

造血幹細胞の自己複製分裂時における Thrombopoietin 応答のチューニング

梅本晃正

熊本大学 国際先端医学研究機構

【研究の背景】

放射線照射や抗癌剤投与による骨髄組織損傷後のストレス造血時では、造血幹細胞は活発に自己複製分裂を繰り返し、造血組織再構築を主導すると考えられている。しかし、このようなストレス造血下では造血幹細胞の表現型が変化するため、従来法では分裂期の造血幹細胞の正確な同定や詳細な解析は困難であった。一方で、申請者は近年、ストレス造血下でも定常状態時と同等の精度で正確に造血幹細胞を同定する方法を確立し¹⁾、① 抗癌剤である 5-Fluorouracil (5-FU) 投与後のストレス造血時の造血幹細胞分裂開始に先立って、「細胞内カルシウム濃度/ミトコンドリア膜電位」が上昇すること、② 幹細胞分裂時のミトコンドリア活性の適度な抑制は分裂後の幹細胞性の維持に寄与することを見出した²⁾。

一方、SH2B ファミリーに属するアダプター分子である Lnk の欠損は Thrombopoietin (TPO) /Jak2/STAT pathway の増強することで、造血幹細胞の自己複製能を亢進することが報告されている³⁾。しかし、造血幹細胞における JAK2 の恒常的活性型変異体の強制発現は骨髄増殖性疾患や癌化を誘発するため、Lnk 欠損による正常造血幹細胞の自己複製能亢進には上記機構に加え、他の抑制的機構の寄与も必要であることが示唆される。

そんな中、申請者らは準備実験において、Lnk 欠損は① TPO 存在下であっても *in vitro* では幹細胞性維持の観点では十分なアドバンテージをもたらさない一方、② 自己複製亢進効果が確認される *in vivo* では造血幹細胞のミトコンドリア活性の抑制に寄与することを既に見出している。さらに、*in vitro* でのミトコンドリア膜電位抑制条件下では、幹細胞性が維持されると同時に TPO 応答が強く影響を受けていることも確認している。これらの結果から、申請者は、造血幹細胞の自己複製分裂には「ミトコンドリア活性抑制による TPO 応答のチューニング」が重要であると共に、Lnk 欠損が JAK2 の恒常的活性型変異体と比較して、骨髄増殖性疾患のリスクが低い要因でもあるという作業仮説に至った。

【目 的】

本研究では、「造血幹細胞の自己複製能亢進が促される Lnk 欠損時」と「造血幹細胞の自己複製分裂誘導時」に共通して見出された特徴である“ミトコンドリア活性の抑制的制御”が、造血幹細胞の増殖・維持・分化を司るサイトカイン“Thrombopoietin (TPO)”の応答を幹細胞性維持・増殖用にチューニングすることで、自己複製分裂を誘導するメカニズムを明らかにし、造血幹細胞の運命決定機構の本質に迫る。さらに、未だ達成されていない命題である *ex vivo* における造血幹細胞の維持・増幅のための基盤技術の開発を目指す。

【方 法】

1) Lnk 欠損造血幹細胞の分裂様式の検討:

野生型および Lnk 欠損造血幹細胞を CFSE 色素でラベルした後、野生型マウス(放射線未照射)に移植し、その後 14 日後に、移植した細胞の分裂回数、幹細胞、ミトコンドリア膜電位の割合等を検討した。

2) 自己複製分裂亢進機構におけるミトコンドリア活性化の役割の検討:

自己複製分裂の亢進が確認できる *in vivo* モデル(5-FU 投与後の骨髄組織再構築など)に、CFSE でラベルした野生型造血幹細胞に移植し、その後の分裂回、幹細胞マーカー、ミトコンドリア膜電位等を検討した。

【結 果】

最初に Lnk 欠損造血幹細胞における自己複製分裂亢進を確認するため、野生型および Lnk 欠損造血幹細胞を野生型マウス(放射線未照射)移植し、その後 14 日後にドナー細胞の状態を確認した。その結果、移植された Lnk 欠損造血幹細胞は野生型幹細胞よりも、幹細胞分画のみならず、全細胞分画において分裂回数の上昇を確認した。さらに、ドナー細胞中の造血幹細胞の割合を比較したところ、両者で顕著な差は確認されなかった。これは、*in vitro* での培養でも同等の傾向を得ている。これらより、Lnk 欠損は細胞の分裂促進が幹細胞数増幅に寄与しているだけであり、細胞運命制御には寄与していないものと考えられた。

従って、次に TPO 刺激が自己複製に関わる場面として、5-FU 投与後の自己複製分裂時のメカニズムに着目した。そこで、5-FU 投与後の造血幹細胞数とミトコンドリア膜電位を経時的に検討したところ、造血幹細胞の増殖期間中にミトコンドリア膜電位が大きく変動することを見出した。さらに、5-FU 投与マウスに未処理造血幹細胞を移植し、ドナー細胞の動態を検討したところ、ミトコンドリア膜電位が高い状態で分裂しているときは主に幹細胞を、ミトコンドリア膜電位が低い状態で分裂しているときは幹細胞だけでなく前駆細胞も生み出していることを見出した。実際に、未処理マウス(放射線未照射)に造血幹細胞を移植したときにも、分裂した造血幹細胞はむしろより多くの前駆細胞が生み出しており、このときはミトコンドリア膜電位が非常に低いことも確認している。

【考 察】

当初の仮説とは真逆に、造血幹細胞が主に幹細胞を生み出す分裂はミトコンドリア代謝に依存している可能性、また前駆細胞を生み出す分裂はミトコンドリアに依存せずに行われていることが示唆された。さらに、定常状態で低いミトコンドリア膜電位で分裂した幹細胞は主に前駆細胞を生み出すことから、定常状態で幹細胞が分裂しないように制御されている理由の一端も、この現象と関連している可能性が考えられた。また、幹細胞分裂自身は TPO 等のサイトカイン刺激により促されるようであるが、その後の運命はサイトカイン刺激よりむしろ、他の因子の影響を受けているようであった。そして、本研究によって、その一つの要因がエネルギー代謝である可能性を見出し、TPO をはじめとした造血幹細胞分裂誘導因子はエネルギー代謝によってチューニングされている可能性が考えられた。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究の成果は、造血幹細胞分裂時、および分裂後における幹細胞性維持機構の一端を解析しているものである。従って、本研究の成果は試験管内の造血幹細胞増幅や、骨髄移植療法時のドナー幹細胞の自己複製分裂のサポート等、主に骨髄移植療法の発展に大きく寄与するものと考えられる。

【参考・引用文献】

1. Umemoto, T*, Matsuzaki, Y., Shiratsuchi, Y., Hashimoto, M., Yoshimoto, T., Nakamura-Ishizu, A., Petrich, B., Yamato, M., and Suda, T*. (2017) Integrin alphavbeta3 enhances the suppressive effect of interferon-gamma on hematopoietic stem cells. *EMBO J* 36, 2390-2403 (* Corresponding authors)
2. Umemoto, T*, Hashimoto, M., Matsumura, T., Nakamura-Ishizu, A., and Suda, T*. (2018) Ca²⁺-mitochondria axis drives cell division in hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 215, 2097-2113 (* Corresponding authors)
3. Ema H, Sudo K, Seita J, Matsubara A, Morita Y, Osawa M, Takatsu K, Takaki S, Nakauchi H. Quantification of self-renewal capacity in single hematopoietic stem cells from normal and Lnk-deficient mice. *Dev Cell*. 2005 8(6):907-14