditions, do not affect MK differentiation unlike the regulation of the hematopoietic stem cells.

研究分野：解剖学、分子生物学、細胞生物学、低酸素応答

キーワード：細胞分化 巨核球 糖代謝 脂質代謝 ミトコンドリア代謝 低酸素応答

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、造血系をはじめ様々な幹細胞の機能維持に低酸素環境が重要であることが明らかになりつつある。実際、これまでに我々の研究グループは造血幹細胞の維持機構に HIF-1 α が関与していることを報告してきた (Takubo et al, Cell Stem Cell, 2010)。その研究過程で、低酸素ニッチで恒常性を維持している造血幹細胞ではミトコンドリアがほとんど存在しておらず、細胞が分化増殖していく過程でミトコンドリアバイオジェネシスが起き、結果としてミトコンドリア数も増えていることがわかってきた。このことは、造血幹細胞の分化過程で、ミトコンドリア電子伝達系を利用した好氣的エネルギー産生への代謝のリモデリングが生じていることを強く示唆しているが、具体的にどのようなエネルギー代謝のリモデリングが、造血幹細胞からの分化の過程で働いているのか、またその生物学的意義についても十分に解明されていない。

(2) 現在本邦では数万人規模の血小板異常の疾患に対して、頻回の血小板輸血・自己あるいは同種骨髄移植による治療が行われているが、頻回投与による自己抗体の出現などの問題点がある。これらの問題を解決するために、*in vitro* で血小板を分化誘導する技術の開発が強く求められている。近年、iPS 細胞とは全く異なるシステムで、かつ遺伝子導入を用いずに、ヒトおよびマウスの脂肪組織由来前駆細胞より巨核球・血小板を誘導・産生できることが報告されてきた (Matsubara et al, BBRC, 2009)。しかしながら、その分化誘導効率は 10-20%程度と低く、この技術の臨床応用に大きな障害となっており、この向上性を目指した分化誘導機構の解明が急務となっている。

2. 研究の目的

これまでの解析結果より、低酸素ニッチにある幹細胞が分化に向かう際に、好氣的な環境に適応した代謝系へのリモデリングが必要になると考えられるが、実際に分化の過程でどのような分子機構が働いているのか、その詳細なメカニズムは分かっていない。そこで本研究では、*in vitro* で脂肪組織由来前駆細胞から巨核球・血小板へ分化できる系を用いて、巨核球・血小板への終末分化過程における酸素微小環境変化に応答した代謝リモデリングの分子機構を明らかにする。さらに、この代謝リモデリングに基づいた巨核球・血小板分化および産生機序を解明することで、*in vitro* で脂肪組織由来前駆細胞から効率良く血小板を産生する技術に繋がる研究基盤の構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養と巨核球分化誘導

血小板は造血幹細胞から巨核球分化を経て分化系列の最終産物として産生される(図

1)。

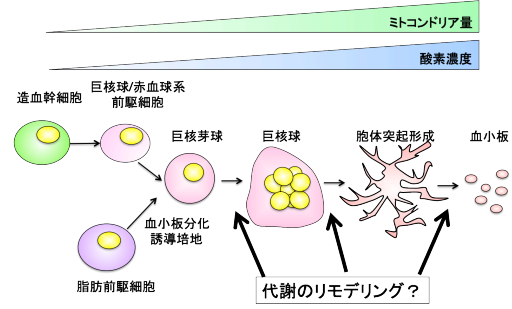


図1 巨核球・血小板への分化

造血幹細胞から分化した未成熟巨核球は、細胞内で細胞分裂を行わず染色体数を増やすこと(核の多倍体化: DNA ploidy)で成熟巨核球となり血小板が放出される。脂肪前駆細胞からの巨核球・血小板分化誘導過程では分化初期に発現するタンパク質量の変化は見られないものの、巨核球の細胞表面タンパク質(CD41, CD42b, c)の発現量の上昇や核の多倍体化の増加など、造血幹細胞からの分化誘導と同様の形態変化が見られている。

マウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 は、慶應義塾大学松原由美子博士より頂いた。10%FBS(SIGMA)、Penicillin(100 U/ml) Streptomycin(0.1 mg/ml) 入り DMEM (Invitrogen)にて培養した。脂肪組織由来前駆細胞(preadipocyte)は、8~12 週齢の野生型・Cre/loxP 導入マウス(C57BL/6J, HIF-1 α ^{loxP/loxP}, HIF-2 α ^{loxP/loxP}, PHD2^{loxP/loxP})の鼠蹊部皮下脂肪組織から分離し、10%FBS DMEMにて培養した。巨核球へ分化誘導するために、3T3-L1 細胞および脂肪組織由来前駆細胞はトリプシン消化後、巨核球・血小板分化誘導培地(MKLI medium; Matsubara et al, BBRC, 2009, 2010)に培地交換した。

阻害剤として、2-Deoxy-D-glucose(2-DG)、sodium dichloroacetate(DCA)、Etomoxir、Troglitazone (PPAR γ agonist)、GW0742 (PPAR δ agonist) (以上 SIGMA)、Clofibrate (PPAR α agonist)、Betulin、Lovastatin (以上 TCI)、sodium oxamate(Wako)を用いた。分化誘導時に同時添加した。

ViraPower アデノウイルス発現システム (Invitrogen)を用いて、組換えアデノウイルス Ad-HIF-2 α 、Ad-shPGC1 α 、Ad-shPGC1 β を作製した。また Adenovirus Dual Expression kit (TaKaRa)を用いて、組換えアデノウイルス Ad-HIF-1 α を作製した。各組換えアデノウイルスを 3T3-L1 細胞および脂肪組織由来前駆細胞に 48 時間感染させた後(目的のタンパク質を発現させた後)、分化誘導を行った。また、HIF-1 α ^{loxP/loxP}, HIF-2 α ^{loxP/loxP}, PHD2^{loxP/loxP} から分離した脂肪組織由来前駆細胞は Ad-Cre (Cre recombinase)を用いて、各遺伝子をノックアウトさせた。またネガティブコントロールとして Ad- β galを用いた。

(2) フローサイトメトリー解析

分化誘導3日あるいは5日後に細胞表面タンパク質の発現量の変化および核の多倍体化(PI染色)の分布をフローサイトメトリー(FC500MPL; Beckman Coulter)により解析した。CD41(BD bioscience)、Rat-IgG-FITC(Southern Bio)、PDH-phospho(S293;Abcam)、PDH-phospho(S300;SantaCruz)、Rabbit IgG-PE(Bio Legend)抗体を使用した。

(3) 定量的 RT-PCR 法

分化誘導後経時的に細胞を回収し、RNAを抽出した。逆転写反応により cDNA 合成後、代謝関連因子、低酸素応答因子等の発現量の変化を StepOnePlus(applied biosystems)にて解析した。内在性コントロール遺伝子として GAPDH を用いた。

4. 研究成果

(1) マウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 細胞を用いた解析

これまでに 3T3-L1 細胞からの巨核球分化誘導過程でミトコンドリア含量の増加が観察されている。そこで、巨核球分化とミトコンドリア依存性エネルギー代謝等の代謝リモデリングとの関連性を探るため、①糖代謝②脂質代謝③ミトコンドリアの機能に焦点を当てた。

①巨核球分化誘導に関与する代謝リモデリングの解析(糖代謝)

巨核球分化にどのような代謝変化が関与しているのか、糖代謝経路に作用する 2-DG(解糖系阻害剤)、DCA(TCA 回路への代謝活性化剤)、oxamate(乳酸産生阻害剤)を用いて分化誘導を行い、3 日後にフローサイトメトリー解析を行った。その結果、2-DG および DCA で、CD41 発現量の低下や核の多倍体化の抑制が観察された。一方、oxamate では変化は見られなかった。この結果より、解糖系の活性化あるいは TCA 回路への代謝の抑制が巨核球分化において重要である可能性が示唆された。

②巨核球分化誘導に関与する代謝リモデリングの解析(脂質代謝)

近年、神経幹細胞の分化における脂質代謝の重要性が報告された(Knobloch et al., Nature, 2013)。同様に 3T3-L1 細胞からの巨核球分化に脂質代謝が関与しているのか、脂質代謝に関与する遺伝子の経時的な発現量変化を定量的 RT-PCR 法により解析した。その結果、脂質合成に関わる遺伝子(*Acaca*、*Ac1y*)で発現量が減少した。一方、分化誘導直後の細胞では、脂肪酸の取り込み(*Slc27a1*)やβ酸化(*Cpt1a/CPT-1*)に関与する遺伝子群の発現量が一過的に上昇した。そこで、分化誘導1日後に顕著に発現量が増加した CPT-1 を阻害する Etomoxir を用いて分化誘導を行い、3 日後にフローサイトメトリー

解析を行った。その結果、Etomoxir を添加しても細胞の形態、CD41 発現量や核の多倍体化に顕著な変化は見られなかった。以上より CPT-1 は、3T3-L1 細胞からの巨核球分化において中心的な調節因子ではない可能性が示唆された。

③巨核球分化誘導におけるミトコンドリアの機能解析

3T3-L1 細胞からの巨核球分化誘導過程でミトコンドリア含量の時間的増加が観察されている。そこでミトコンドリア代謝関連因子の発現量の変化を経時的に解析したところ、ミトコンドリアバイオジェネシスの中心的な役割を果たす PGC1 ファミリー(*Pgc1α*や *Pgc1β*)、ミトコンドリア呼吸鎖酵素の1つである *Cox1* が分化誘導後一過的に発現上昇した。以上より、巨核球分化におけるミトコンドリアバイオジェネシスの関与が示唆された。

(2) 脂肪組織由来前駆細胞を用いた解析

3T3-L1 細胞は株化細胞のため、*in vivo* レベルでも研究成果(1)と同様の結果が得られるのかどうか、マウスから摘出した脂肪組織由来前駆細胞を用いてさらに詳しい解析を行った。

①巨核球分化誘導に関与する代謝リモデリングの解析(糖代謝)

研究成果(1)①と同様に、糖代謝経路に作用する 2-DG、DCA、oxamate を用いて分化誘導を行い、3 日後にフローサイトメトリー解析を行った。その結果、2-DG で CD41 発現量の低下が観察された(図 2)。核の多倍体化では顕著な変化は見られなかった。一方、3T3-L1 細胞で分化誘導を抑制した DCA、oxamate では、変化は見られなかった。

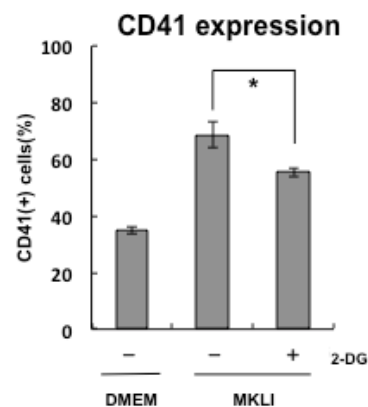


図 2 2-DG による巨核球分化への影響 (* $p < 0.05$)

3T3-L1 細胞と脂肪組織由来前駆細胞で結果が異なった DCA の作用点について、脂肪組織由来前駆細胞を用いて詳しく解析した。ピルビン酸をアセチル CoA に変換する PDH は、PDK によりリン酸化を受け、不活性化状態となる。

この PDK の働きを DCA が阻害する。そこでまず、巨核球分化における 2 種類の PDH のリン酸化 (293 番目および 300 番目のセリン残基) 量の変化をフローサイトメトリー解析した。分化誘導 3 日後、CD41 発現量の上昇に伴い、2 種類の PDH のリン酸化量が 10%程度上昇した。次に PDK ファミリー (*Pdk1-4*) の発現量の変化を経時的に解析したところ、*Pdk1*、2、4 の発現量が上昇した。これらの結果から、脂肪組織由来前駆細胞を巨核球へ分化誘導すると PDK の発現量が上昇し、PDH のリン酸化量が上昇した可能性が考えられる。しかし、2 種類の PDH のリン酸化量が 10%程度しか上昇しなかったことから、巨核球分化誘導過程における「PDK の発現量の上昇→PDH のリン酸化量の上昇」という TCA 回路への代謝抑制経路の寄与は小さく、DCA によって PDK の働きを抑制しても、他の代謝経路が動いているため、巨核球分化に差が見られなかった可能性が推測された。

一方、脂肪組織由来前駆細胞においても 2-DG で分化の抑制が観察されたことから、解糖系の活性化は巨核球分化において重要である可能性が示唆された。現在、ミトコンドリアピルビン酸輸送体阻害剤等を用いた解析を進めている。

②巨核球分化誘導に関与する代謝リモデリングの解析 (脂質代謝)

研究成果 (1) ②を踏まえ、まず脂質代謝の中心的な因子が巨核球分化に関与しているのか、脂質代謝経路に作用する Clofibrate (PPAR α agonist)、Troglitazone (PPAR γ agonist)、GW0742 (PPAR δ agonist)、Betulin を用いた解析を行った。各化合物を分化誘導と同時に添加し、3・5 日後にフローサイトメトリー解析を行った。Clofibrate (PPAR α agonist)、Troglitazone (PPAR γ agonist)、GW0742 (PPAR δ agonist) では、CD41 発現量や核の多倍体化に変化は見られなかった。一方、脂肪酸代謝・コレステロール代謝を司る転写因子 SREBP の阻害剤 Betulin を添加した細胞では、分化誘導 3 日後、核の多倍体化に変化は生じなかったが、CD41 発現量が減少した。このことから、巨核球分化において SREBP の活性維持が重要であることが示唆された。

SREBP ファミリーは脂肪酸代謝を司る *Srebp-1c*、コレステロール代謝を司る *Srebp-2*、双方を司る *Srebp-1a* の 3 つのアイソフォームにより構成される。巨核球分化誘導過程における発現量の変化を経時的に調べたところ、*Srebp-1a* は顕著な変化が見られなかった。一方で、*Srebp-1c* は分化誘導直後に発現量が減少し、*Srebp-2* は 3 日後以降に発現量が大幅に減少した。また、3T3-L1 細胞と同様に、脂肪酸合成に関する遺伝子群 (*Acaca*、*Fasn*) の発現量の減少、脂肪酸分解に関与する遺伝子 (*Cpt1a*) の発現量上昇がみられ、SREBP を介した脂肪酸合成は分化の過

程で活性化されないことが示唆された。一方で、SREBP の標的遺伝子であり細胞内コレステロール濃度上昇に応答して発現抑制を受ける *Hmgcr* や *Ldlr* の発現量は急速に減少し、コレステロールの細胞内輸送や蓄積に関わる遺伝子 *Npc1* や *Soat1* の発現量は上昇した。このことから「SREBP-1a/2 は細胞内のコレステロール濃度を上昇させることで分化に寄与しているのではないか」という仮説が立てられた。

SREBP によるコレステロール恒常性の調節機構の一つに HMGCR を介したコレステロール合成の促進があげられる。HMGCR 阻害剤の Lovastatin を用いてフローサイトメトリー解析を行った結果、分化誘導 3 日後に核の多倍体化には顕著な変化が生じなかったが、CD41 発現量の上昇が観察された。この結果は、「細胞内のコレステロール濃度上昇が分化に対して促進的に働く」という仮説と不一致であった。SREBP によるコレステロール恒常性の調節機構には、HMGCR を介したコレステロール合成の促進以外に、LDLR を介した細胞外からの取り込み促進機構も存在する。現在分化誘導培地中の LDL 濃度を変化させることで巨核球分化に影響が生じるか否かについて評価を行う予定である。

コレステロールは細胞内で酸化コレステロールに変換され、様々なシグナルの活性化に関与する。もし「SREBP-1a/2 は細胞内のコレステロール濃度を上昇させることで分化に寄与しているのではないか」という仮説が正しいならば、SREBP-1a/2 による細胞内のコレステロール濃度上昇を介してどのようなシグナルを活性化させるのか、(i) 造血幹細胞を始めとする様々な幹細胞の増殖・分化に寄与することが報告されながらも巨核球分化における意義が不明であるヘッジホッグ (Hh) シグナルと、(ii) それ自身の関与は不明であるが下流因子が巨核球分化を抑制することが報告されている LXR/RXR シグナルに着目し、検証した。(i) 通常分化誘導条件下における遺伝子発現量解析の結果、Hh シグナル標的遺伝子の *Gli1* は分化に伴い発現量が上昇した。この発現量上昇は Betulin 存在下では抑制され、Hh シグナルの活性化と巨核球分化には正の相関があることが示唆された。(ii) LXR/RXR シグナルの標的遺伝子である *Ido1* や *Abcg1* の発現量は分化に伴い大きく減少しており、LXR/RXR シグナルの下流因子が巨核球分化を抑制するという過去の報告と同様の方向性を示した。また Betulin 存在下では、通常分化誘導条件下での *Ido1* や *Abcg1* の発現量と顕著な変化は見られなかったことから、SREBP-1a/2 が働く巨核球分化誘導過程で活性化を受けないことが示唆された。

③巨核球分化誘導におけるミトコンドリアの機能解析

研究成果 (1) ③と同様に、脂肪組織由来前

駆細胞からの巨核球分化誘導過程でミトコンドリア含量の増加が観察された。またミトコンドリアバイオジェネシスの中心的な役割を果たすPGC1ファミリー(*Pgc1α*や*Pgc1β*)の発現量の上昇が確認された(図3)。

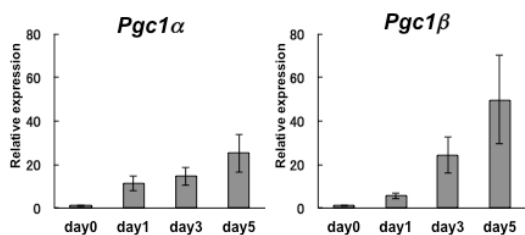


図3 *Pgc1α/β*の経時的発現量の変化

そこで、PGC1が巨核球分化において中心的な調節因子であるか、PGC1をノックダウンさせた系を用いて検討した。組換えアデノウイルス(Ad-sh*Pgc1α*)を用いて、*Pgc1α*をノックダウンした細胞を分化誘導し、3日後にフローサイトメトリー解析を行った。その結果、*Pgc1α*をノックダウンしてもCD41発現量、核の多倍体化には変化は見られなかった。現在、*Pgc1β*単独および*Pgc1α*・*Pgc1β*両方をノックダウンさせた細胞を用いた検討を行っている。

④巨核球分化誘導に対する低酸素の影響解析

好氣的生物は進化の中で外界の酸素濃度を鋭敏に感知し応答するシステムを構築してきた。このシステムの中心的な分子が、低酸素誘導転写制御因子 hypoxia inducible factor (HIF)である。HIFは恒常的に発現するβサブユニット(HIFβ)と酸素濃度に依存して発現量が変化するαサブユニット(HIFα)のヘテロ二量体からなり、その転写活性はHIFαにより規定される。HIFαは通常酸素条件下ではプロリン水酸化酵素PHDによって水酸化され、それを指標にHIFαは、pVHL(がん抑制遺伝子産物)によってユビキチンプロテアソーム系で分解される。一方、低酸素環境ではPHDはその酵素活性を失ってしまうため、HIFαは水酸化を受けず、HIFβと二量体を形成し、転写因子として働くことができる。そこで脂肪組織由来前駆細胞からの巨核球分化誘導過程でHIFαファミリーのHIF-1αおよびHIF-2αがどのように関与しているのか検証した。

まず、HIF-1αおよびHIF-2αの遺伝子発現量解析の結果、HIF-1αは分化に伴い、発現量が減少し、HIF-2αは、緩やかな上昇が確認された。

次に、組換えアデノウイルス(Ad-HIF-1α、Ad-HIF-2α)を用いて各タンパク質を過剰発現させた細胞を分化誘導し、3日後にフローサイトメトリー解析した。その結果、HIF-2αを過剰発現させるとCD41発現量の低下や核

の多倍体化の抑制が観察された。一方、HIF-1αを過剰発現させても変化は見られなかった。

さらにCre/loxP導入マウスを用いて、HIF-1α、HIF-2α、PHD2をノックアウトさせた細胞でも同様の検討を行った。その結果、HIF-1α、HIF-2α、PHD2をノックアウトさせてもCD41発現量の低下や核の多倍体化に変化は見られなかった。

幹細胞の維持および分化誘導には低酸素環境が重要な役割を果たしており、HIFの働きが注目されているが、脂肪組織由来前駆細胞からの巨核球分化誘導過程では、HIF依存的代謝経路は働かず、HIF非依存的代謝経路が働いている可能性が示唆された。糖代謝・脂質代謝・ミトコンドリア機能解析でこれまでに得られた結果を踏まえながら、HIF非依存的代謝経路による巨核球分化機構を検証する予定である。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計5件)

①KANAI M, HOUKUWA K, GODA N. The regulation of *in vitro* megakaryocyte differentiation by hypoxia. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「ストレス応答制御に基づく次世代健康寿命科学の研究拠点形成」第三回成果報告会, ポスターセッション18, 2015年3月6日, 早稲田大学(東京都新宿区)

②法桑 かおり, 金井 麻衣, 合田 亘人. マウス脂肪前駆細胞由来巨核球における脂質代謝を介した分化制御機構の解明. 第37回分子生物学会年会, 3P-0587, 2014年11月27日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

③金井 麻衣, 法桑 かおり, 合田 亘人. 低酸素応答による巨核球分化機構の解明. 第37回分子生物学会年会, 2P-0602, 2014年11月26日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

④金井 麻衣, 法桑 かおり, 松原 由美子, 池田 康夫, 合田 亘人. *in vitro*における巨核球分化誘導と代謝制御との関連性, 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「ストレス応答制御に基づく次世代健康寿命科学の研究拠点形成」第二回成果報告会, ポスターセッション17, 2014年3月15日, 早稲田大学(東京都新宿区)

⑤KANAI M, HOUKUWA K, MATHUBARA Y, IKEDA Y, GODA N. Relevance of metabolic systems to *in vitro* megakaryocyte differentiation. 第36回分子生物学会年会, P1-0615, 2013年12月3日, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金井 麻衣 (KANAI, Mai)
早稲田大学・
ナノ理工学研究機構・
招聘研究員

研究者番号：30528526

(4) 研究協力者

合田 亘人 (GODA, Nobuhito)
早稲田大学・理工学術院・教授
研究者番号：00245549

法桑 かおり (HOUKUWA, Kaori)
早稲田大学・理工学術院・修士課程
研究者番号：なし

松原 由美子 (MATHUBARA, Yumiko)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：26461410