

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 7日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791076

研究課題名（和文） 細胞内 ATP 調節による造血幹細胞制御機構の解明

研究課題名（英文） Regulations of hematopoietic stem cell system by the control of intracellular ATP

研究代表者

田所 優子 (Tadokoro Yuko)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：00447343

研究成果の概要（和文）：多くの組織幹細胞が静止期に存在する状況において、細胞内 ATP 濃度の調節は幹細胞の寿命や振る舞いを制御する上で重要な因子として考えられる。本研究課題においてはエネルギーセンサーとして機能する LKB1-AMPK シグナルに着目し、LKB1 および AMPK 欠損造血幹細胞について解析を行った。その結果、これらの分子は造血幹細胞の維持に寄与していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Many tissue specific stem cells stay dormant. Therefore, the regulation of intracellular ATP is important for the control of the longevity or behaviors of stem cells. The LKB1-AMPK signaling functions as an intracellular energy sensor. To examine the role of LKB1 or AMPK in the regulatory system of hematopoietic stem cell, I analyzed LKB1- or AMPK-deficient hematopoietic stem cells. Our data demonstrated that LKB1 and AMPK contributed to the maintenance of hematopoietic stem cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：幹細胞生物学

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：幹細胞, 細胞内 ATP

1. 研究開始当初の背景

mTOR シグナルおよび PTEN-Akt-FoxO3a シグナルは、成長因子からのシグナルや栄養素の代謝を調節することで造血幹細胞の維持に重要な役割を果たしていることが報告されている。細胞は生存・活動のために栄養素の代謝を通してエネルギー通貨である ATP を産生し、それを AMP に変換して利用する。生体中において組織幹細胞は、そのほとんどが G0/G1 期の休眠状態で存在し、かつ環境の変化に応じて活動状態にも入ることができることから、幹細胞自身のエネルギー状態の管理・調節は重要であると考えられる。最近の報告で、造血幹細胞内ではミトコンドリア活性や細胞内 ATP 濃度が低く、解糖系への依存

性が高いことが示唆された。しかし造血幹細胞では、細胞内 ATP 濃度がどのような局面で、何によって調節されているのか、さらに細胞内エネルギー状態と造血幹細胞の振る舞いには関連があるのかについては現在の解析技術の限界から明らかにされていない。このような研究動向の中で、我々は mTOR シグナルの上流に位置しエネルギーセンサーとして機能する LKB1-AMPK シグナルに着目した。

近年では、細胞内 AMP の上昇時に LKB1 が AMPK を活性化することで糖や脂肪代謝の調節に機能していることが発見され、国内外を問わず癌治療だけでなく肥満や糖尿病治療の研究においても注目されている。さらに線虫では、飢餓状態において耐性幼虫となって

摂食せずに長期生存を可能にし寿命を調節することができるが、LKB1-AMPK シグナルの欠損においては耐性幼虫でエネルギーを消費してしまい寿命が短くなることが報告されている。

一方で技術的な面において、細胞内 ATP 濃度の測定には非常に多くの細胞数を必要とするため希少な幹細胞では正確な測定が困難であり、また、細胞が生きた状態で ATP を測定することができないため機能解析が困難であった。しかしながら、最近我々は、FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) 解析法を利用した ATP プローブを用いてシングル生細胞での細胞内 ATP 濃度の測定に成功した。

このような研究背景から、シングルセル ATP 濃度解析法を造血幹細胞に適用し、さらに LKB1 および AMPK 欠損マウスを用いることにより、細胞内 ATP 濃度調節による造血幹細胞の制御機構について明らかにできると考えた。

2. 研究の目的

組織幹細胞は、そのほとんどが G0/G1 期の休眠状態で存在し、かつ環境の変化に応じて活動状態にも入ることができることから、幹細胞自身のエネルギー状態の管理・調節は重要であると考えられる。我々は造血幹細胞システムをモデル系として用い、LKB1-AMPK シグナルを中心としたエネルギーセンサー機構による恒常性維持システムの解明を目指すことを目的とする。具体的には細胞外グルコース環境と造血幹細胞内 ATP 濃度の関係を明らかにし、LKB1-AMPK シグナルによる造血幹細胞の維持・増殖・分化の制御機構について理解することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 血液細胞株を用いての ATP プローブの検討

ATeam (ATP プローブ) を組み込んだレトロウイルスを作製した。この時、ネガティブコントロール・細胞質内 ATP 検出・ミトコンドリア内 ATP 検出用の 3 種類のレトロウイルスを作製した。各レトロウイルスを Jurkat 細胞に感染させ、感染した Venus (+) 細胞をセルソーターにより単離した。これらの細胞にグルコースの添加および解糖系阻害の 2-DG の添加を行ない、FACS により FRET 由来蛍光を検出し、細胞内 ATP 濃度測定を行った。またこれらの細胞は、市販の細胞内 ATP 測定キットを用いて ATP 濃度を測定し、ATP プローブの結果と比較を行なった。

(2) 正常造血幹細胞における細胞内 ATP 濃度の測定

野生型マウス骨髄から造血幹細胞を多く含む CD34-KSL 細胞をセルソーターにより採取し、市販の細胞内 ATP 測定キットを用いて ATP 濃度の測定を行った。

(3) *in vitro* グルコース環境における ATP プローブを用いた造血幹細胞内 ATP 濃度変化の測定

(1) で作製した各 ATP プローブレトロウイルスを野生型 CD34-KSL 細胞に感染させ、致死量の放射線照射処理を行ったマウスに移植を行った。3 か月後、ATP プローブ陽性 CD34-KSL 細胞をセルソーターにより採取し、様々なグルコース濃度下において一定期間培養し、FACS により細胞内 ATP 濃度の解析を行った。

(4) *in vitro* グルコース環境における造血幹細胞の AMPK 活性化状態の解析

野生型 CD34-KSL 細胞を様々なグルコース濃度下において一定期間培養し、その後免疫染色法により AMPK のリン酸化状態を検出することで AMPK 活性化状態の解析を行った。

(5) 正常マウスの絶食処置による造血幹細胞の AMPK 活性化状態の解析

野生型マウスに対し 4 8 時間の絶食を行ない、これらのマウスの骨髄から CD34-KSL 細胞をセルソーターを用いて採取し、免疫染色法により AMPK のリン酸化状態を検出した。

(6) *in vitro* グルコース環境における造血幹細胞維持の解析

野生型 CD34-KSL 細胞を様々なグルコース濃度下において一定期間培養し、その後これらの細胞を致死量の放射線照射処理を行ったマウスに競合的移植を行った。移植後、1, 2, 3, 4 か月で採決を行い、キメリズムの解析を行った。

(7) LKB1 コンディショナルノックアウトマウスにおける造血幹細胞の解析

LKB1flox にタモキシフェンの誘導により全身で Cre リコンビナーゼを発現するマウスを作製した。タモキシフェン投与後、LKB1 コンディショナルノックアウトマウスの造血について FACS 解析・*in vitro* コロニー解析等を行った。

また LKB1 コンディショナルノックアウトマウスの骨髄細胞を致死量の放射線照射処理を行った野生型マウスに移植した後タモキシフェン投与を行ない、経時的に FACS 解析・*in vitro* コロニー解析等を行った。

(8) AMPK α 1 α 2 ダブルコンディショナルノックアウトマウスにおける造血幹細胞の解析

AMPK α 1 α 2 ダブル flox にタモキシフェンの

誘導により全身でCre リコンビナーゼを発現するマウスを作製した。タモキシフェン投与後、AMPK α 2 ダブルコンディショナルノックアウトマウスの造血についてFACS 解析・in vitro コロニー解析等を行った。

またAMPK α 2 ダブルコンディショナルノックアウトマウスの骨髄細胞を致死量の放射線照射処理を行った野生型マウスに移植した後タモキシフェン投与を行ない、経時的にFACS 解析・in vitro コロニー解析等を行った。

4. 研究成果

(1) 血液細胞株を用いた ATP プローブの検討

ATP プローブを導入した Jurkat 細胞においては、培養液中の各グルコース濃度および2-DG 添加に応じてFRET 由来の蛍光強度が変動していることが認められた。この変動は市販の細胞内ATP 濃度測定キットを用いて測定したATP 濃度と相関を示した。この結果は、ATP プローブは生きた状態でシングルセルの細胞内ATP 濃度を解析できることを示した。この技術を用いて、細胞内ATP 濃度の測定と細胞機能解析を同時に行えることが可能となった。

(2) 正常造血幹細胞における細胞内ATP 濃度の測定

正常造血幹細胞の細胞内ATP 濃度はJurkat などの培養細胞とは異なり、非常に低濃度であることが明らかとなった。

(3) in vitro グルコース環境におけるATP プローブを用いた造血幹細胞内ATP 濃度変化の測定

正常造血幹細胞にATP プローブを導入し、in vitro での様々なグルコース濃度下における造血幹細胞内ATP 濃度の解析を行った。その結果、各グルコース濃度環境に応じて造血幹細胞内のATP 濃度は変化していることが明らかとなった。しかしin vivo においてはATP プローブの検出感度以下となり、十分に観察することができなかった。

(4) in vitro グルコース環境における造血幹細胞のAMPK 活性化状態の解析

細胞外のグルコース濃度の影響によるAMPK 活性化の変化を解析した。低グルコースから高グルコース環境まで濃度を変化させて解析を行った結果、低グルコース環境下においてAMPK の活性化亢進が認められ、高グルコース環境下ではAMPK のリン酸化の程度は低下することが明らかとなった。このことから、造血幹細胞におけるAMPK の活性化状態は、細胞外のグルコース濃度の変化に応じて調

節されていることが分かった。

(5) 正常マウスの絶食処置による造血幹細胞のAMPK 活性化状態の解析

48時間の絶食処置を行った正常マウス骨髄より造血幹細胞および前駆細胞を分取してリン酸化AMPK 抗体を用いた免疫染色法によりAMPK 活性化の解析を行った。その結果、造血幹細胞・前駆細胞共にAMPK の活性化が亢進していた。また前駆細胞の細胞周期がG0 期へとシフトしていることが明らかとなった。

(6) in vitro グルコース環境における造血幹細胞維持の解析

それぞれのグルコース環境下で一定期間培養した正常造血幹細胞を致死量の放射線処置したマウスに競合移植し、幹細胞機能の解析を行った。その結果、それぞれ異なるグルコース環境下においても幹細胞機能を維持していることが明らかとなった。

(7) LKB1 コンディショナルノックアウトマウスにおける造血幹細胞の解析

タモキシフェン投与によりLkb1 遺伝子欠損後の解析を行った結果、LKB1 遺伝子欠損1週間後では対照マウスとの差が見られなかったものの、2週間後において血液細胞の急激な減少が認められ死亡することが確認された。Lkb1flox コンディショナルノックアウト造血幹細胞を野生型マウスに移植後に遺伝子欠損を誘導しても同様の現象が確認された。さらに骨髄内の解析を行った結果、造血幹細胞画分が減少していること、コロニー形成能が低下していること、移植による骨髄再構築能が低下していることが明らかとなった。このことから、LKB1 は造血幹細胞の維持に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

(8) AMPK α 2 ダブルコンディショナルノックアウトマウスにおける造血幹細胞の解析

AMPK α 2 ダブルflox コンディショナルノックアウトマウスに関してタモキシフェン投与によりAMPK α 2 遺伝子の欠損を誘導した結果、貧血および脾腫が観察された。さらにAMPK α 2 ダブルコンディショナルノックアウト骨髄細胞を野生型マウスに競合移植した後遺伝子欠損を誘導しても同様の現象が確認された。またLKB1 コンディショナルノックアウトマウスほどではないものの、経時変化におけるキメリズムの緩やかな減少およびコロニー形成能の低下があることが明らかとなった。

以上の事から、AMPK も造血幹細胞の機能維持に関与していることが示唆された。

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3件)

① Shugo, H., (他13名、6番目)

“Nucleostemin in injury-induced liver regeneration”

Stem Cells and Development

査読 有, 21, 2012, 3044-3054

DOI; 10.1089/scd.2011.0725.

② Hoshii, T., Tadokoro, Y., (他8名)

“mTORC1 is essential for leukemia propagation but not stem cell self-renewal”

The Journal of Clinical Investigation

査読 有, 122, 2012, 2114-2129

DOI; 10.1172/JCI62279.

③ Naka, K., Hoshii, T., Tadokoro, Y., Hirao, A.

“Molecular pathology of tumor-initiating cells: Lessons from Philadelphia chromosome-positive leukemia”

Pathology international

査読 有, 61, 2011, 501-508

DOI; 10.1111/j.1440-1827.2011.02688.x.

[学会発表] (計5件)

① Yuko Tadokoro

“A competitive advantage of hematopoietic stem cells in the bone marrow controlled by Spred-1”

第74回 日本血液学会学術集会

平成24年10月19-21日

国立京都国際会館 (京都府)

② Yuko Tadokoro

“A competitive advantage of hematopoietic stem cells in the bone marrow controlled by Spred-1”

The 10th Stem Cell Research Symposium

2012年5月31日-6月2日

兵庫県立淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県)

③ Yuko Tadokoro

“Enhanced competitive repopulation ability of hematopoietic stem cells by inhibition of Spred-1”

The 6th International Symposium of Institute Network

2011年6月9-10日

東京医科歯科大学 (東京)

④ Yuko Tadokoro

“Enhanced competitive repopulation ability of hematopoietic stem cells by inhibition of Spred-1”

日本分子生物学会 第11回春季シンポジウム

平成23年5月25日

石川県立音楽堂 (石川県)

⑤ Yuko Tadokoro

“Enhanced competitive repopulation ability of hematopoietic stem cells by inhibition of Spred-1”

The 9th Stem Cell Research Symposium

2011年5月13-14日

泉ガーデンギャラリー (東京)

[図書] (計1件)

① 田所 優子, 平尾 敦

メディカルレビュー社

再生医療 “組織幹細胞システムにおける幹細胞ニッチ”

2011, pp58-59 (442-443)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田所 優子 (Tadokoro Yuko)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号: 00447343

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし