

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009年度～2011年度

課題番号：21591202

研究課題名（和文） 造血幹細胞の増殖・分化におけるエネルギー代謝制御

研究課題名（英文） Energy metabolism in the growth and differentiation of hematopoietic stem/progenitor cells

研究代表者

江副 幸子（EZOE SACHIKO）

大阪大学・医学部附属病院・特任講師（常勤）

研究者番号：90379173

研究成果の概要（和文）：血液の細胞は、その源になる造血幹細胞から分化成熟するが、生涯にわたって血液細胞を供給するために幹細胞の多くは静止期にあって枯渇を防いでおり、その機序は明らかにされていない。本研究では、骨髄におけるエネルギー状態とそのメタボリズムが造血幹細胞の状態に及ぼす影響について解析し、低酸素及び低グルコース状態は造血幹細胞のエネルギー産生をおさえ、造血細胞の未分化性の維持に関わっていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Recently, it is reported that undifferentiated state of hematopoietic stem cells is regulated by their environmental factors, such as oxygen concentration. In hematopoietic stem/progenitor cells, the environmental glucose concentration and the intracellular energy metabolism are involved in the maintenance of stemness and the regulation of proliferation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：造血幹細胞、エネルギー代謝、骨髄微小環境、増殖、分化

1. 研究開始当初の背景

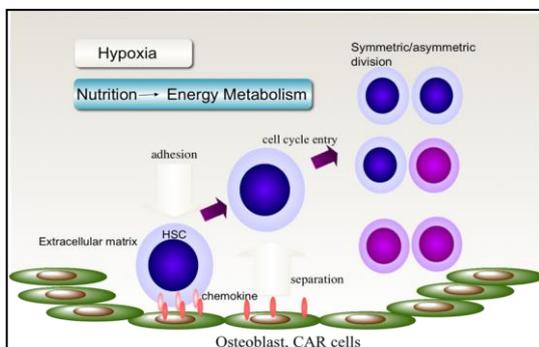
造血幹細胞は、自己複製能と多分化能によって、造血幹細胞集団を維持し、必要に応じてすべての系統の血液細胞を枯渇することなく供給し続けるが、通常の造血状態ではほとんどが細胞周期の休止期にあり、また未分化性が維持されている。Notch シグナル、HOXB4、ポリコム遺伝子群、酸化ストレスなどが造血幹細胞の増殖・分化に影響を及ぼすことが報告されてきたが、造血幹細胞の静

止期及び未分化性の維持についてその全容は明らかではない。申請者らは、造血幹細胞の静止期および未分化性の維持についての解析を行うと共に、ヒト臍帯血の ex vivo 増幅法の確立及びその臨床応用についての研究を行ってきた。その結果、造血幹細胞の休止期の維持には細胞周期進行の阻害分子 p21^{INK4A} 蛋白の蓄積が必要であること（Blood 100:3512, 2002）、自己複製には Notch による c-Myc の発現誘導が重要である

こと(J Biol Chem 279:24986, 2004; J Biol Chem 280:4929, 2005)、造血幹細胞の維持には NF- κ B が必須であることを明らかにしてきた(J Biol Chem 279:55578, 2004)。

近年、造血幹細胞は幹細胞自身が持つ内因性プログラムとは別に、Niche と呼ばれる骨髄微小環境によって静止期や未分化性が維持されていることが明らかにされている。造血幹細胞が分裂する際、生じる娘細胞が対称分裂によって2個の自己と同様の幹細胞となるか、非対称分裂によって1個の幹細胞と1個の少し分化した細胞(TA細胞)になるか、または対称分裂によって2個のTA細胞になるのか、この分裂様式の確率が幹細胞の未分化性を決定すると考えられる。このような造血幹細胞の運命決定には、Nicheにおける骨芽細胞との cadherin、Tie2、Notch といった接着に関わる因子を介した情報の伝達や、Wnt、サイトカインなどの細胞外因子が重要な働きをしていると考えられている。また、最近では Niche における酸素濃度が造血幹細胞の未分化性の維持を担っていることが報告された。さらに我々は、このような環境因子の一つとして細胞の栄養状態に着目した。

飢餓状態において生物の寿命が延長することは古くから知られている。このことは、生物が度重なる飢餓を乗り越えて主を絶やさず保持する中で獲得してきた環境への適応能力であると考えられているが、それはあたかも Niche の中で過度の増殖と分化をおさえて静止期を維持し、枯渇を防いでいる造血幹細胞の状態を思わせる。我々は、更に線虫において飢餓状態での老化の遅延と寿命の延長を誘導する分子 Sir2 に着目し、その造血幹細胞における機能を明らかにしたいと考えた。



2. 研究の目的

申請者による予備実験では造血幹細胞・前駆細胞の分画であるマウス KSL 細胞 ($c\text{-Kit}^{\text{h}}\text{Sca-1}^{\text{+}}\text{Lin}^{-}$ 細胞) を

pyroninY と hoechst の二重染色により G0, G1, G2/S/M 期に分別し、それぞれの細胞内 ATP 濃度を計測したところ G0 期において最も ATP 濃度が低かった。このことより静止期の細胞においてはエネルギーの代謝がおさえられた状態であると考えられた。様々な培地のグルコース濃度において KSL 細胞を培養したところ、低濃度においてより細胞内 ATP 濃度は減少し、増殖が抑制されている事が明らかになった。以上のことから、環境のグルコース濃度は造血幹細胞/前駆細胞内のエネルギー代謝を制御し、その結果細胞増殖を制御していると考えられ、その機能をさらに詳細に解析することとした。また、環境の栄養状態、及びエネルギー代謝が造血幹細胞/前駆細胞の自己複製/分化に及ぼす影響について明らかにする事を目的とする。申請者による予備実験では、SIRT1 の特異的阻害剤である nicotinamide (NA) をマウスの造血幹/前駆細胞 (KSL 細胞) に作用させると、造血幹細胞を未分化な状態で維持できるサイトカイン存在下においても KSL 分画が減少した。また、KSL 細胞を NA で3日間処理すると、コントロールの培養を行った細胞と比較してコロニー形成能が著明に低下した。更に、SIRT1 に対する siRNA を KSL 細胞に導入すると KSL 細胞が減少した。逆に、SIRT1 の活性化剤 resveratrol を添加すると KSL 分画が増加することを見いだした。これらから、SIRT1 は造血幹/前駆細胞の未分化性の維持に関与していると考えられ、本研究においては造血幹/前駆細胞の環境における栄養状態が細胞の運命を制御する際、SIRT1 がどのように関与しているかについても明らかにする事を目的とした。

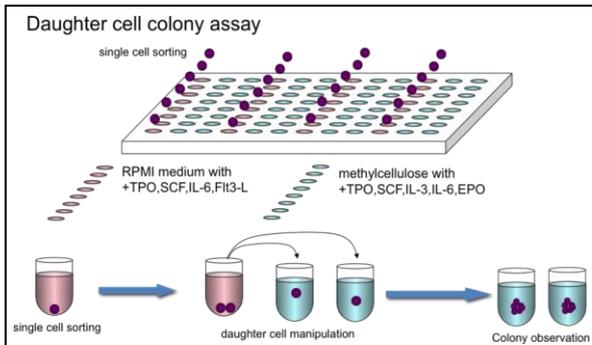
3. 研究の方法

(1) 環境のグルコース濃度が CD34-KSL 細胞の増殖と分化に及ぼす影響についての解析
培養培地中のグルコース濃度を変化させ CD34-KSL 細胞を培養した後、KSL 分画に残っている細胞の比率を計測する。

(2) 環境のグルコース濃度が細胞の自己複製に及ぼす影響についての検討
daughter cell colony assay を行う : FACS Aria をもちいて CD34-KSL 細胞を 96well plate に1個/well 播種する。顕微鏡かに定期的に観察し、細胞が2個に分裂した時点でそれらの1個1個の娘細胞を、マイクロマニピュレーターを用いてそれぞれ別のメチルセルロース培地に移し、10日間程度の培養の後にコロニーの形態を観察する。または、サイトスピンにより MG 染色を行い、細胞の形

態を観察し、コロニーの種類を同定する。その際、療法の娘細胞が mix コロニーを生じた場合には、対象分裂による自己複製を行ったと考える。

各グルコース濃度での美容において 細胞播種から第1回分裂までの時間と mix/mix colony pair を小実確立についての統計解析を行う。



(3) SIRT1 のエネルギー代謝を介して造血幹細胞の運命決定における機能とその機構を明らかにするために、SIRT1 の阻害剤 NA 存在下での培養後において daughter cell colony assay を行う。

(4) ミトコンドリアでのエネルギー代謝の影響を明らかにするために、ミトコンドリア阻害剤 DNAP を加えた培養において daughter cell colony assay を行う。

4. 研究成果

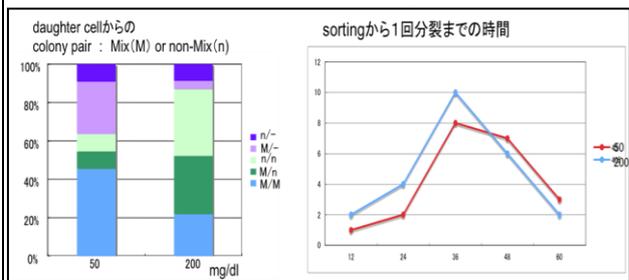
細胞周期毎のエネルギー代謝の状態を解析するために、マウス骨髄全単核球と KSL 細胞をそれぞれ pyroninY/hoechst の二重染色により G0, G1, S/G2/M に分別した。ATP はグルコースや脂肪の分解によって得られるエネルギー基質である。各細胞周期における細胞内 ATP 濃度を測定した。

全骨髄単核球においても KSL 細胞においても細胞内 ATP 濃度は G0 期において最も低く、増殖期で最も高かった。また、NADH は ATP と同様にグルコース、脂肪の分解過程で得られるエネルギー基質の中間体である。KSL 細胞を PyroninY 染色により G0 期と G1/S/G2M 期に分別し、それぞれ細胞内の NADH 濃度を測定したところ、G0 期において NADH 濃度が低下していた。

以上より静止期の細胞では細胞内のエネルギー代謝が抑制されていると考えられた。マウス KSL 細胞をグルコース濃度 0、50、100、150、200mg/dl の培地でそれぞれ培養した。増殖率は glucose 濃度依存的に高くなっていった。また、細胞内の ATP 濃度は day2 では glucose 濃度依存的に高かったが、day5 になると 150、200mg/dl の glucose 濃度培養において低下していた。

マウス骨髄由来 KSL 細胞を各グルコース濃度の TPO, SCF, IL-6, Flt3L 含有培地で培養した後、FACS により KSL 細胞の比率を検索した。培地のグルコース濃度を 0mg/dl とした場合、5 日後の KSL 細胞は 20%であったのに対し、200mg/dl では 5%で培地のグルコース濃度に依存し、KSL 細胞の比率が減少していた。環境のグルコース濃度による分化制御のメカニズムを明らかにするため、それぞれのグルコース濃度での培養の後、一回分裂時の daughter cell を用いて single cell colony assay を行い、コロニーの形状を観察した。培地グルコース濃度 50mg/dl または 200mg/dl の培養の後、それぞれの daughter cell colony assay を行った。グルコース濃度 50mg/dl では 44%の KSL において両方の daughter cell が mix colony を形成したのに対し、200mg/dl では 22%で mix colony のペアが観察された。また、sorting から1回分裂までの時間は 200mg/dl の培養条件でより短かった。

すなわち、低栄養状態は造血幹細胞の細胞周期を遅延し、分裂時には分化よりも自己複製を促進すると考えられた。



マウス KSL 細胞を SIRT1 阻害剤 NA 存在下で培養した際にはグルコース濃度 50mg/dl の培養においても培養後の KSL 細胞の比率は 200mg/dl の培養と有意差はなく、また mix colony 形成能の促進も認めなかった。

すなわち低栄養状態における自己複製の促進は SIRT1 を介して行われると考えられた。マウス KSL 細胞を、SIRT1 阻害剤 NA 存在下で培養した際にはグルコース濃度 50mg/dl の培養においても培養後の KSL 細胞の比率は 200mg/dl の培養と有意差はなく、また mix colony 形成能の促進も認めなかった。

すなわち低栄養状態における自己複製の促進は SIRT1 を介して行われると考えられた。(1) G0 期にあるマウス KSL 細胞では細胞内の ATP、NADH の濃度が増殖期の細胞に比べて低下していた。

(2) 細胞外の低グルコース濃度はマウス KSL 細胞内の ATP 産生を抑制し、細胞増殖を抑制した。

(3) 細胞外の低グルコース濃度はマウス KSL 細胞の分裂時において分化を抑制し、自己複製を促進した。

(4) SIRT1 阻害剤 NA は低グルコースによる分化の抑制、自己複製の促進を解除した。

(5) ミトコンドリア阻害剤 DNP は高濃度グルコースの培養においてもマウス KSL 細胞に分化抑制と自己複製の促進をもたらした。

以上より、造血幹細胞においては環境における栄養状態によって静止期および未分化性の維持が制御されている可能性が示唆された。

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 38 件)

- ① Matsui K, Ezoe S, Oritani K, et al. NAD-dependent histone deacetylase, SIRT1, plays essential roles in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 418(4):811-817. 2012、査読有、<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.01.109>
- ② Sekine Y, Kanakura Y, Oritani K, Matsuda T, et al. STAP-2 interacts with and modulates BCR-ABL-mediated tumorigenesis. *Oncogene.* 10.1038. 2012、査読有、DOI: 10.1038/onc.2011.604
- ③ Satoh Y, Mizuki M, Kanakura Y, et al. C-terminal mutation of RUNX1 attenuates the DNA-damage repair response in hematopoietic stem cells. *Leukemia.* 26(2):303-311. 2012、査読有、DOI:10.1038/leu.2011.202
- ④ Saito Y, Shibayama H, Tanaka H, Tanimura A, Matsumura I, Kanakura Y, et al. PICOT is a molecule which binds to anamorsin. *Biochem Biophys Res Commun.* 408(2):329-333. 2011、査読有、<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.04.033>
- ⑤ Shibata M, Ezoe S, Kanakura Y, et al. Predictability of the response to tyrosine kinase inhibitors via in vitro analysis of Bcr-Abl phosphorylation. *Leuk Res.* 35(9):1205-1211. 2011、査読有、<http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2011.01.012>
- ⑥ Fujita J, Ezoe S, Kanakura Y, et al. Myeloid neoplasm-related gene abnormalities differentially affect dendritic cell differentiation from murine hematopoietic stem/progenitor cells. *Immunol Lett.* 136(1):61-73. 2011、査読有、<http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2010.12.006>
- ⑦ Tokunaga M, Ezoe S, Oritani K,

Kanakura Y, et al. BCR-ABL but not JAK2 V617F inhibits erythropoiesis through the Ras signal by inducing p21CIP1/WAF1. *J Biol Chem.* 285(41):31774-31782. 2010、査読有、DOI: 10.1074/jbc.M110.118653

[学会発表] (計 17 件)

- ① 柴田 大、江副 幸子、金倉 護 等、第 73 回日本血液学会学術集会、Predictability of the response to tyrosine kinase inhibitors via *in vitro* analysis of Bcr-Abl signal. 2011 年 10 月 15 日、名古屋、愛知
- ② 柴田 大、江副 幸子、金倉 護 等、第 52 回日本癌学会学術総会、Predictability of the response to tyrosine kinase inhibitors via *in vitro* analysis of Bcr-Abl signal. 2011 年 10 月 3 日、名古屋、愛知
- ③ Marsui K, Ezoe S, Oritani K, Kanakura Y, et al. 16th Congress of European Hematology Association, Energy metabolism of glucose and ATP affects the growth and differentiation of hematopoietic stem/progenitor cells. June 11 2011, London, United Kingdom
- ④ 徳永 正浩、江副 幸子、金倉 護 等、第 51 回日本癌学会学術総会、BCR-ABL suppresses erythropoiesis through Ras signaling by the induction of p21^{CIP1/WAF1}. 2010 年 9 月 30 日、大阪国際会議場 (大阪)
- ⑤ 徳永 正浩、江副 幸子、金倉 護 等、第 72 回日本血液学会総会、BCR-ABL suppresses erythropoiesis through Ras signaling by the induction of p21^{CIP1/WAF1}. 2010 年 9 月 25 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑥ Tokunaga M, Ezoe S, Kanakura Y, et al. 15th Congress of Europe Hematology Association, CR-ABL BUT NOT JAK2 V617F INHIBITS ERYTHROPOIESIS THROUGH THE RAS SIGNAL BY INDUCING P21CIP1/WAF1. JUNE 11, 2010, FIRA de Barcelona (Spain)
- ⑦ Ezoe S, Kanakura Y, et al. The 7th Stem cell Research Symposium, SIRT1 Deficiency Suppressed the Maintenance of Hematopoietic Stem Cell Pool. May 16, 2009, Tokyo

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/bldon/www/home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江副 幸子 (EZOE SACHIKO)

大阪大学・医学部附属病院・特任講師
(常勤)
研究者番号：90379137

(2) 研究分担者

金倉 譲 (KANAKURA YUZURU)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20177489

松村 到 (MATSUMURA ITARU)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：00294083
(H21年度まで分担者として参画)

織谷 健司 (ORITANI KENJI)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：70324762

水木 満佐央 (MIZUKI MASAO)
大阪大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：80283761

柴山 浩彦 (SHIBAYAMA HIROHIKO)
大阪大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：60346202