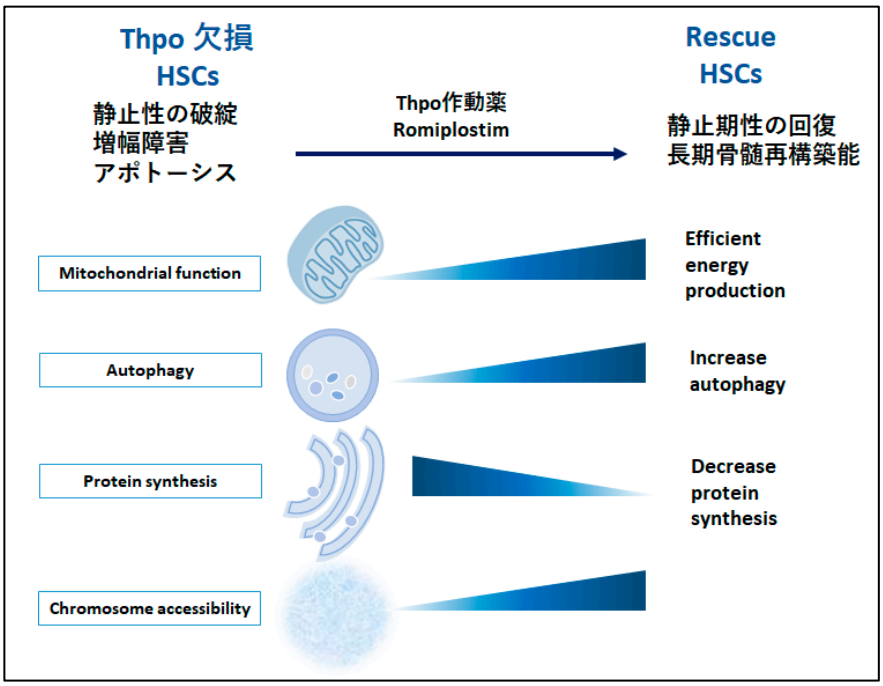
226　ミトコンドリア恒常性による造血幹細胞維持機構の解析	石津　綾子

【目的】造血幹細胞（hematopoietic stem cell：HSC）の分化・増殖により一生に渡り生体の成熟血球が供給される。健常な造血システムにおいて、HSC はストレス造血時などに備え、一定のプールが骨髄中で細胞周期静止期の状態で維持される。生体内で産生されるサイトカイン、Thrombopoietin（Thpo）は骨髄 HSC の静止期維持及び分化・増殖の双方に関与しているが、その詳細なメカニズムや制御機構は不明な点が多い。本研究は、Thpo によるエネルギー代謝制御に焦点を当て、ミトコンドリアの恒常性による HSC の骨髄内での細胞周期静止期の維持制御機構を解析することを目的とした。

【方法】Thpo による静止期 HSC の誘導機構及び mitochondria 代謝能との関連性並びに *Thpo* 欠損下で生存する HSC をさらに詳細に解析した。*Thpo* 遺伝子欠損マウスに Romiplostim を投与し、HSC 及び mitochondria 機能の詳細な解析を行った。また、Mitochondria を可視化できる Mito-Dendra2 マウスを *Thpo* 欠損マウスと交配させ、mitochondria の形態解析を行った。また、autophagy や mitochondria turnover による mitochondria 機能変化、mitochondria 代謝の活性化・抑制について遺伝子発現解析などから検証した。また、*Thpo* 遺伝子欠損マウスと正常マウスより HSC を分離し、RNA sequencing、ATAC sequencing 解析を行い、遺伝子発現と epigenetic 制御解析を行った。さらに、*Thpo* 遺伝子欠損マウスに recombinant Thpo 又は Thpo 受容体 agonist（Romiplositim）を投与し *Thpo* 欠損状況で変動のある遺伝子などを抽出し、その機能解析をさらに行った。

【結果】*Thpo* 遺伝子欠損マウスと野生型マウスの HSC の増殖性・数・分化などの変化より、*Thpo* 遺伝子欠損マウスでは Romiplostim の連続投与により静止性の高い HSC の増幅が認められた。RNA sequence 解析にて、*Thpo* 遺伝子欠損マウスでは野生型マウスに比較し、HSC における mitochondria 代謝関連遺伝子群の有意な変動が認められた。Mitochondria の機能及び形態の詳細な解析では *Thpo* 遺伝子欠損マウスの HSC では mitochondria 体積量の減少、ROS 産生の上昇、ATP 産生低下が有意に認められ、これらは Romiplositim の連続投与により改善を認めた。Thpo シグナル及び mitochondria 代謝が HSC の細胞周期静止期の維持に貢献し、造血システムの維持に重要である。

サイトカイン Thpo を介した HSC 代謝変動による幹細胞能の維持機構



226. ミトコンドリア恒常性による造血幹細胞維持機構の解析

石津　綾子

東京女子医科大学 医学部 解剖学 顕微解剖・形態形成分野

Key words：造血幹細胞，トロンボポエチン，細胞周期静止期，ミトコンドリア代謝，巨核球分化

緒　言

造血幹細胞（hematopoietic stem cell：HSC）の分化・増殖により一生に渡り生体の成熟血球が供給される。健常な造血システムにおいて、HSC はストレス造血時などに備え、一定のプールが骨髄中で細胞周期静止期の状態で維持される。生体内で産生されるサイトカイン、Thrombopoietin（Thpo）は骨髄 HSC の静止期維持及び分化・増殖の双方に関与しているが、その詳細なメカニズムや制御機構は不明な点が多い。

多系統の血球への分化能を有する HSC は、比較的早期に巨核球に直接分化することが知られている。我々はこれまで HSC を制御する微細環境（骨髄ニッチ）について研究を続け［1, 2］、ニッチ因子による HSC 制御機構を解析した。特にニッチ因子の一つである Thpo による HSC の巨核球系統細胞への分化に焦点を当てた。Thpo シグナルは HSC の mitochondria 活性を増加させ、また、mitochondria 活性が高い HSC は巨核球系統への分化が有意に高いことを確認した。これらより、造血幹細胞の巨核球分化には Thpo シグナルを介した mitochondria 代謝制御が強く関わっていることを報告した［3］。また、細胞内に mitochondria を多く保有する HSC は幹細胞能が高いことを報告した［4］。しかし、増殖期にある細胞は mitochondria 活性が高く、幹細胞能が高い HSC は mitochondria 活性が低いことは定説とされており、mitochondria 活性を高める Thpo の作用は Thpo の幹細胞能維持機能と矛盾する。一方、休止状態にあるにもかかわらず、HSC は造血前駆細胞と比較し多くの mitochondria を保有することも報告され［5］、HSC における mitochondria の状態も解析され始めているが、mitochondria の様々な機能がどの様に制御され、どの様に HSC の維持・分化に関わるのかは解明されていない。さらに、Thpo がどの様に HSC の mitochondria 代謝と細胞周期静止期を制御するのか不明な点が多い。本研究はこれまでに解析されていない Thpo による HSC 細胞周期静止期誘導のメカニズムを解析し、生体内における造血システムの恒常性維持機構における Thpo の役割、及び mitochondria 代謝機構を解明することを目的とする。

方法および結果

1. *Thpo* 欠損による HSC ミトコンドリア代謝障害

Thpo 遺伝子欠損マウスを作製し、HSC の状態を詳細に解析した。これまで *Thpo* 遺伝子欠損マウスにおいて骨髄内 HSC の数の著しい低下は報告されている［6］。過去の論文と同様、作製した *Thpo* 遺伝子欠損マウスでは著名な血小板減少とともに静止期 HSC の数、頻度の優位な低下を認めた。*Thpo* 遺伝子欠損マウス由来の HSC は細胞内の mitochondria mass の低下及び ATP 産生の著しい低下を認めた。しかしながら、*Thpo* 遺伝子欠損マウスより HSC を分離し、競合的移植により正常マウスに骨髄移植を行ったところ、*Thpo* 欠損状態にある HSC は正常 HSC と著変なくドナーマウスの造血を再構築した（図 1A～C）。*Thpo* 欠損 HSC が Thpo レベルの正常なレシピエントでは幹細胞能が回復することを示唆していた。*Thpo* 遺伝子欠損マウスの造血幹細胞の状態をさらに解析すべく、Thpo 作動薬の Romiplostim を *Thpo* 遺伝子欠損マウス及び、野生型マウスに連日投与し、造血の反応性を解析したまた。Romiplostim を 10 日間連続で静脈投与したところ、*Thpo* 遺伝子欠損マウスの末梢血血小板数の回復が認められた。野生型マウスでは Romiplostim 投与とともに増殖期造血幹細胞の増加とそれに伴う静止期造血幹細胞の減少が認められた。しかし

ながら、*Thpo* 遺伝子欠損マウスでも、造血幹細胞数の増加がみられたものの、増殖期ではなく静止期にある造血幹細胞数の増加がみられた（図 1D、E）。これらの結果は①Thpo が HSC の mitochondria 代謝を制御すること、②*Thpo* 欠損下の HSC 異常は可逆的であることを示しており、*Thpo* 欠損下においても数少なく生存する HSC は Thpo シグナル活性を回復させることで幹細胞機能を増幅させ、静止期誘導を行うことができることを示唆していた。また、*Thpo* 欠損下で生存できる造血幹細胞は野生型マウスと異なる Thpo シグナル応答性を示すことが考えられ、造血幹細胞のサイトカインシグナル応答性の Heterogeneity が示唆された。

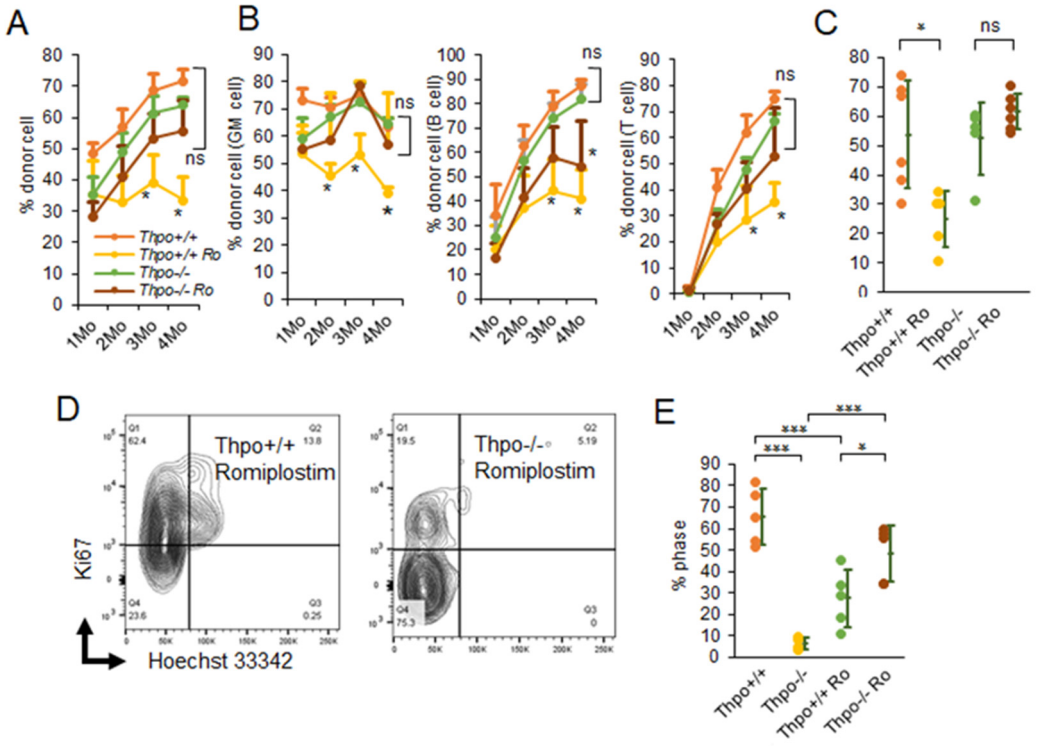


図 1. Thpo 欠損 HSC の幹細胞能の可逆性

A～C） *Thpo* 欠損マウス（$Thpo^{-/-}$）、野生型マウス（$Thpo^{+/+}$）、及び Romiplostim 投与マウス（$Thpo^{+/+}$ Ro、$Thpo^{-/-}$ Ro）より分離した HSC の競合的骨髄移植。末梢血全体の有核血球（A）と顆粒球（GM）・B 細胞・T 細胞（B）、骨髄 HSC（C）のドナー由来キメリズムを示している。

D、E） *Thpo* 欠損マウス（$Thpo^{-/-}$）と野生型マウス（$Thpo^{+/+}$）に Romiplostim 投与した際の細胞周期性の変動。$Thpo^{-/-}$では Romiplostim 投与にて Ki67-Hoechst-の静止期（G0）の HSC の増加が認められる。

Student t-test にて、ns：有意差なし、*P＜0.05、***P＜0.001。

2. *Thpo* 欠損 HSC における mitochondria 関連遺伝子発現変化

Thpo 欠損下また、Romiplostim 投与後の HSC を分離し、RNA シークエンス解析にて遺伝子発現解析（図 2A）を行った。その結果、*Thpo* 欠損 HSC はミトコンドリア代謝、オートファジー、タンパク産生など広く代謝に関わる遺伝子発現の変動が認められた。同時にこれらの遺伝子発現パターンは Romiplostim 投与により野生型に近寄ることを認めた（図 2B）。

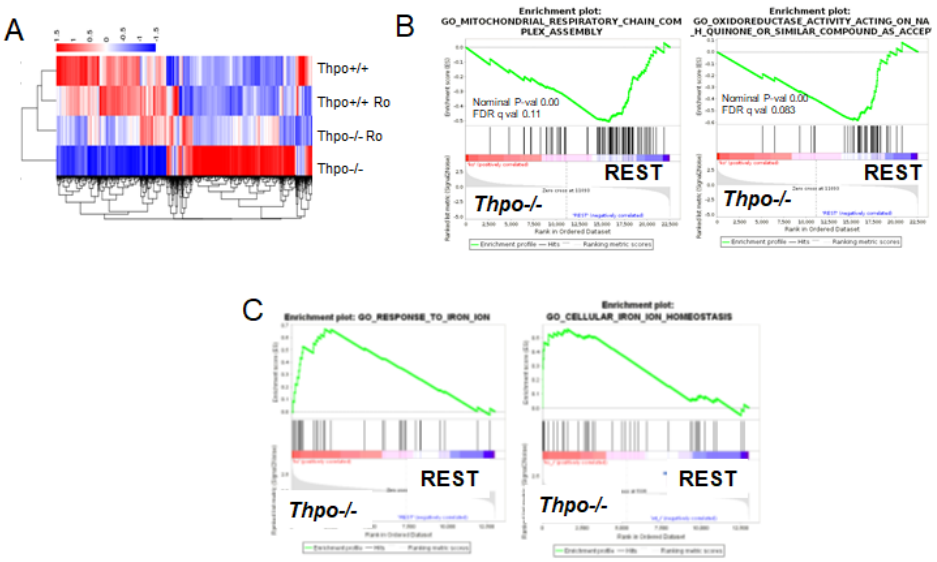


図 2.　*Thpo* 欠損 HSC における遺伝子発現変化

Thpo 欠損マウス（Thpo$^{-/-}$）、野生型マウス（Thpo$^{+/+}$）、及び Romiplostim 投与マウス（Thpo$^{+/+}$ Ro、Thpo$^{-/-}$ Ro）より分離した HSC の RNA シークエンス解析。

A）　Heat map 解析。

B、C）　GSEA 解析にて Thpo$^{-/-}$ HSC は他の 3 群（Thpo$^{+/+}$、Thpo$^{+/+}$ Ro、Thpo$^{-/-}$ Ro）と比較して mitochondria 関連遺伝子（B）及び鉄代謝関連遺伝子（C）発現に関して有意な enrichment を認めた。

3.　*Thpo* 欠損 HSC における mitochondria 代謝変動

2 の結果を踏まえ、*Thpo* 欠損マウス、野生型マウス及び Romiplostim を投与したマウスから分離した HSC の mitochondria 状態を解析した。Mito-Dendra2 マウスと交配した *Thpo* 欠損マウスでは、HSC における Mitochondria 体積量の減少が認められた、Romiplositim 投与にて回復することを認めた。加えて、ATP 産生量、ROS 産生量なども Romiplostim 投与にて改善した。障害された Mitochondria は細胞内で Autophagy（mitophagy）により除去されるが、*Thpo* 欠損マウス HSC を Autophagy･Mitophagy 特異的染色プローブにて解析したところ、Autophagy･Mitophagy ともに *Thpo* 欠損で増加し、Romiplostim 投与にて減少することを認めた。これらのことは、*Thpo* 欠損状態では Mitochondria のエネルギー産生が障害され、除去されていることを示唆している。さらには、HSC における新規タンパク合成を OPP-Puromycin 取り込にて評価した。*Thpo* 欠損マウスでは Romiplostim 投与にて新規タンパク合成が非投与時と比較して新規タンパク合成が有意に低下することを認めた。

4.　*Thpo* 欠損 HSC における鉄代謝変動

また、RNA シークエンス解析のデータより、鉄代謝関連の遺伝子発現に差が認められた（図 2C）ことから、*Thpo* 欠損 HSC の mitochondria 機能障害には鉄代謝が関連しているものと考えた。*Thpo* 欠損 HSC では野生型マウスと比較し、細胞内及び、mitochondria 内鉄レベルの有意な低下が認められた。現在、mitochondria 鉄による HSC 幹細胞能制御と Thpo による mitochondria 鉄制御機構に関して、さらに解析を進めている。

考　察

Thpo は HSC に直接作用し、その維持と分化に関わる数少ないサイトカインであるが、その作用機構の詳細は解明されていない。Thpo シグナルは HSC の自己複製増殖を促す一方、静止期性の維持にも関わり、一見相反する細胞運命の誘導に関わる。本研究から、Thpo シグナル増幅に伴う HSC 代謝の正常化が HSC の静止性に関わると考えられ

た。また、野生型マウスと *Thpo* 遺伝子欠損マウス由来の HSC の Romiplostim 反応性が異なったことから、HSC は Thpo への反応性において多様性がある可能性が示唆された。Thpo シグナルがどの様に HSC の運命を制御するか、また mitochondria の恒常性の維持に関わるのか、今後もさらに解析が必要と考えられる。特に、Thpo 作動薬の使用は既存治療で効果不十分な再生不良性貧血患者の適応として認可されており、Thpo が HSC に直接もたらす影響を解析することは、HSC の機能不全をきたす様々な血液疾患の病態解明のみならず、Thpo 作動薬の治療適応の決定や合併症の予防にも関連する。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、シンガポール国立大学 Cancer Science Institute の須田年生教授である。

文　献

1） Nakamura-Ishizu A, Okuno Y, Omatsu Y, Okabe K, Morimoto J, Uede T, et al. Extracellular matrix protein Tenascin-C is required in the bone marrow microenvironment primed for hematopoietic regeneration. Blood 2012. https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-393645.

2） Nakamura-Ishizu A, Takubo K, Kobayashi H, Suzuki-Inoue K, Suda T. CLEC-2 in megakaryocytes is critical for maintenance of hematopoietic stem cells in the bone marrow. J Exp Med 2015;212:2133–46. https://doi.org/10.1084/jem.20150057.

3） Nakamura-Ishizu A, Matsumura T, Stumpf PS, Umemoto T, Takizawa H, Takihara Y, et al. Thrombopoietin Metabolically Primes Hematopoietic Stem Cells to Megakaryocyte-Lineage Differentiation. Cell Rep 2018;25:1772-1785.e6. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.059.

4） Takihara Y, Nakamura-Ishizu A, Tan DQ, Fukuda M, Matsumura T, Endoh M, et al. High mitochondrial mass is associated with reconstitution capacity and quiescence of hematopoietic stem cells. Blood Advances 2019;3:2323–7. https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019032169.

5） de Almeida MJ, Luchsinger LL, Corrigan DJ, Williams LJ, Snoeck H-W. Dye-Independent Methods Reveal Elevated Mitochondrial Mass in Hematopoietic Stem Cells. Cell Stem Cell 2017;21:725-729.e4. https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.11.002.

6） Qian H, Buza-Vidas N, Hyland CD, Jensen CT, Antonchuk J, Månsson R, et al. Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells. Cell Stem Cell 2007;1:671–84. https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.10.008.