

## クロマチン動態制御を基盤とした造血幹細胞のトロンボポイエチン作用決定機構

梅本晃正

熊本大学 国際先端医学研究機構

### 【研究の背景】

血液細胞の源であり、体性幹細胞の一つである造血幹細胞は自己複製能と多分化能を駆使して一生に渡り、造血システムを維持し続ける。トロンボポイエチン(Thrombopoietin: TPO)は造血幹細胞の自己複製分裂を誘導するサイトカインとして極めて有名である一方、巨核球・血小板への分化誘導因子としても知られている。しかしながら、造血幹細胞が TPO の相反する 2 面的効果(自己複製、又は分化誘導)を使い分ける機構に関しては未だ不明な点が多い。申請者らは自己複製分裂(主に幹細胞のみを生み出す分裂)を繰り返している骨髓再生期初期や新生児期の造血幹細胞に着目し(Umemoto et al., J Exp Med, 2018; Hashimoto, Umemoto et al., Blood Adv., 2021)、造血幹細胞の分裂後の運命は幹細胞各々のクロマチン動態によって既定されていることを見出した(Umemoto et al., EMBO J, 2022)。

### 【目 的】

本研究では造血幹細胞における TPO 刺激時の自己複製・分化の選択は主に幹細胞個々のクロマチン動態によって既定されているとの仮説の下、「幹細胞の TPO 応答を既定するクロマチン動態の制御因子」を明らかにすることを目的とする。

### 【方 法】

申請者は定常状態時の造血幹細胞集団の不均一性に着目し、特に高い自己複製能を持つ Endothelial Protein C Receptor 強発現する(EPCR<sup>High</sup>)分画を通常条件下で培養すると、その多くは分化型の EPCR<sup>Low</sup> 幹細胞になってしまうが、低グルタミン条件下で培養すると、EPCR<sup>Low</sup> 幹細胞の出現が抑制され、EPCR<sup>High</sup> 幹細胞が維持されることを示唆する結果を得ている。従って、グルタミン代謝経路において  $\alpha$  KG 合成経路に関わる酵素(Got1, Got2, Glud1 等)の欠損や阻害剤等が、幹細胞培養時の EPCR<sup>High</sup> 表現系や自己複製分裂能に及ぼす影響を検討する。

### 【結 果】

申請者は骨髓造血再生期に自己複製する造血幹細胞は通常条件下での培養時に分化してしまう時と比較して、極めて低い細胞内グルタミン酸レベルを示すことを見出し(図 1A)、細胞内グルタミン酸レベルの制御が造血幹細胞の自己複製分裂誘導に極めて重要である可能性をさらに支持する結果を得た。さらに、グルタミン分解経路中のグルタミン酸異化に関わる 2つの代謝反応の阻害実験により、①アミノ基転移反応は造血幹細胞の分裂誘導に必須である、②グルタミン酸脱水素反応は分化を誘導することを見出した(図 1B)。重要なことに、EPCR<sup>High</sup> 幹細胞をグルタミン酸脱水素酵素 Glud1 の阻害下で培養すると、通常培養時と同等の造血幹細胞の増殖(分裂)活性を維持しながらも EPCR<sup>High</sup> 表現型が顕著に維持され、結果として僅か 4 日間の培養で EPCR<sup>High</sup> 幹細胞が約 3 倍に増幅された(図 1 C-E)。さらに、Glud1 阻害下で増幅した EPCR<sup>High</sup> 幹細胞は、通常条件下で維持された EPCR<sup>High</sup> 幹細胞より優れた長期骨髓生着能を示し、その生着能は未培養の EPCR<sup>High</sup> 幹細胞と同等であった(図 1F)。

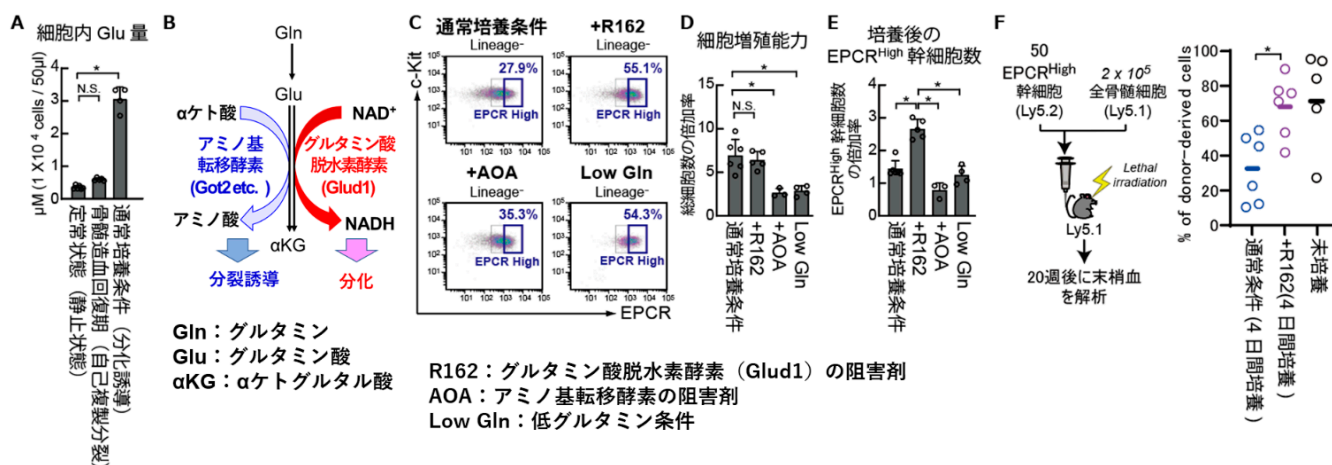


図 1: グルタミン代謝と造血幹細胞の自己複製分裂

A: 造血幹細胞の細胞内グルタミン酸 (Glu) レベル (\*p<0.01)。

B: グルタミン代謝経路中のグルタミン酸異化反応

C-E: それぞれの条件下で EPCR<sup>High</sup> 幹細胞を4日間培養した後の総細胞中における EPCR<sup>High</sup> 幹細胞の割合 (C)、総細胞数の増加倍率 (D)、EPCR<sup>High</sup> 幹細胞数の増加倍率 (E) (\*p<0.01)

F: 未培養の、又は4日間培養後に維持された EPCR<sup>High</sup> 幹細胞 50 個を致死線量放射線照射後のマウスに移植し、その20週後に末梢血におけるドナー造血幹細胞由来にする細胞の割合を検討し、造血幹細胞の幹細胞活性を測定した (\*p<0.01)。

## 【考 察】

これらの結果より、造血幹細胞は細胞内グルタミン酸レベルの上昇を伴って分裂すると Glud1 応答が活性化して分化してしまうが、細胞内グルタミン酸レベルの低く維持したまま造血幹細胞の分裂を誘導すると、Glud1 による分化誘導を回避することで自己複製分裂に至ると考えられる。この可能性は骨髄再生期に自己複製する造血幹細胞が通常条件下で培養された幹細胞よりも極めて低い細胞内グルタミン酸レベルを示したことにより、支持されると考えられる。一方で、通常条件下では細胞内グルタミン酸レベルの上昇が分裂の活性化に重要であったことから、自己複製分裂誘導においては細胞内グルタミン酸レベルの上昇に依存しない細胞分裂誘導機構が重要なポイントになると考えられる。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究で TPO 刺激時における造血幹細胞の運命選択機構が明らかになれば、“メカニズムに基づいた”体外での幹細胞維持・増幅技術、骨髄抑制からの回復治療や骨髄移植後の造血組織再生促進のための治療法の基盤技術の開発に寄与することも期待される。また、造血幹細胞における TPO 応答制御に対して新たな知見が生み出されることにより、再生不良性貧血、骨髄無形成症候群等の造血幹細胞の減少や機能不全に起因する疾患のみならず、特発性血小板減少性紫斑病等の TPO 受容体作動薬を用いた治療対象の疾患に関して、新たな戦略・展開をもたらすことも期待される。

## 【参考・引用文献】

1. Umemoto T, Johansson A, Ahmad SAI, Hashimoto M, Kubota S, Kikuchi K, Odaka H, Era T, Kurotaki D, Sashida G, Suda T. ATP citrate lyase controls hematopoietic stem cell fate and supports bone marrow regeneration. EMBO J. 2022 Apr 19;41(8):e109463. doi: 10.15252/embj.2021109463. Epub 2022 Mar 1.
2. Umemoto T, Hashimoto M, Matsumura T, Nakamura-Ishizu A, Suda T. Ca<sup>2+</sup>-mitochondria axis drives cell division in hematopoietic stem cells. J Exp Med. 2018 Aug 6;215(8):2097-2113. doi: 10.1084/jem.20180421. Epub 2018 Jun 26.
3. Hashimoto M, Umemoto T, Nakamura-Ishizu A, Matsumura T, Yokomizo T, Sezaki M, Takizawa H, Suda T. Autophagy is dispensable for the maintenance of hematopoietic stem cells in neonates. Blood Adv. 2021 Mar 23;5(6):1594-1604. doi: 10.1182/bloodadvances.2020002410.