

博士論文

論文題目 骨髄内のアミノ酸バランス変化に伴う
造血幹細胞の維持機構の解析

氏名 田矢 祐規

骨髓内のアミノ酸バランス変化に伴う
造血幹細胞の維持機構の解析

東京大学大学院 医学系研究科

病因・病理学専攻

博士課程

指導教員名：中内 啓光

申請者名：田矢 祐規

目次

I 略語.....	3
II 要旨.....	6
III 序文.....	7
IV 材料と方法.....	12
(1) マウス.....	12
(2) 培養液およびマウス人工飼料.....	12
(3) アミノ酸濃度および分布の測定.....	13
(4) 全血球計算.....	14
(5) マウス造血幹・前駆細胞の解析および純化方法.....	14
(6) 末梢血、骨髄の血球分化細胞解析.....	15
(7) 骨髄の B 細胞、胸腺の T 細胞解析.....	16
(8) CD34 ⁺ KSL 細胞と CD34 ⁺ KSL 細胞の培養.....	16
(9) シングルセルコロニーアッセイ.....	17
(10) ROS 活性の測定.....	17
(11) N-acetyl cysteine 救援試験.....	18
(12) 競合的骨髄再構築法.....	18
(13) 細胞周期解析.....	19
(14) RNA 抽出及び RNA sequence.....	19

(15) 病理組織解析	20
(16) 骨髄ニッチ構成細胞のアミノ酸放出濃度の測定	20
(17) 放射線非照射移植の方法	21
(18) 統計学的解析	22
V 結果	23
(1) 骨髄の中では特有のアミノ酸微小環境が形成されている	23
(2) <i>in vitro</i> においてシステインとバリンは造血に重要なアミノ酸である	27
(3) バリンは造血幹細胞や免疫細胞の恒常性を調節する	37
(4) バリン欠乏は造血組織に対して強い障害を示す	50
(5) ニッチ構成細胞は骨髄内においてバリンを供給している	57
(6) バリン欠損食餌療法による前処置のみで造血幹細胞移植が成立する	59
VI 考察	65
VII 引用文献	72
VIII 表	81
IX 謝辞	92

I 略語

HSC hematopoietic stem cell

Sca-1 stem cell antigen-1

KSL c-Kit⁺, Sca-1⁺, Lineage⁻

SLAM signaling lymphocyte activation molecule

FACS fluorescence-activated cell sorting

CXCL C-X-C motif chemokine ligand

SCF stem cell factor

TPO thrombopoietin

Ang-1 angiopoietin-1

TGF- β transforming growth factor-beta

ROS reactive oxygen species

ATP adenosine triphosphate

HIF-1 hypoxia-inducible factor 1

TCA tricarboxylic acid

ES embryonic stem

iPS induced pluripotent stem

GVHD graft versus host disease

B6 C57BL/6

NOD/scid non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency

RPMI Roswell park memorial institute

DME/F12 Dulbecco's modified eagle's medium / Ham's Nutrient mixture F-12

HPLC high performance liquid chromatography

TOF-SIMS time-of-flight secondary ion mass spectrometry

CBC complete blood counts

CD cluster of differentiation

APC allophycocyanin

FITC fluorescein isothiocyanate

PE phycoerythrin

PB pacific blue

CMP common myeloid progenitor

GMP granulocyte monocyte progenitor

MEP megakaryocyte erythrocyte progenitor

CLP common lymphoid progenitor

Flt-3 fms-like tyrosine kinase 3

IgM immunoglobulin M

BSA bovine serum albumin

IL interleukin

EPO erythropoietin

NAC N-acetyl cysteine

DCF-DA 2',7'-dichlorofluorescein diacetate

RNA-Seq RNA sequence

FPKM fragments per kilobase of exon per million mapped reads

H-E hematoxylin-eosin

ALCAM activated leukocyte cell adhesion molecule

PDGFRa platelet derived growth factor receptor alpha

GO Gene Ontology

WBC white blood cell

RBC red blood cell

PLT platelet

DN double negative

DP double positive

LAT L-type amino acid transporter

GSH Glutathione-SH

PERK protein kinase R-like ER-localized eIF2a kinase

mTOR mammalian target of rapamycin

II 要旨

造血幹細胞は骨髄微小環境の中で未分化性を維持されており、解糖系や脂肪酸代謝の関与が報告されているがアミノ酸との関連はほとんど知られていない。まず私は骨髄内におけるアミノ酸濃度の不均一性を見出し、各アミノ酸と造血幹細胞の機能について解析を進めた。その結果、バリン欠損の培養条件下では造血幹細胞は速やかに未分化性を消失し、バリン欠損飼料を長期間マウスに与えることで生体内の造血幹細胞の減少が認められた。さらに、バリン欠損飼料をレシピエントマウスに与える事で放射線を行わず造血幹細胞移植が成立するという興味深い結果を得た。これらの知見はバリン濃度の制御が新しい造血幹細胞移植方法となる可能性を示唆している。

III 序文

造血幹細胞 (hematopoietic stem cell: HSC) は、すべての血球系細胞に分化可能な幹細胞である。その概念は 1960 年代初めに Till と McCulloch による脾コロニーアッセイによって初めて提唱された^{1,2}。この実験系では、骨髄細胞を致死的な放射線照射したマウスへ移植すると、8-12 日後に脾臓表面に様々な血球細胞が含まれた (多分化能)、肉眼で観察可能な脾コロニーが形成される。さらにこの脾コロニーを別のマウスに移植すると、再び脾コロニーが検出 (自己複製能) される。以上の結果から、HSC とは多分化能と自己複製能を持つ細胞であるという概念が確立された。その後、ヒトの骨髄移植法と同様に、骨髄細胞を致死的な放射線を照射したマウスへ移植して造血系を再構築するという競合的骨髄再構築法³や FACS (fluorescence-activated cell sorting) による細胞分離技術によって、HSC を頂点とする造血の階層性やそのメカニズムについて研究が進められてきた。私達の研究室ではこれらの方法を用いて、マウス骨髄の cluster of differentiation (CD) 34 陰性～弱陽性、c-Kit 陽性、stem cell antigen-1 (Sca-1) 陽性、分化抗原 (lineage) 陰性の CD34⁺KSL 分画中に HSC は高濃度に存在し、この細胞 1 個を致死的な放射線を照射したマウスへ移植すると 3 匹に 1 匹の割合で長期骨髄再構築が可能であることを報告した⁴。さらに別のグループからは、signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) ファミリーに属する膜タンパク受容体を指標とした CD150 陽性、CD41 陰性、CD48 陰性の分画においても同様に HSC が高度に濃縮されているという報告がなされ⁵、CD34⁺KSL と共に HSC 分画の特徴的な表面マーカーと

して広く用いられている。

HSC は骨髄ニッチと呼ばれる骨髄中の特別な微小環境において主に休眠状態（細胞周期の静止期: G0 期）で存在し、この中で時折、対称性または非対称性の細胞分裂を繰り返すことで一生涯にわたって血球細胞を供給していると考えられている。このニッチの概念は 1978 年に Schofield によって初めて提唱された⁶。その内容は、HSC が自己複製と必要に応じた分化・増殖をバランスよく行うことで血球細胞の種類や数を適切に保っており、この HSC の運命はニッチによって制御されているというものであった。つまり、HSC の分化・成熟の制御には骨髄ニッチとの相互作用が重要であり、最近 10 年間でさまざまなニッチ構成細胞やニッチ調節因子が報告されてきた。マウス骨髄ニッチを構成する細胞には、骨芽細胞^{7,8}、血管内皮細胞⁵、ネスチン陽性間葉系幹細胞⁹、C-X-C motif chemokine ligand (CXCL) 12-abundant reticular (CAR) 細胞¹⁰、非ミエリンシュワン細胞¹¹などが知られている。また、調節因子には stem cell factor (SCF)¹²、thrombopoietin (TPO)^{13,14}、angiopoietin 1 (Ang-1)¹⁵、CXCL-12^{16,17}、transforming growth factor (TGF)- β ¹⁸などのニッチ構成細胞から供給される分泌タンパク質や、カルシウムイオン¹⁹、酸素分子²⁰などのニッチ環境内に存在する分子が報告されている。しかし、骨髄ニッチを形成する因子と HSC の恒常性を維持する機構については不明な点が多く、未だ全貌が解明されるには至っていない。

HSC は骨髄ニッチにおいて主に静止期で維持され、約 1 か月に 1 回の頻度で細胞周期に入るが^{21,22}、静止期にある場合と活性化された場合でその代謝が大きく変わるこ

とが知られている。HSC は静止期において、細胞へのストレスになる活性酸素 (reactive oxygen species: ROS) の発生が少なくなるように骨髄内の低酸素環境下で存在し、主に解糖系を使って adenosine triphosphate (ATP) 産生を行っている。低酸素下では hypoxia-inducible factor (HIF)-1a の活性化が起こっており、この HIF-1 によって pyruvate dehydrogenase kinases (PDK) 2/4 が up-regulate されることで、ピルビン酸がミトコンドリア内の tricarboxylic acid (TCA) 回路に入るのを阻止している²³。また、低酸素環境下において HSC や血管内皮細胞から産生される cripto というタンパク質が、HSC 上の glucose-regulated protein (GRP) 78 と結合することで細胞内での代謝を解糖系の方向に制御している²⁴。それ以外にも、peroxisome proliferator-activated receptor δ (PPAR δ) が脂肪酸の β 酸化を誘導する経路によって、HSC の非対称分裂が誘導されてその数の維持に寄与するという報告もある²⁵。一方、分化・増殖を行っている活性化状態の HSC においては、多くの ATP や細胞増殖に必要な材料が必要となるために TCA 回路を使用している。その制御にはミトコンドリア内の protein tyrosine mitochondrial phosphatase (PTPMT) 1 が解糖系から TCA 回路、酸化リン酸化の方向へ向うのに必須の因子であるといわれている²⁶。

これまで HSC と骨髄ニッチの関連についてさまざまな分泌タンパク質や代謝経路が関与していることが示されてきたが、アミノ酸と造血についての報告は非常に少ない。アミノ酸とはタンパク質を構成する最小の単位で、ヒトの体を構成するアミノ酸は全部で 20 種類あることが知られている。このアミノ酸は生体内の恒常性を保つた

めに最も重要な因子の一つで、各細胞種によって必須のアミノ酸や分泌するアミノ酸が異なっている。HSC 以外の幹細胞では、マウス embryonic stem (ES) 細胞はトレオニン²⁷、ヒト ES 細胞や induced pluripotent stem (iPS) 細胞でメチオニン²⁸が未分化性の維持および分化に重要であることが報告されている。また、グリア細胞が L-セリンなどのアミノ酸を分泌することで、近傍の神経細胞の恒常性維持に機能していることが知られている^{29,30}。1946 年、Arthur Kornberg がラットに低タンパク質の食餌を与えることで顆粒球の著明な減少と貧血が出現し、精製したアミノ酸を投与することでそれらが改善することを報告した³¹。また、1949 年に Patt らはシスチンを放射線照射前にマウスへ投与することで、その後の放射線障害による白血球減少に対して効果があることを発表した³²。これらの知見は造血をアミノ酸によって調節できるという可能性を示唆している。1945 年に Elvehjem らはラットにおいてカゼイン食にコーングリッツを加えるとニコチン酸の欠乏が起こるという現象を報告し、アミノ酸の投与量の不均衡から生じる栄養障害をアミノ酸インバランスと命名した^{33,34}。その後、1958 年に Harper によってアミノ酸インバランスは、比較的少量の必須アミノ酸や組成の不均衡なタンパク質を飼料に加えることで引き起こされる成長障害・その他の有害事象で、少量のある特定のアミノ酸を加えることで予防できるようなものであると定義された³⁵。その後、このアミノ酸インバランスを悪性腫瘍の治療に応用する研究が進められ、低フェニルアラニン低チロシン食によって急性骨髄性白血病の患者が完全寛解に入ったという報告や³⁶、担癌ラットに対して特定のアミノ酸を欠乏させた中心静脈栄

養を行ったところ腫瘍増殖抑制効果が認められたという報告がなされている³⁷。そこで、私は特定のアミノ酸のバランスを変化させて骨髄におけるアミノ酸濃度環境を調節することで、その中に存在する HSC の自己複製能や多分化能に影響を与えられるのではないかと仮説を立てた。

造血幹細胞移植は 1957 年に Thomas 博士がヒトに対して行った骨髄移植が始まりであるとされ、主要組織適合遺伝子複合体の適合性、前処置、移植片対宿主病 (graft versus host disease: GVHD) 予防方法などにさまざまな改良が加えられ、造血系悪性腫瘍や免疫不全症などへの根治的治療法として確立されてきた³⁸。この造血幹細胞移植では骨髄ニッチの空きを確保することが HSC 生着に必要であるとされる。臨床において骨髄ニッチを空ける移植前処置として、一般的に放射線照射や大量抗がん剤の投与が行われている。この前処置によって急性期に肝臓、腎臓、心臓、肺、中枢神経など多くの主要な臓器に障害が出現する可能性があることから、移植治療の適応となる患者の数は限られてきた。また、移植後長期生存者における生活の質の低下、特に若年者においては二次性発癌や成長障害、内分泌障害などの晩期障害も問題になっている³⁹。

そこで、アミノ酸が造血環境や HSC に与える影響を解析し、骨髄内での HSC 維持機構について解明することを目的とした。さらに、アミノ酸環境を制御することが、従来の前処置に代わる新しい造血幹細胞移植方法として応用できるかを検討した。

IV 材料と方法

(1) マウス

C57BL/6 (B6-Ly5.2) マウスは日本 SLC、C57BL/6 (B6-Ly5.1) マウス及び NOD/scid (Ly5.1) マウスは三協ラボサービスより購入した。C57BL/6 (Ly5.1/Ly5.2 F₁) マウスも三協ラボサービスより購入し、競合的骨髄再構築能の評価に用いた。すべての実験は東京大学の動物実験実施規定に基づいて行われた。

(2) 培養液およびマウス人工飼料

Roswell park memorial institute (RPMI)-1640 R8758 培養液 (Sigma-Aldrich) と Dulbecco's modified eagle's medium / Ham's Nutrient mixture F-12 (DME/F12) D6421 培養液 (Sigma-Aldrich) の各培養液に含まれるアミノ酸をすべて欠損した培養液を Sigma-Aldrich へ特別に外注した。培養液は、アミノ酸を欠損した RPMI と DME/F12 を等量で混ぜ合わせ、24 種類のアミノ酸 (L-alanine, L-arginine • HCl, L-arginine, L-asparagine, L-asparagine • H₂O, L-aspartic acid, L-cystine • 2HCl, L-cysteine • HCl • H₂O, L-glutamic acid, L-glutamine, glycine, L-histidine • HCl • H₂O, L-histidine, trans-4-hydroxy-L-proline, L-isoleucine, L-leucine, L-lysine • HCl, L-methionine, L-phenylalanine, L-proline, L-serine, L-threonine, L-tryptophan, L-tyrosine • 2Na • 2H₂O, L-valine, 全て Sigma-Aldrich) をそれぞれ個別に単一のアミノ酸を欠損した成分となるように混ぜ合わせて作成した (表 1)。これらの培養液は S-clone SF-03 培養液 (三

光純薬) と一種類のアミノ酸を除いて同等の組成が含まれている。アミノ酸欠損飼料については、リサーチダイエット社に外注した (表 2)。

(3) アミノ酸濃度および分布の測定

マウスの眼底静脈叢より採取された末梢血から血清を分離した後、Amicon ultra-0.5 mL Ultracel-10K フィルター (Merck Millipore) を通してタンパク質除去を行った。骨髓液は大腿骨 1 本の両骨端を切除後に 100 μ L の水で溶出した後、末梢血と同様にタンパク質除去の処理を行った。各試料のアミノ酸濃度は Prominence Amino Acid Analysis System (島津製作所) を用いた高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography: HPLC) にて測定した。また、大腿骨の凍結切片を準備し、東レリサーチセンターにて飛行時間型二次イオン質量分析法 (time-of-flight secondary ion mass spectrometry: TOF-SIMS; ION-TOF) を用いてイオン化アミノ酸の分布について測定した。超高真空中においた試料表面に Bi³⁺イオンを照射して得られた質量スペクトルを解析することにより、試料表面 (数 mm 以内) に存在する有機物や無機物を同定することができ、そのピーク強度から存在量に関する知見を得ることができる。また 1 次イオンビームを 1 μ m 以下に収束させることにより、微小部の分析や高空間分解能でのイメージング測定 (分布観察) が可能である。

(4) 全血球計算 (complete blood counts: CBC)

マウスの眼底静脈叢よりヘパリン管で採取された末梢血を全自動血球計測機 MEK-6258 (日本光電工業) を用いて全血球計算を行った。

(5) マウス造血幹・前駆細胞の解析および純化方法

CD34⁻KSL 細胞と CD34⁺KSL 細胞は 8-12 週齢のマウスの骨髄より以下の方法で分離された。マウスの骨盤、大腿骨、脛骨から採取した骨髄細胞を抗 allophycocyanin (APC) c-Kit 抗体 (eBioscience) で染色した後、抗 APC 磁気ビーズ (Miltenyi Biotec) と LS カラム (Miltenyi Biotec) を用いて c-Kit 陽性細胞を分離した。これらの細胞をビオチン化 lineage 抗原抗体カクテル A (抗 Gr-1, Mac-1, B220/CD45R, CD4, CD8, CD127/IL7R α , Ter-119 ; 全て eBioscience) で反応後に抗 streptavidin-APC-eFluor 780 抗体(eBioscience)、抗 fluorescein isothiocyanate (FITC)-CD34 抗体 (eBioscience) 、抗 phycoerythrin (PE)-Sca-1 抗体 (eBioscience) で染色した。

もう一つの HSC の表面マーカーである CD150⁺CD41⁻CD48⁻KSL 細胞分画の解析は、人工飼料を一定期間与えたマウスから分離した骨髄をビオチン化 lineage-marker 抗体カクテル A で反応後に抗 APC-c-Kit 抗体、抗 FITC-CD41 抗体 (eBioscience) 、抗 Alexa Fluor 488-CD48 抗体 (BioLegend) 、抗 PE-CD150 抗体 (BioLegend) 、抗 Pacific blue(PB)-Sca-1 抗体 (BioLegend) 、抗 streptavidin-APC-eFluor 780 抗体で染色した。

造血前駆細胞 (common myeloid progenitor: CMP, granulocyte monocyte progenitor: GMP,

megakaryocyte-erythrocyte progenitor: MEP) 分画の解析には、人工飼料を一定期間与えたマウスから採取した骨髄をビオチン化 lineage 抗原抗体カクテル A で反応後に、抗 APC-c-Kit 抗体、抗 FITC-CD34 抗体、抗 PE-CD16/32 抗体 (eBioscience) 、抗 PB-Sca-1 抗体、抗 streptavidin-APC-eFluor 780 抗体で染色した。

リンパ系前駆細胞 (common lymphoid progenitor: CLP) の解析には、人工飼料を一定期間与えたマウスから採取した骨髄をビオチン化 lineage 抗原抗体カクテル B (抗 Gr-1, Mac-1, B220/45R, CD4, CD8, Ter-119, CD3e (eBioscience), CD5 抗体 (BioLegend)) で反応後に、抗 APC-c-Kit 抗体、抗 FITC- CD127/IL7R α 抗体 (eBioscience) 、抗 PE-CD135/fms-like tyrosine kinase 3 (Flt3) 抗体 (eBioscience) 、抗 PE/Cy7-Sca-1 抗体 (eBioscience) 、抗 streptavidin-APC-eFluor 780 抗体で染色した。

CD34⁺KSL 及び CD34⁺KSL 細胞の解析と細胞分離は Summit software を使用した MoFlo flow cytometer (Beckman Coulter) で行った。CD150⁺CD41⁻CD48⁻KSL 細胞と前駆細胞の解析には FACS Aria-2 flow cytometry (BD Biosciences) を使用した。結果の解析は FlowJo software (Tree Star) を用いて行った。

(6) 末梢血、骨髄の血球分化細胞解析

ヘパリン化採血管で採取された末梢血は、溶血バッファー (NH₄Cl 150 mM) で溶血後に、抗 FITC-CD45 (BD Biosciences) 抗体 、抗 APC-CD3e 抗体 (Tonbo Science) 、抗 APC-eFluor 780 抗体、抗 APC/Cy7-B220/CD45R 抗体 (eBioscience) 、抗 PE-Gr-1 抗体

(eBioscience) 、抗 PE-Mac-1 抗体 (BD Biosciences) で染色した。また、骨髄細胞は抗 FITC-CD45 抗体、抗 PE-CD3e 抗体 (BD Biosciences) 、抗 APC-eFluor 780-B220/CD45R 抗体、抗 APC-Gr-1 抗体 (BioLegend) 、抗 PE/Cy7-Mac-1 抗体 (eBioscience) で染色して、FACS Aria2 flow cytometry で解析を行った。末梢血の分化細胞の数は、血算の白血球数と各細胞分画の割合の乗算によって算出し、骨髄の分化細胞の数は片側の大腿骨と脛骨に含まれる総骨髄数と各細胞分画の割合の乗算によって算出した。

(7) 骨髄の B 細胞、胸腺の T 細胞解析

人工飼料を一定期間与えた B6 マウスから採取した骨髄細胞は、抗 PE/Cy7-B220 抗体 (BioLegend) 、抗 APC/Cy7- immunoglobulin M (IgM) 抗体 (BioLegend) 、抗 PE-CD24 抗体 (eBioscience) 、抗 APC-CD25 抗体 (BD Biosciences) で染色した。胸腺細胞は溶血バッファーで溶血後に、ビオチン化 lineage 抗原抗体カクテル C (抗 Gr-1, Mac-1, B220/CD45R, Ter-119, CD19 (eBioscience) 、CD11c 抗体 (BD Biosciences)) で反応後に、抗 PB-CD4 抗体 (BioLegend) 、抗 Violet500-CD8a 抗体 (BD Biosciences) 、抗 streptavidin-PE/Cy7 抗体 (eBioscience) で染色した。細胞の解析には FACS Canto II flow cytometry (BD Biosciences) を使用した。

(8) CD34⁻KSL 細胞と CD34⁺KSL 細胞の培養

マウスから CD34⁻KSL 細胞と CD34⁺KSL 細胞を 40 個ずつ 96 穴プレートに分離し、

S-clone SF-03 培養液と自作培養液それぞれに、1 % bovine serum albumin (BSA) とマウス SCF (50 ng/mL; PeproTech) 、 TPO (50 ng/mL; PeproTech) 、 Interleukin (IL) -3 (CD34⁺KSL 細胞のみ、20 ng/mL; PeproTech) を加えて、無血清培養を行った。細胞は 5% CO₂、37°C のインキュベータで培養した。培養した細胞の数は CYTORECON cytometer (GE Healthcare) を用いて計測した。

(9) シングルセルコロニーアッセイ

マウスから CD34⁺KSL 細胞を 1 個ずつ 96 穴プレートに分離し、S-clone SF-03 培養液と自作培養液それぞれに、1 % BSA とマウス SCF (50 ng/mL) 、 TPO (50 ng/mL) 、 IL-3 (20 ng/mL) 、 Erythropoietin(EPO) (2U/mL; PeproTech) を加えて無血清培養を行った。細胞は 5% CO₂、37°C のインキュベータで培養した。10 日間培養後にコロニー数が 50 個を超えているウェルの細胞についてサイトスピンでスライドガラスにマウントした後、Hemacolor (MERCK) にて染色して光学顕微鏡で血球の形態を評価した。

(10) ROS 活性の測定

3000 個の KSL 細胞を B6 マウスより分離し、complete、システイン欠損 (-Cys) 、バリン欠損 (-Val) 培養液に 1 % BSA と SCF (50 ng/mL) 、 TPO (50 ng/mL) 、 IL-3 (20 ng/mL) を加えて 5% CO₂、37°C のインキュベータで 24 時間培養した。-Cys 培養液では同様の条件にさらに 2mM の N-acetyl cysteine (NAC; Sigma-Aldrich) を加えた培養

も行った。培養細胞は $10\mu\text{M}$ の 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) (Sigma-Aldrich) で 30 分培養した後、酸化活性について FACS Aria-2 flow cytometry で解析した。

(11) N-acetyl cysteine 救援試験

40 個の CD34⁺KSL 細胞を B6 マウスより分離し、complete、-Cys、-Val 培養液に 1 % BSA と SCF (50 ng/mL)、TPO (50 ng/mL) を加え、さらに NAC を最終濃度で $0\mu\text{M}$ (添加なし)、 $10\mu\text{M}$ 、 $100\mu\text{M}$ 、 2mM になるように加えて 5% CO_2 、 37°C のインキュベータで 1 週間培養した。細胞数は、CYTORECON cytometer または光学顕微鏡下で目視により計測した。

(12) 競合的骨髄再構築法

競合的骨髄再構築法は Ly5 コンジェニックマウス系で行った。B6-Ly5.1 マウスから採取した 1×10^6 個の骨髄 (または 1 週間培養した CD34⁺KSL 細胞) を B6-F1-Ly5.1/Ly5.2 マウス 1×10^6 個の骨髄とともに 9.5Gy の致死放射線を照射した B6-Ly5.2 マウスへ経静脈的に移植した。移植後は 1 か月毎にレシピエントのマウスの末梢血を採取して溶血バッファで溶血後、抗 PE/Cy7-Ly5.1 抗体 (Tonbo Science) 及び抗 FITC-Ly5.2 抗体 (BioLegend) で染色した。さらに、細胞を抗 PE-Mac-1 抗体、抗 PE-Gr-1 抗体、抗 APC-CD4 抗体、抗 APC-CD8a 抗体 (全て eBioscience) と抗 APC-eFluor

780-B220/CD45R 抗体で染色した。解析は、FACS Canto II flow cytometry で行い、%
キメリズムは $(\% \text{ Ly5.1 cells}) \times 100 / (\% \text{ Ly5.1 cells} + \% \text{ F1 cells})$ で算出した。

(13)細胞周期解析

骨髄細胞はビオチン化 lineage 抗原抗体カクテル A で反応後、抗 FITC-CD34 抗体、抗 APC-c-Kit 抗体、抗 PB-Sca-1 抗体、抗 streptavidin-APC-eFluor 780 抗体で染色した。その後 0.5 μ g/mL Pyronin Y (Sigma-Aldrich) を加えて、5% CO₂, 37°C のインキュベータで 20 分間培養して、FACS Aria-2 flow cytometry で解析した。

(14)RNA 抽出及び RNA sequence (RNA-Seq)

10000 個の CD34⁺KSL 細胞を 9 週齢の B6 マウスから分離して、complete、-Cys、-Val 培養液に 1% BSA と SCF (50 ng/mL) 、TPO (50 ng/mL) を加えて 24 時間培養した。培養細胞の全 RNA は RNeasy mini kit (Qiagen) を用いて抽出した。その後の実験は理化学研究所統合生命医科学研究センターにて行われた。5 ng の RNA から NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB Biolabs) を用いて、製造者のプロトコール通りに RNA-Seq cDNA ライブラリーを作成した。SE-50 sequencing (single-ended 50 base-pair reads) のために HiSeq 1500 system (Illumina) を使用した。Sequence 断片は Bowtie2 (version 2.1.0 <http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/>) プログラムを利用して TopHat2 (version 2.1.0, <https://ccb.jhu.edu/software/tophat/>) を使用してマウスゲノム上 (NCBI

version 37, mm9) にマッピングした。Fragments per kilobase of exon per million mapped reads (FPKM) の算出と遺伝子発現の評価には Cufflinks software package (version 2.1.1, <http://cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/>) を用いた。Ontology 解析はマウス遺伝子の Gene Ontology (<http://geneontology.org/>) annotation database で行った。生の transcriptomic 解析データは NCBI GEO database (accession number GSE70307) で利用可能である。

(15) 病理組織解析

人工飼料を特定の期間与えたマウスの臓器は 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定した後、東京大学医科学研究所の病理部にてパラフィンで包埋し、切片をスライドグラスにマウントして hematoxylin-eosin (H-E) 染色を行った。

(16) 骨髄ニッチ構成細胞のアミノ酸放出濃度の測定

神経細胞は実体顕微鏡 (Leica, Microsystems) 下で鉗子を用いて坐骨神経より分離した。骨髄の非血球系細胞の採取では、大腿骨、脛骨、骨盤の骨を砕いた後 0.1% トリプシン (Sigma-Aldrich) で処理した細胞を用いた。骨髄細胞は抗 FITC-CD45 抗体、抗 PE- Ter-119 抗体 (eBioscience) 、抗 Alexa674- activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) 抗体 (R&D System) 、抗 PE-CD31 抗体 (eBioscience) で染色した。血管内皮細胞 (CD31⁺CD45⁻Ter-119⁻) 、骨芽細胞 (ALCAM⁺Ter119⁻CD45⁻CD31⁻) 、 platelet derived growth factor receptor alpha (PDGFRα) 陽性細胞 (CD140a⁺ Ter119⁻ CD45⁻) はそ

それぞれの表面抗原に基づいて、FACS Aria 2 flow cytometry によってそれぞれ 10000 個ずつ分離した。坐骨神経と血管内皮細胞、骨芽細胞、PDGFR α 陽性細胞はアミノ酸の入っていない培養液において、5% CO₂、37°C のインキュベータで 3 日間培養した。培養液の上清を Amicon ultra-0.5mL Ultracel- 10K フィルターを通してタンパク質除去の処理を行った後に HPLC によってアミノ酸濃度を測定した。

(17)放射線非照射移植の方法

自家移植では 2 日間絶食したレシピエントマウス (B6-Ly5.2) に complete または -Val 飼料を 3 週間与えた後に、通常の飼料を与えたドナーマウス (B6-Ly 5.1) の骨髄 1×10^7 個を経静脈的に移植した。それと同時に -Val 飼料を与えていた群は complete 飼料に変更した。

同種移植では 2 日間絶食したレシピエントマウス (NOD/scid-Ly5.1) に complete または -Val 飼料を 2 週間与えた後に、通常の飼料を与えたドナーマウス (B6-Ly 5.2) の骨髄から単離した KSL 細胞 5000 個を経静脈的に移植した。それと同時に -Val 飼料を与えていた群は complete 飼料に変更した。移植後 12 週にわたってレシピエントマウスから採血をして、競合的骨髄再構築法の項と同様の方法でドナーのキメリズムについて評価した。

(18) 統計学的解析

データは平均値 (±標準偏差) で示し、2 群間の比較は two-tailed Student t 検定を行った。3 群間以上の比較には、one-way-ANOVA 後に Dunnett 法を用いて解析した。統計学的有意差は* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ で示した。

V 結果

(1) 骨髄の中では特有のアミノ酸微小環境が形成されている

血液細胞は骨髄に存在する HSC から分化、成熟して末梢血中へ供給されている。

HSC の存在する骨髄と成熟細胞が主に存在する末梢血におけるアミノ酸環境が異なっているかを調べるため、まずは骨髄液と血清中に含まれる遊離アミノ酸の濃度を、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって比較した。血清における遊離アミノ酸濃度と比較して骨髄中に含まれるアミノ酸の量は 100 倍以上多く、また構成される各アミノ酸の割合も異なっていた (図 1)。この測定系では、システインが容易にシスチンに酸化されてしまうことや、これらのアミノ酸自体が加水分解の条件下では不安定であること、生体内における含有量が非常に少ないことから、システインおよびシスチンは検出することができなかった。次に骨髄において個々のアミノ酸がどのように分布しているのかを調べるために、マウス大腿骨の凍結切片を作成して、飛行時間型二次イオン質量分析法 (TOF-SIMS) によってイオン化アミノ酸の分布を解析した。多くのアミノ酸が均一に分布する中、 $C_4H_{10}N^+$ は大腿骨の特定の部位に高濃度で局在していた (図 2)。 $C_4H_{10}N^+$ のイオン種に該当するアミノ酸はバリンである。この実験系の性質上、リン脂質や他のアミノ酸断片などが含まれている可能性も考えられるが、バリンは動脈、毛細血管などのニッチ構成細胞として報告¹²のある血管の平滑筋に多く含まれることから⁴⁰、バリンの特異的な分布は骨髄中で HSC を維持することに関係している可能性が示唆された。これらの結果から、骨髄では末梢血と違ったバラン

スのアミノ酸環境が形成されていることが確認された。

図 1. 血清及び骨髄中のアミノ酸濃度

(A、B) 血清と骨髄液を B6 マウスより分離し、HPLC にてその濃度を測定した。(n=3)
結果は平均値±標準偏差で示している。

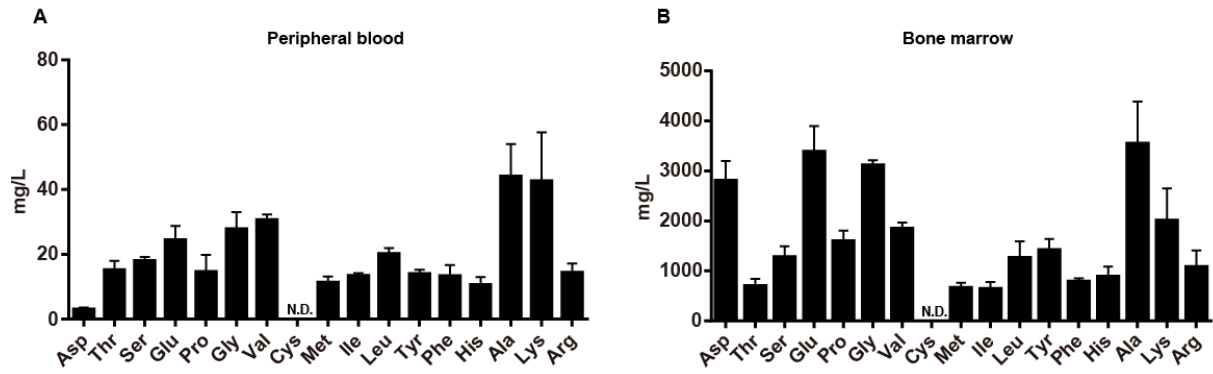
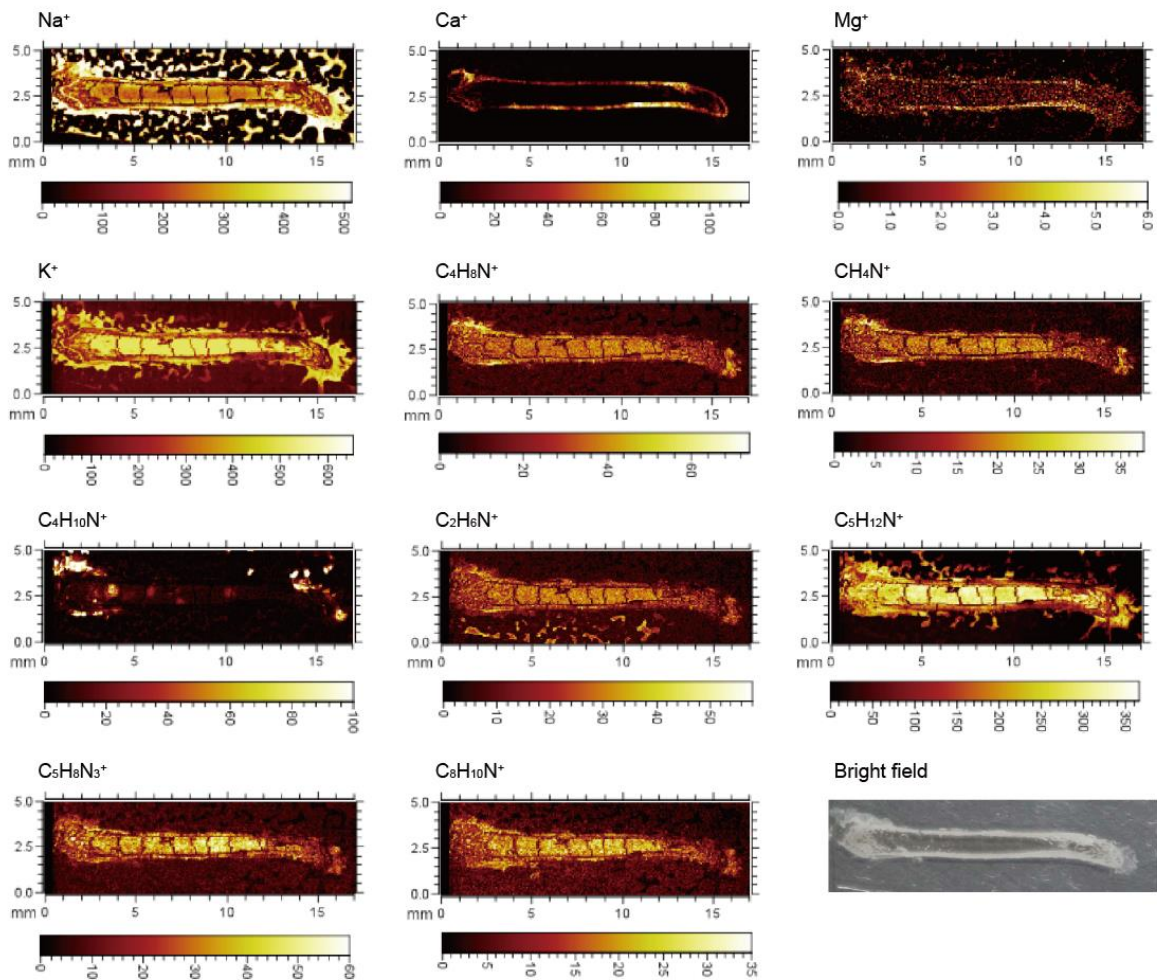


図2. マウス大腿骨におけるアミノ酸の分布

B6 マウスの大腿骨凍結切片を作成し、TOF-SIMSにて標本上のアミノ酸分布を測定した。各ビーム照射部位の質量スペクトラムデータをマッピングして各イオンの相対的な分布画像を作成した。

ラスタサイズ:17 x 5 mm、ピクセル数 1辺) :277 x 80 pixel 質量範囲 (m/z):0 - 1500



(2) *in vitro* においてシステインとバリンは造血に重要なアミノ酸である

骨髄中では特有の「アミノ酸環境」を形成していたが、その中で維持されている HSC においてアミノ酸がどのように関係しているのかについて検討した。まずは、*in vitro* における HSC に必須のアミノ酸を調べるための予備実験として、アミノ酸をすべて欠損した培養液に 20 種類のアミノ酸を S-clone SF-03 と同様の組成で加えた complete 培養液を作成した (表 1)。S-clone SF-03 は HSC を培養する時に私達の研究室で使用している培養液であり、complete 培養液が遜色なく使用できるかを検討した。マウスから HSC 分画である CD34⁺KSL 細胞を 40 個ずつ分離し、SCF と TPO で 1 週間それぞれの培養液で培養した後、致死的な放射線を照射したマウスへ競合細胞とともに移植した。長期再構築能の評価をするために、4 週間毎に末梢血を採取してドナー細胞のキメリズムと骨髄系、B、T リンパ系細胞の 3 系統が出現しているかについて調べた。移植後 12 週間まで解析したところ、2 つの培養液で培養された HSC 由来の細胞の末梢血におけるキメリズムには差がないことが確認された (図 3)。そこで、この complete 培養液をコントロールとして 20 種類あるアミノ酸のうち 1 種類を抜いた培養液を作製した (表 1)。これらの培養液に先ほどと同様に CD34⁺KSL 細胞を 40 個ずつ分離後、SCF と TPO で 1 週間培養し、細胞の増殖能を評価した。非常に興味深いことにシステイン欠損 (-Cys) 培養液およびバリン欠損 (-Val) 培養液において有意に増殖は阻害された (図 4, 5A, B)。同様の解析を造血前駆細胞である CD34⁺KSL 細胞で行ったところ、-Cys 培養液とリジン欠損培養液において特に増殖が抑制された

が、-Val 培養液では HSC の時の様な著明な増殖抑制を認めなかった (図 5C)。

システインとバリン欠損によるこれらの HSC の表現型は酸化ストレスと関連しているのではないかと考え、まずは造血幹・前駆細胞分画である KSL 細胞を SCF、TPO、IL-3 の存在下で 24 時間培養して ROS 活性を測定した。すると、-Cys 培養液で培養された細胞では ROS の活性が高値であったが、-Val 培養液の細胞は complete 群と有意な差を認めなかった (図 6A, B)。そこで、-Cys 培養液に抗酸化物質である NAC を加えて同様に 24 時間培養したところ、ROS の活性は著明に抑制された (図 6C, D)。次に HSC への影響について検討するために、培養液に NAC を加えて CD34⁺KSL 細胞を培養したところ、2mM の NAC 存在下の -Cys 培養液において細胞の増殖抑制は救援されたが、バリンにおいては救援できなかった (図 6E)。このことはバリンにおける増殖抑制のメカニズムは ROS による酸化ストレスと別の原因であることを示している。

次に、*in vitro* における HSC の分化能を調べるために、シングルセルコロニーアッセイを行った。各アミノ酸を欠損した培養液に CD34⁺KSL 細胞を 1 個ずつ単離し、SCF、TPO、IL-3、EPO を加えて 10 日間培養し、コロニー形成した細胞の形態を評価した。-Cys と -Val 培養液で培養した HSC は解析に十分なコロニーを形成しなかったため、それ以外の培養液で HSC の分化を評価したところ、すべての培養液において約 20-30% で混合コロニー (nmEM) の形成を認めたが、培養液間で明らかな分化の偏りなどは認めなかった (図 7)。

HSC の分化、増殖ではシステインとバリンを除いて著明な差が認められなかったが、

in vitro で培養した HSC がその機能を維持しているのかを調べるために競合的骨髄再構築試験を行った。増殖能試験と同様に CD34⁺KSL 細胞 40 個を各培養液で 1 週間培養した細胞を、競合細胞とともに致死的な放射線を照射したレシピエントマウスへ移植して、12 週間にわたって末梢血中のドナー細胞キメリズムで評価した。予想通り、-Cys と -Val 培養液で培養した HSC は移植後 12 週の時点において生着しなかったが、それ以外では骨髄系、B リンパ系、T リンパ系の 3 系統の細胞の生着を認めた (図 8)。

システインおよびバリンがどのように HSC を生存・維持させるのか、その分子メカニズムを調べるために、遺伝子発現プロファイルの比較を行った。10000 個の CD34⁺KSL 細胞を -Val、-Cys、complete 培養液で 24 時間培養後に RNA を抽出し、RNA シークエンス (RNA-Seq) にて解析を行った。-Cys、-Val 条件において 4 倍以上の発現量変化をした遺伝子セットを調べたところ、mitosis、cell cycle、cell division、DNA replication の 4 つの GO (Gene Ontology) term で変動を認めた (表 3,4)。また、 p -value < 0.01、2 倍以上の遺伝子発現変化を示した遺伝子についても調べた (表 5,6)。これら二つの結果から、-Cys、-Val 条件では特に細胞周期に関連した遺伝子群に影響があり、cell cycle、mitosis、cell division、DNA replication の遺伝子セットの発現が低下していることが判明した (図 9)。このことから、HSC が分裂する過程にこれらのアミノ酸代謝が関わっていることが示唆された。

図 3. S-clone SF-03 と complete 培養液で HSC を培養した時の長期再構築能
 (A、B) B6 (Ly5.1) マウスから分離した 40 個の CD34⁺KSL 細胞を SCF と TPO で 1 週間培養して、B6 (Ly5.1/Ly5.2) マウスの骨髄とともに致死的放射線を照射した B6 (Ly5.2) マウスへ経静脈的に移植した。移植後 12 週間まで 4 週間毎にドナーキメラリズム (A) および骨髄系、B、T リンパ系細胞の割合 (B) を算出した。(s-clone 群 n=9 ; complete 群 n=8)
 結果は平均値±標準偏差で示している。

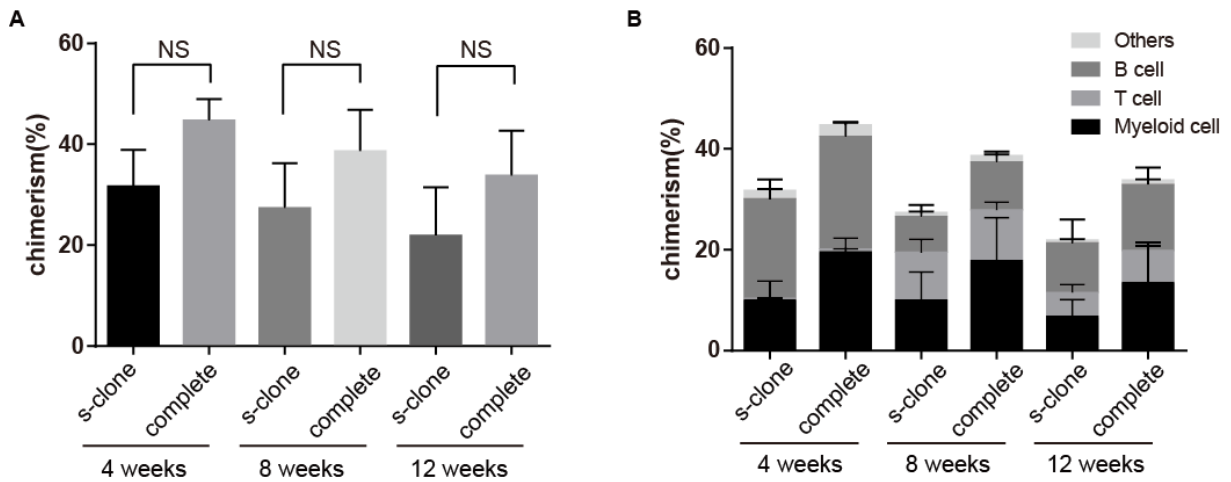


図 4. HSC の増殖能試験

40 個の CD34⁺KSL 細胞を B6 マウスより FACS にて分離し、各培養液で SCF と TPO の存在下で 1 週間無血清培養した。その後、1 ウェル毎の細胞数を計測した。

実験は triplicate で行い、結果は平均値±標準偏差で示している。

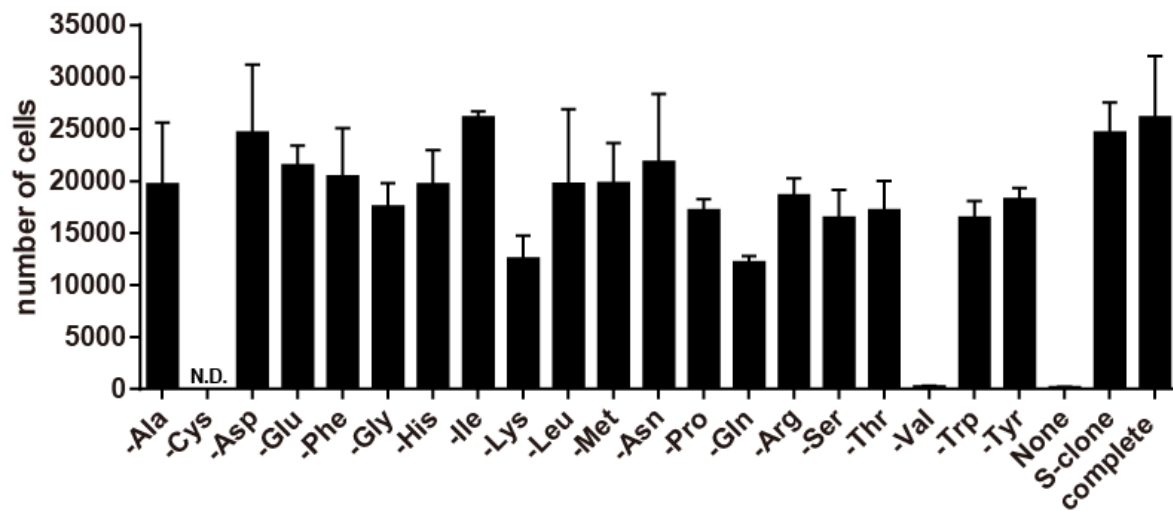


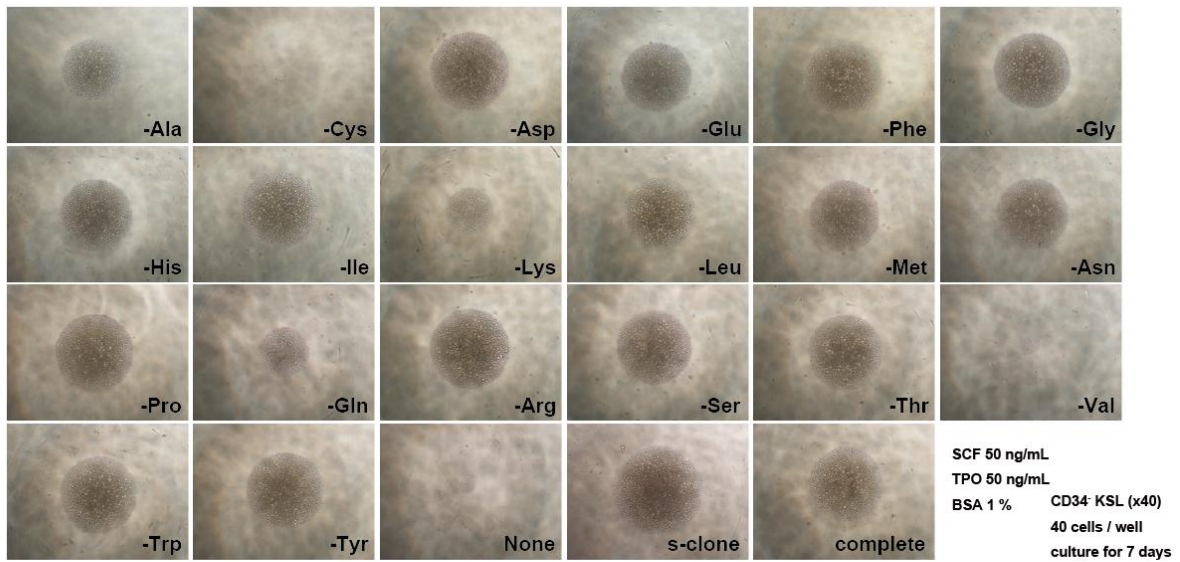
図 5. 造血幹、前駆細胞のアミノ酸欠損培養液における増殖能

(A) 40 個の CD34⁺KSL 細胞を SCF と TPO 存在下で 1 週間培養したウェルの写真

(B) 40 個の CD34⁺KSL 細胞を、-Cys、-Val、アミノ酸完全欠損 (None) 培養液で 1 週間培養したウェルの高倍率写真

(C) 40 個の CD34⁺KSL 細胞を SCF、TPO、IL-3 存在下で 1 週間培養したウェルの写真

A



B



C

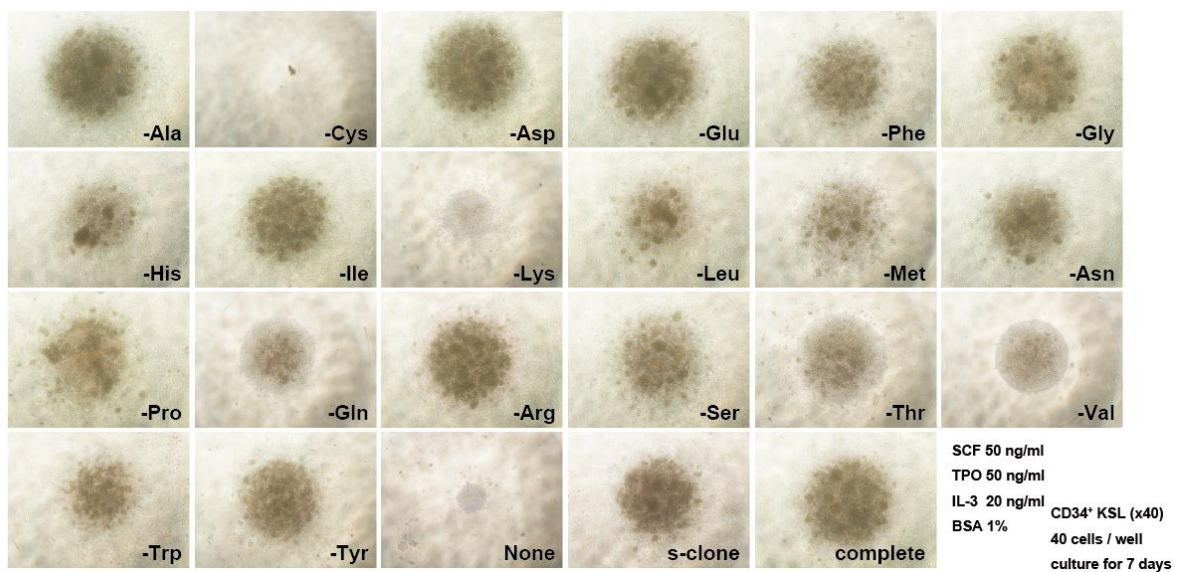


図 6. complete、-Cys、-Val 培養液で培養した造血幹・前駆細胞の ROS 活性および NAC による救援効果

(A、B) 3000 個の KSL 細胞を B6 マウスより分離し、SCF、TPO、IL-3 存在下で 24 時間培養した。ROS 活性は、培養細胞を DCF-DA でラベルした後、FACS で計測した。(各群 n=6) 結果は平均値±標準偏差で示している。complete 培養液と他の培養液との比較は、one-way-ANOVA 後に Dunnett 法を用いて評価した。***P<0.001

(C、D) 3000 個の KSL 細胞を B6 マウスより分離し、SCF、TPO、IL-3 存在下で 2mM の NAC を加えたまたは加えていない条件で 24 時間培養した。ROS 活性は培養細胞を DCF-DA でラベルした後、FACS で計測した。(各群 n=6)

結果は平均値±標準偏差で示している。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

(E) 40 個の CD34⁺KSL 細胞を B6 マウスより分離し、SCF と TPO 存在下で NAC を様々な条件 (0, 10μM, 100μM, 2mM) のもと 1 週間培養した。その後、1 ウェル毎の細胞数を計測した。実験は triplicate で行い、結果は平均値±標準偏差で示している。

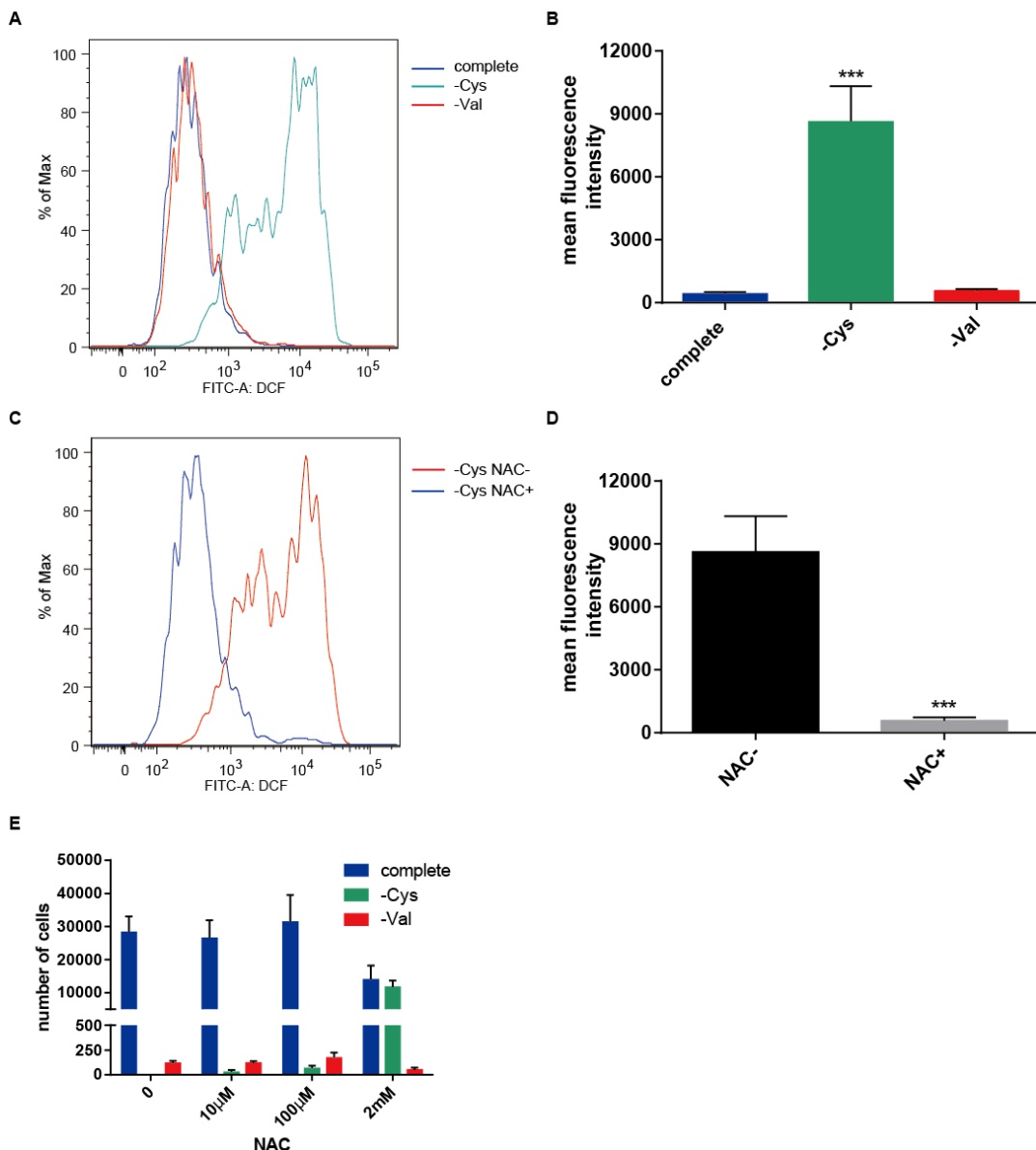


図 7. HSC の in vitro アミノ酸欠損条件における分化能

CD34⁺KSL 細胞を 96 ウェルプレートに 1 個ずつ分離し、SCF、TPO、IL-3、EPO 存在下、アミノ酸欠損培養液で 10 日間培養した。培養液毎に 48 個の細胞で解析を行った。100 個以上の細胞数を形成したウェルについて、サイトスピンでスライドガラスにマウントした後、血球の形態を neutrophil (n) / macrophage (m) / erythroblast (E) / megakaryocyte (M) で評価した。

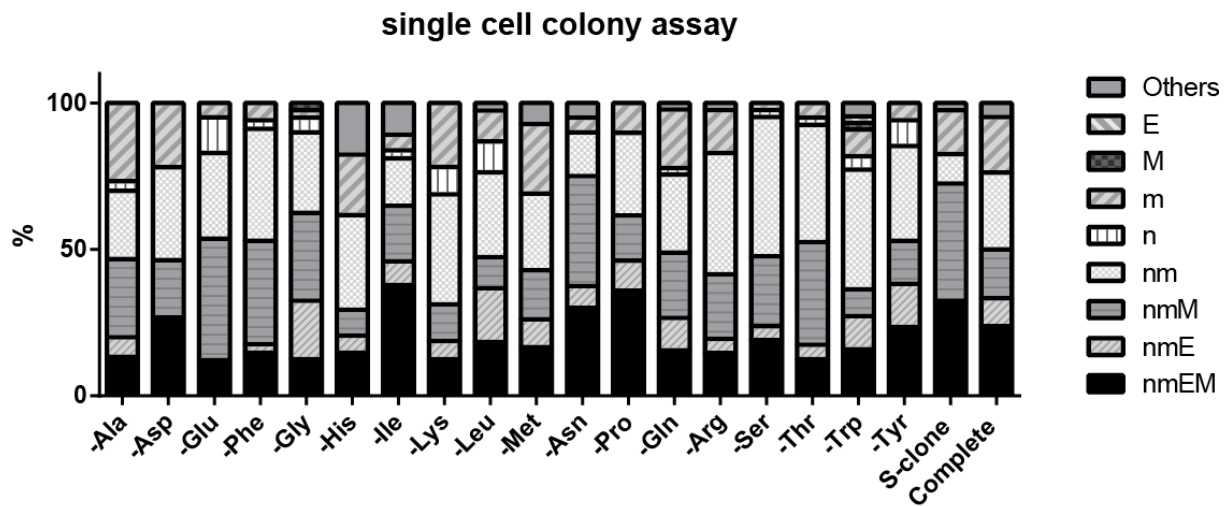


図 8. 各アミノ酸欠損条件で培養後の HSC の長期再構築能

B6 (Ly5.1) マウスから 40 個の CD34⁺KSL 細胞分離して 1 週間培養し、B6 (Ly5.1/Ly5.2) マウスの骨髄とともに致死放射線を照射した B6 (Ly5.2) マウスへ経静脈的に移植した。移植後 12 週間の時点のドナーキメラリズムの割合を算出した。(各群 n=3) 結果は平均値±標準偏差で示している。

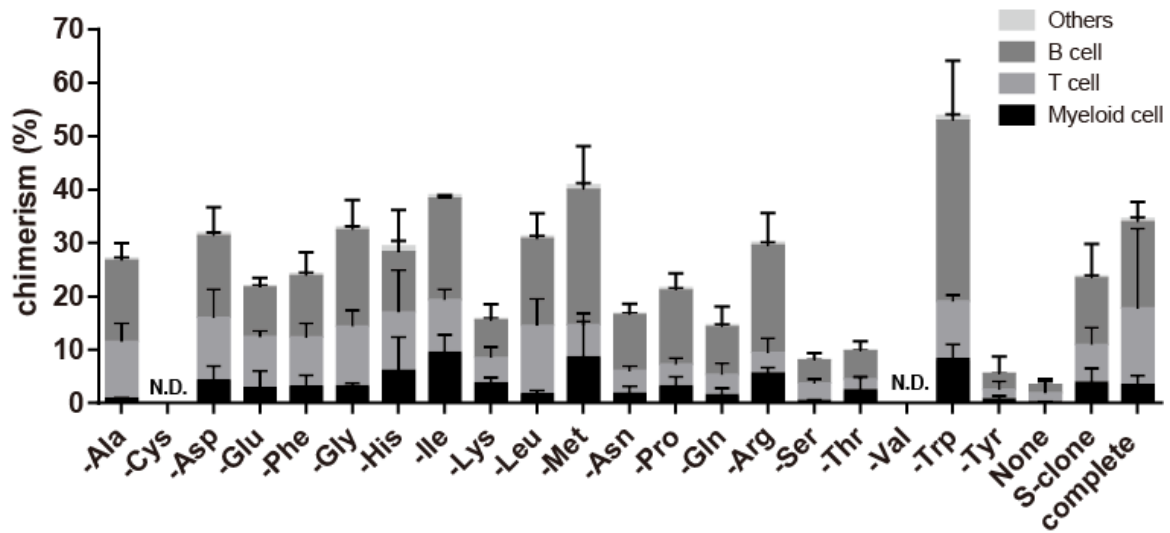
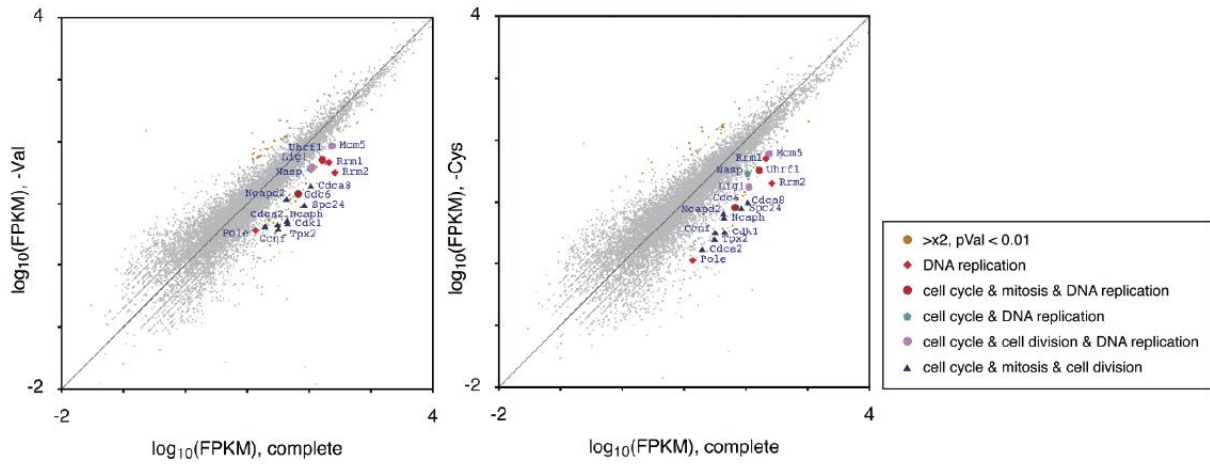


図 9. -Cys、-Val 培養液で培養した HSC の遺伝子発現比較 (散布図)

CD34⁺KSL 細胞を B6 マウスより分離し、complete、-Cys、-Val 培養液で SCF、TPO の存在下、24 時間培養した。培養した細胞から RNA を抽出して RNA-seq による遺伝子プロファイルの比較を行った。



(3) バリンは造血幹細胞や免疫細胞の恒常性を調節する

システインとバリンが実際に *in vivo* においても HSC の維持に影響を与えているのかを調べるために、アミノ酸を含めたすべての成分を人工的に合成した complete 飼料、バリン欠損 (-Val) 飼料、シスチン欠損 (-Cys) 飼料を外注した (表 2)。まず初めに人工飼料を 4 週間マウスに与えて、血算および HSC 分画の割合について測定した。末梢血中の白血球数は、complete 群が $5,790 \pm 1,300 /\mu\text{L}$ 、-Cys 群が $5,790 \pm 730 /\mu\text{L}$ 、-Val 群が $1,490 \pm 510 /\mu\text{L}$ であり (図 10)、CD34⁺KSL 細胞の割合は、complete 群が $0.00786 \% \pm 0.0029 \%$ 、-Cys 群が $0.0097 \% \pm 0.0025 \%$ 、-Val 群が $0.00134 \% \pm 0.0014 \%$ であった (図 11)。-Val 群において白血球数の減少と HSC の割合の著明な低下を認めただものの、それ以外の二つの群で違いはなかった。システイン (シスチン) はマウスにとって非必須アミノ酸であり体内で代償されてしまうことから⁴¹、-Cys 群で造血系への影響が出なかったものと考えられた。また、他の必須アミノ酸が *in vivo* において造血に与える影響を調べるために、必須・準必須アミノ酸欠損飼料 (表 2) を 2 週間与えたマウスの血算を測定したところ、ほぼすべての必須アミノ酸において白血球数は減少していたが、特にバリンでその数は著しく減少していた (図 12)。以降は、-Val 飼料を用いた *in vivo* における解析を進めることとした。

in vivo における血液細胞への影響を検討する前に、-Val 飼料によって骨髄および末梢血のバリン濃度が低下しているかを調べるために、4 週間-VAl 飼料を与えたマウスにおける血清および骨髄中のアミノ酸濃度を HPLC で測定した。バリン濃度は血清で

complete 群 30.8 ± 3.8 mg/dL; -Val 群 3.98 ± 0.63 mg/dL、骨髄で complete 群 $1,716 \pm 480$ mg/dL; -Val 群 478 ± 150 mg/dL と有意にその濃度が低下していることが確認された (図 13)。まず初めに、飼料を開始後の血球細胞への影響について経時的に解析を行った。血算において、白血球数は -Val 飼料開始 1 週間目からすでに減少し、赤血球数も徐々に減少したが、血小板数は観察期間中の減少を認めなかった (図 14)。末梢血中では、B220 陽性細胞および CD3 陽性細胞の数が徐々に減少していた。骨髄では B220 陽性細胞の数は減少していたが、末梢血と異なり CD3 陽性細胞の数は増加していた (図 15)。次に CD34⁺KSL と別の HSC 分画である CD150⁺CD41⁻CD48⁻KSL 細胞の割合について調べたところ、complete 群 $0.007\% \pm 0.0016\%$; -Val 群 $0.00208\% \pm 0.00032\%$ と劇的に低下していた (図 16)。CD34⁺KSL 細胞分画における細胞周期の解析では、*in vitro* の結果から予想された通り、G0 期の細胞の割合は complete 群と違いがなかった (図 17)。造血前駆細胞⁴² への影響について調べたところ、CMP の割合が低下していたが、GMP と MEP の割合には差を認めなかった (図 18)。

in vivo における骨髄中のバリン環境変化によって HSC 分画に含まれる細胞数は著明に減少していたが、表面抗原パターンが変わっている可能性なども考えられたことから、HSC の機能を調べるために競合的骨髄再構築法を行った。テスト細胞には -Val 飼料で 4 週間飼育した B6 マウス (Ly5.1) の骨髄細胞、競合細胞には complete 飼料で飼育した B6 マウス (Ly5.2) の骨髄細胞をそれぞれ同数ずつ用いて、致死的な放射線を照射した B6 マウス (Ly5.1/Ly5.2) へ移植した。移植後のドナー細胞キメリズムは、

1 か月目 complete 群 $48.6 \% \pm 3.3 \%$; -Val 群 $43.2 \% \pm 12 \%$ 、2 か月目 complete 群 $60.2 \% \pm 6.8 \%$, -Val 群 $56.7 \% \pm 14 \%$ とほとんど変わらなかったが、3 か月目になると complete 群 $63.4 \% \pm 6.6 \%$, -Val 群 $8.28 \% \pm 13 \%$ と -Val 群で劇的に低下した (図 19) 。

移植 1、2 か月までの期間の末梢血のキメリズムは主に前駆細胞が中心になっていると考えられることから、バリン欠乏の影響は前駆細胞よりもむしろ長期再構築能を持つ HSC に対して大きいことが示唆された。

図 10. 人工飼料で4週間飼育した B6 マウス末梢血の CBC (各群 n=3)
結果は平均値±標準偏差で示している。complete 群と他の飼料群との比較は、
one-way-ANOVA 後に Dunnett 法を用いて評価した。**P<0.01
(white blood cell: WBC, red blood cell: RBC, platelet: PLT)

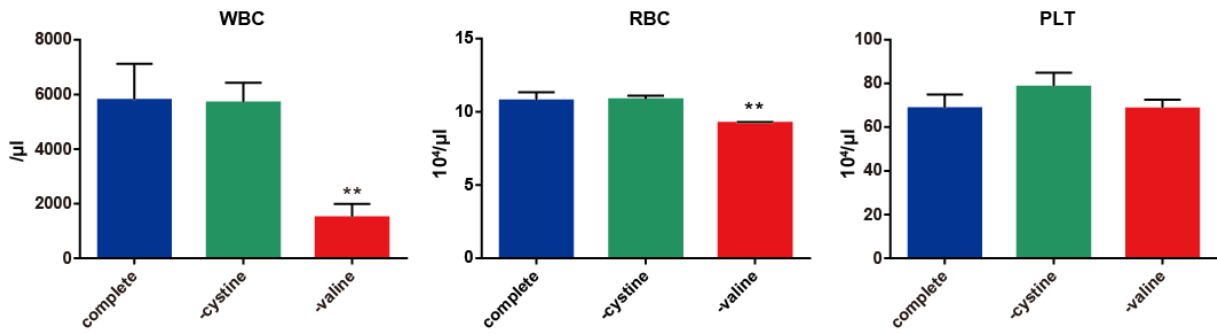


図 11. 人工飼料で 4 週間飼育した B6 マウス骨髄における HSC 分画の解析
 (A) complete、-Cys、-Val 飼料を与えたマウスの CD34⁺KSL 細胞分画の代表的な FACS パターン
 (B) 各人工飼料で飼育したマウスの CD34⁺KSL 細胞の骨髄中の割合 (各群 n=3)
 結果は平均値±標準偏差で示している。complete 群と他の飼料群との比較は、one-way-ANOVA 後に Dunnett 法を用いて評価した。*P<0.05

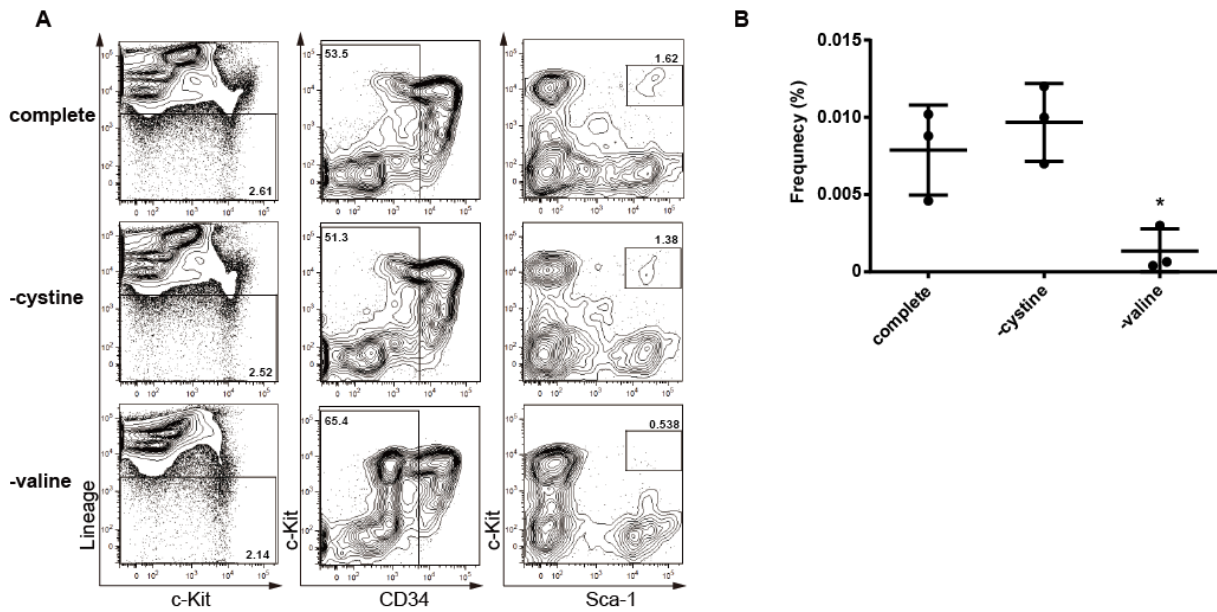


図 12. 必須・準必須アミノ酸欠損飼料で2週間飼育した B6 マウス末梢血中の白血球数 (各群 n=3)

データは平均値±標準偏差で示している。complete 群と他の飼料群との比較は、one-way-ANOVA 後に Dunnett 法を用いて評価した。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

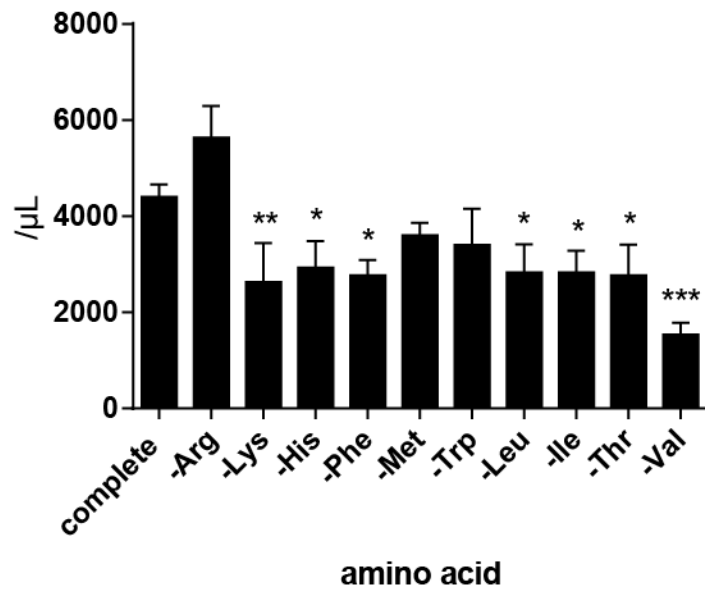


図 13. 人工飼料で4週間飼育した B6 マウス血清および骨髄液のアミノ酸濃度
 (A) complete および -Val 飼料を4週間与えた後、マウスの血清、骨髄液を採取して HPLC
 にてその濃度を測定した。(各群 n=3)
 (B) バリン濃度についての結果の拡大図
 データは平均値±標準偏差で示している。*P<0.05, ***P<0.001

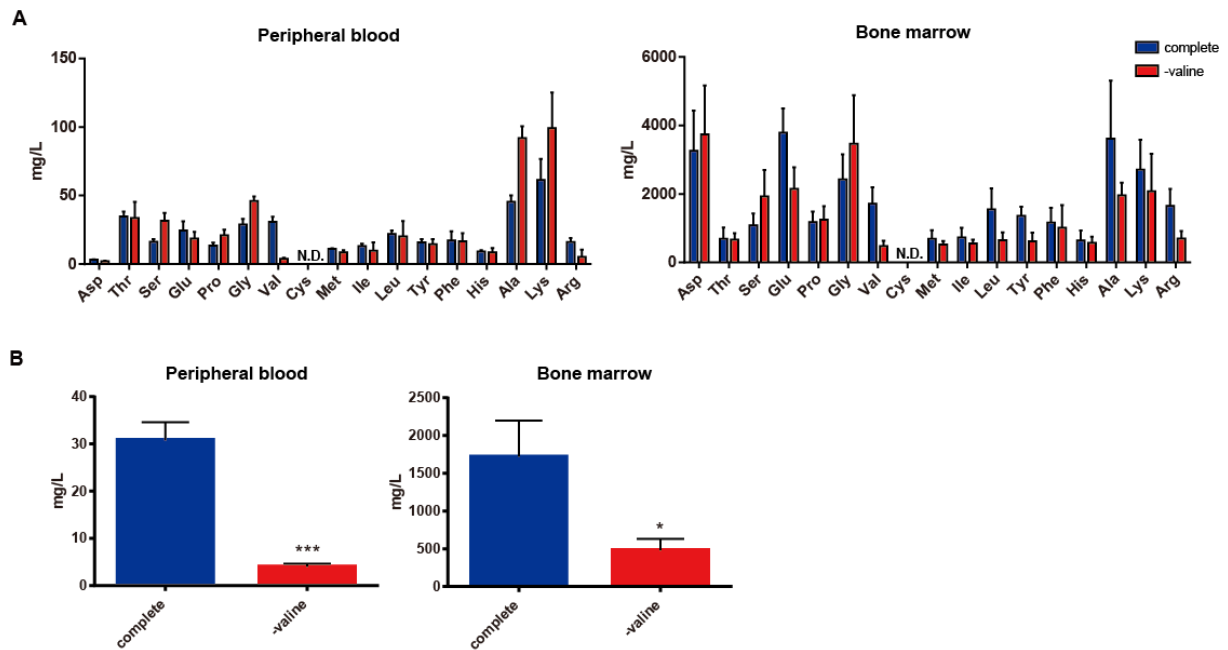


図 14. 人工飼料で飼育した B6 マウス末梢血の経時的な CBC

complete、-Val 飼料で 1-4 週間飼育した B6 マウスの末梢血における WBC、RBC、PLT の数 (complete 群 n=6; -Val 群 n=7)

結果は平均値±標準偏差で示している。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

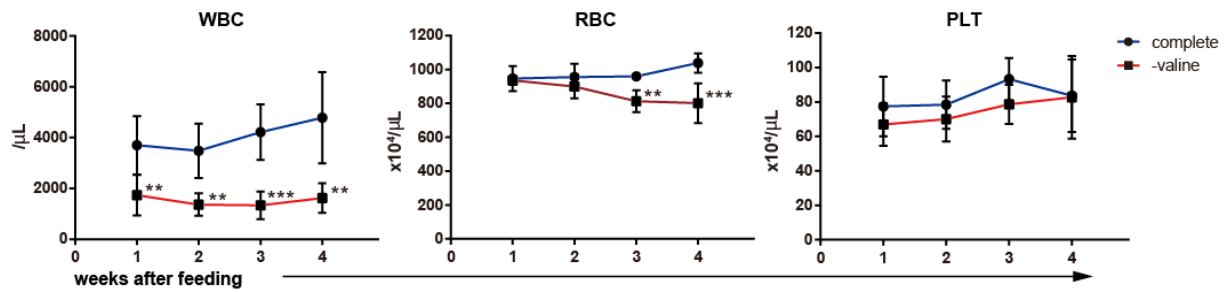


図 15. 人工飼料で飼育した B6 マウス末梢血および骨髄におけるリンパ球、骨髄球系細胞の経時的解析

(A) complete、-Val 飼料で 1-4 週間飼育した B6 マウスの末梢血中の骨髄球系細胞 ($\text{Gr1}^+\text{Mac1}^+$)、B リンパ球 (B220^+)、T リンパ球 (CD3^+) の数 (complete 群 n=8; -Val 群 n=9)

(B) complete、-Val 飼料で 1-4 週間飼育した B6 マウスの大腿骨・脛骨中の骨髄球系細胞 ($\text{Gr1}^+\text{Mac1}^+$)、B リンパ球 (B220^+)、T リンパ球 (CD3^+) の絶対数 (complete 群 n=8; -Val 群 n=9)

結果は平均値±標準偏差で示している。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

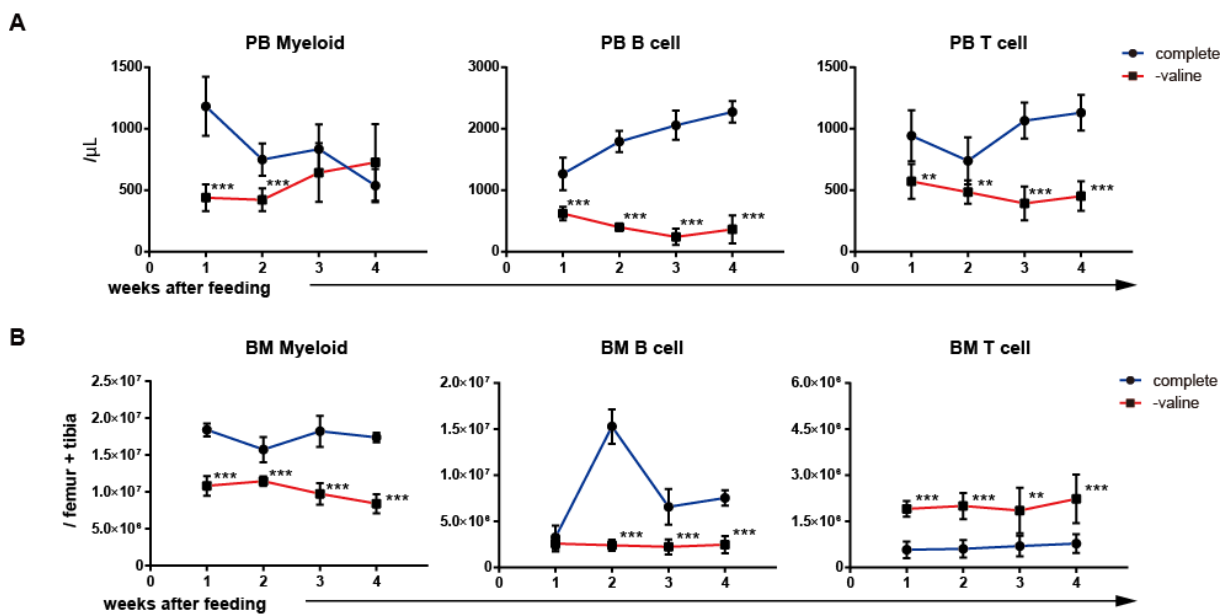


図 16. 人工飼料で飼育した B6 マウス骨髄における CD150 陽性 HSC 分画の経時的解析

(A) complete、-Val 飼料で 4 週間飼育したマウス骨髄の CD150⁺CD41⁻CD48⁻KSL 細胞分画の代表的な FACS パターン

(B) 各人工飼料で 1-4 週間飼育したマウス骨髄における CD150⁺CD41⁻CD48⁻KSL 細胞の割合 (complete 群 n=3; -Val 群 n=4)

結果は平均値±標準偏差で示している。*P<0.05, **P<0.01

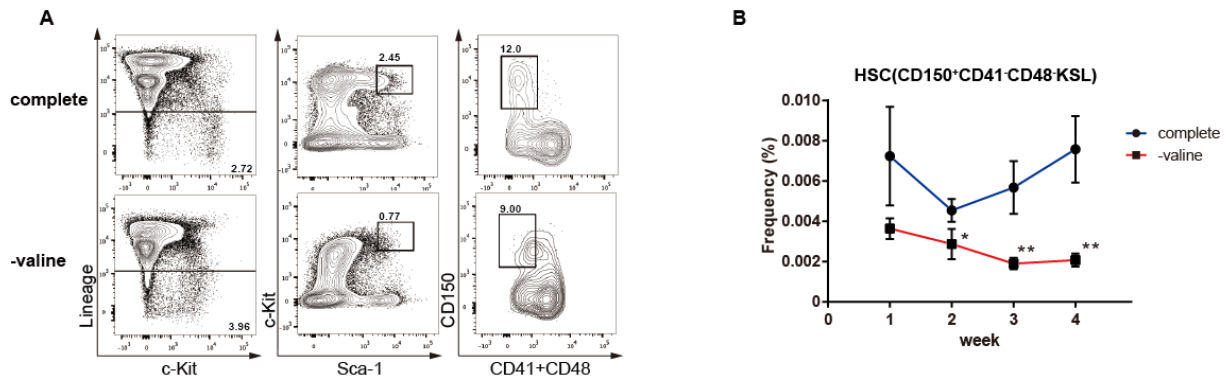


図 17. 人工飼料で 4 週間飼育した B6 マウス骨髄における HSC 分画の細胞周期解析
 (A) KSL 細胞分画における CD34 発現と pyronin Y 蛍光強度の代表的な FACS パターン
 (B) HSC 分画で G0 期にある細胞の割合 (各群 n=3)
 結果は平均値±標準偏差で示している。

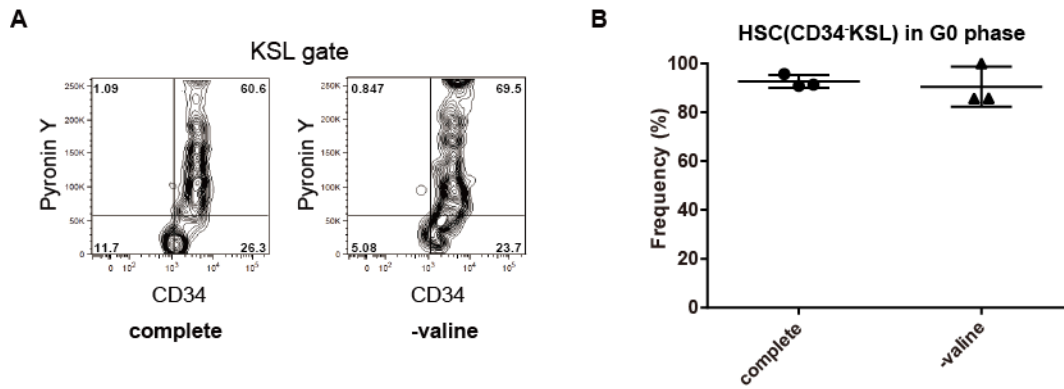
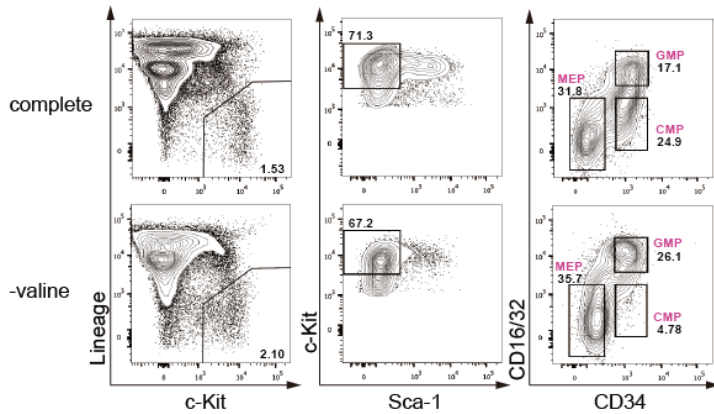


図 18. 人工飼料で飼育した B6 マウス骨髄における造血前駆細胞の経時的解析
 (A) complete、-Val 飼料で 4 週間飼育したマウス骨髄の前駆細胞分画 (CMP、GMP、MEP) の代表的な FACS パターン
 (B) 各人工飼料で 1-4 週間飼育したマウス骨髄の前駆細胞分画の割合 (complete 群 n=3; -Val 群 n=4)
 結果は平均値±標準偏差で示している。

A



B

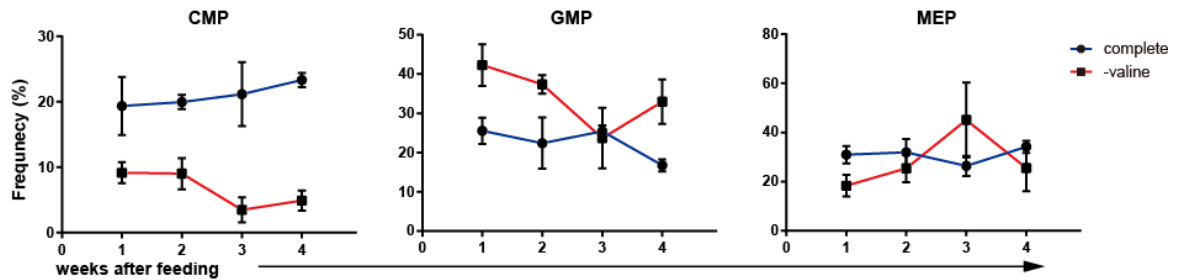
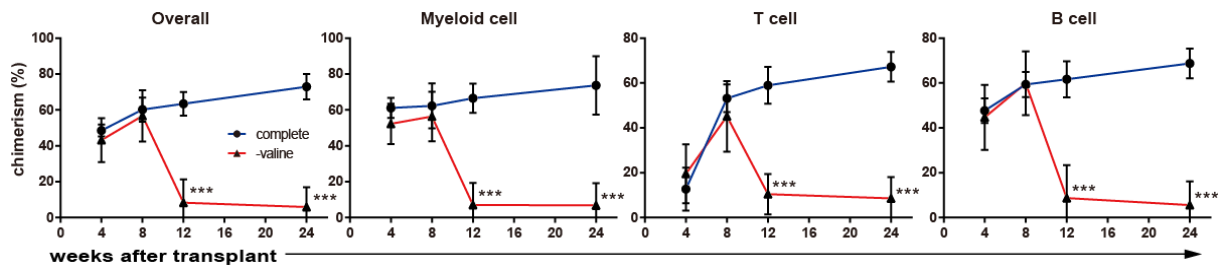


図 19. 人工飼料で飼育したマウス骨髄の長期的骨髄再構築能

complete、-Val 飼料で4週間飼育した B6 マウス (Ly5.1) の骨髄細胞 1×10^6 個を同数の B6 マウス (Ly5.2) 骨髄細胞と共に、致死的な放射線を照射した B6 マウス (Ly5.1/Ly5.2) へ移植した。移植後 24 週間にわたって末梢血のドナーキメリズムの割合を解析した。(各群 n=6)

結果は平均値±標準偏差で示している。***P<0.001



(4) バリン欠乏は造血組織に対して強い障害を示す

in vivo において血液系の細胞に影響があることを示したが、体内の他の臓器にどのような影響が出現するのかを検討するために、-Val 飼料を 4 週間与えたマウスの全身臓器について病理組織学的な解析を行った。骨髄は細胞数の減少・細胞密度の低下を認め (図 20 A, D)、脾臓は肉眼的に著明に萎縮し、白脾髄の萎縮とそれに伴う相対的な赤脾髄の拡大を認めた (図 20 B-D)。また、末梢血中の T 細胞の数が減少したように (図 15 A)、胸腺も著明に萎縮し、皮髄境界が不明瞭になっていた (図 20 C, D)。それ以外の臓器では、毛包の数の減少、横紋筋細胞の萎縮、褐色脂肪細胞の増加、小腸絨毛の伸長・菲薄化などの変化は認められたが、脳、心臓、腎臓、胃、肝臓、膵臓などでは大きな変化を認めなかった (図 21)。バリン欠損飼料を与えたマウスは、1 か月を過ぎた頃に死亡してしまったが、造血系の異常以外は致死的な変化は認めなかった。

次に、バリンによる *in vivo* の影響は不可逆的であるかを検討するために、-Val 飼料を一定期間与えた後に complete 飼料に変えて体重およびリンパ組織の変化について解析した。体重は -Val 飼料開始と共に徐々に減少したが complete 飼料に戻すとすみやかに回復した。また、萎縮していた脾臓と胸腺も飼料を戻して 4 週間で完全に回復した (図 22 A-C)。しかし、-Val 飼料で 3 週間以上飼育したマウスにおいては、complete 飼料に変更して数日以内に 30-50% のマウスが死亡した。原因検索の病理解析を飼料変更 3 日目のマウスで行ったところ、骨髄の細胞密度はすでに回復していたが、肺胞

壁の肥厚と肺胞腔への液体貯留が認められ肺水腫の所見を呈していた。これより、飢餓状態からの急激な回復によって引き起こされる re-feeding 症候群に類似した病態が推測された⁴³ (図 22 D)。

バリン欠乏による脾臓、胸腺の萎縮は 1 か月以内で元に戻ることから、リンパ球系細胞の回復過程について解析を行った。一般的にリンパ球は骨髄中で共通の前駆細胞である CLP より分化し、B 細胞は骨髄の中で分化・成熟し、T 細胞は胸腺へ移動して分化・成熟していく⁴⁴。そこで、-Val 飼料で 2 週間飼育した後 complete 飼料へと変更して経時的に骨髄における CLP の割合を解析した。-Val 飼料で飼育して 2 週間の時点で有意に CLP の割合は低下していたが、complete 飼料に変更してわずか 1 週間で速やかに回復した (図 23)。骨髄の未分化な B 細胞は B220⁺IgM⁻分画において、CD24⁻CD25⁻ (Pro-B)、CD24⁺CD25⁻ (Late Pro-B)、CD24⁺CD25⁺ (Pre-B) と分化していくが、-Val 飼料で 2 週間飼育した時点では Pro-B 細胞から Pre-B 細胞への分化段階において異常を認め、complete 飼料に戻すと Pro-B 細胞分画から徐々に正常の分化と同様に各 B 細胞の割合は回復した (図 24 A)。同様に胸腺における T 細胞の分画についても調べたところ、-Val 飼料で 2 週間飼育した時点では CD4⁻CD8⁻の double negative (DN) 分画から CD4⁺CD8⁺の double positive (DP) への分化段階で異常を認め、DP 分画の割合が著しく低下していたが、飼料を戻した後は速やかに DN 分画から回復した (図 24 B)。以上のことから、バリン欠乏環境では HSC のみではなく、リンパ系細胞の様々な分化段階にも影響を与えていることが分かった。

図 20. 造血系組織に対するバリン欠乏の影響についての病理組織学的解析

(A) complete、-Val 飼料で 4 週間飼育した B6 マウスの大腿骨・脛骨に含まれる細胞数 (各群 n=3)

(B) complete、-Val 飼料で飼育した B6 マウスの脾臓重量の経時的解析および 4 週間目の代表的な写真 (complete 群 n=3; -Val 群 n=4)

(C) complete、-Val 飼料で 4 週間飼育した B6 マウス胸腺の代表的な写真 (黄色の破線)

(D) complete、-Val 飼料で 4 週間飼育した B6 マウスの骨髄、脾臓、胸腺の H-E 染色像 (Wp white pulp; Rp red pulp, C cortex; M, medulla)

結果は平均値±標準偏差で示している。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

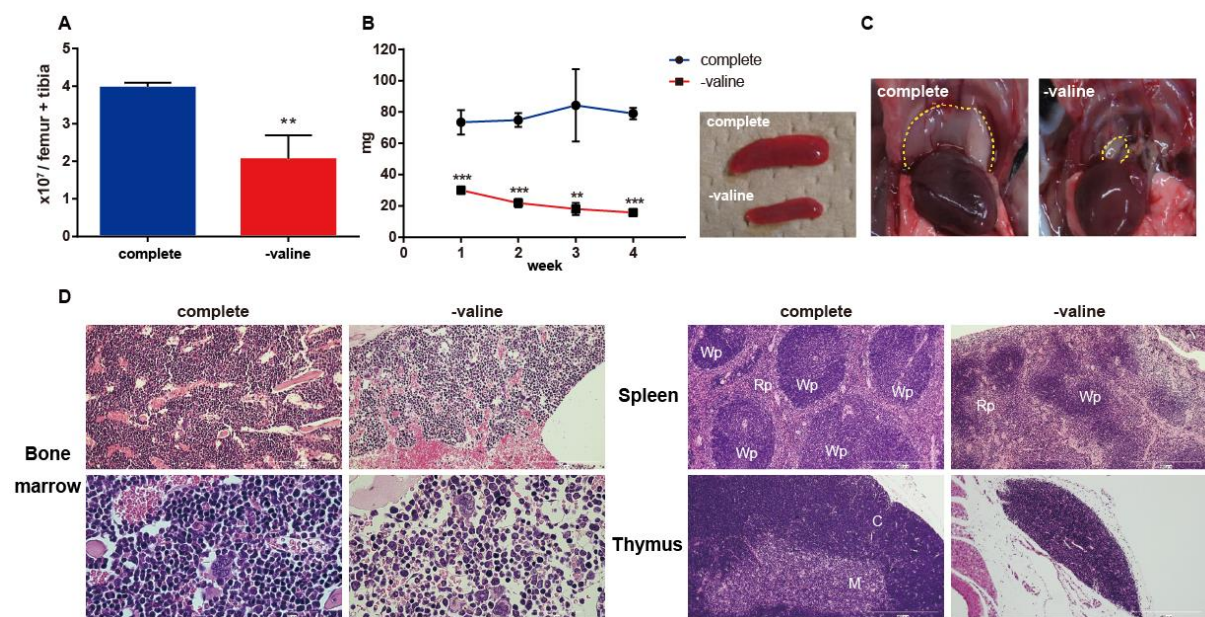


図 21. 造血系以外の組織に対するバリン欠乏の影響

complete、-Val 飼料で 4 週間飼育した B6 マウスから採取した様々な組織の H-E 染色像 (Skin の矢頭は毛包を示している)。毛包の数の減少、横紋筋細胞の萎縮、いろいろな臓器における褐色脂肪細胞の増加、小腸絨毛の伸長・菲薄化を認めたが、脳、心臓、腎臓、胃、肝臓、膵臓などでは大きな変化を認めなかった

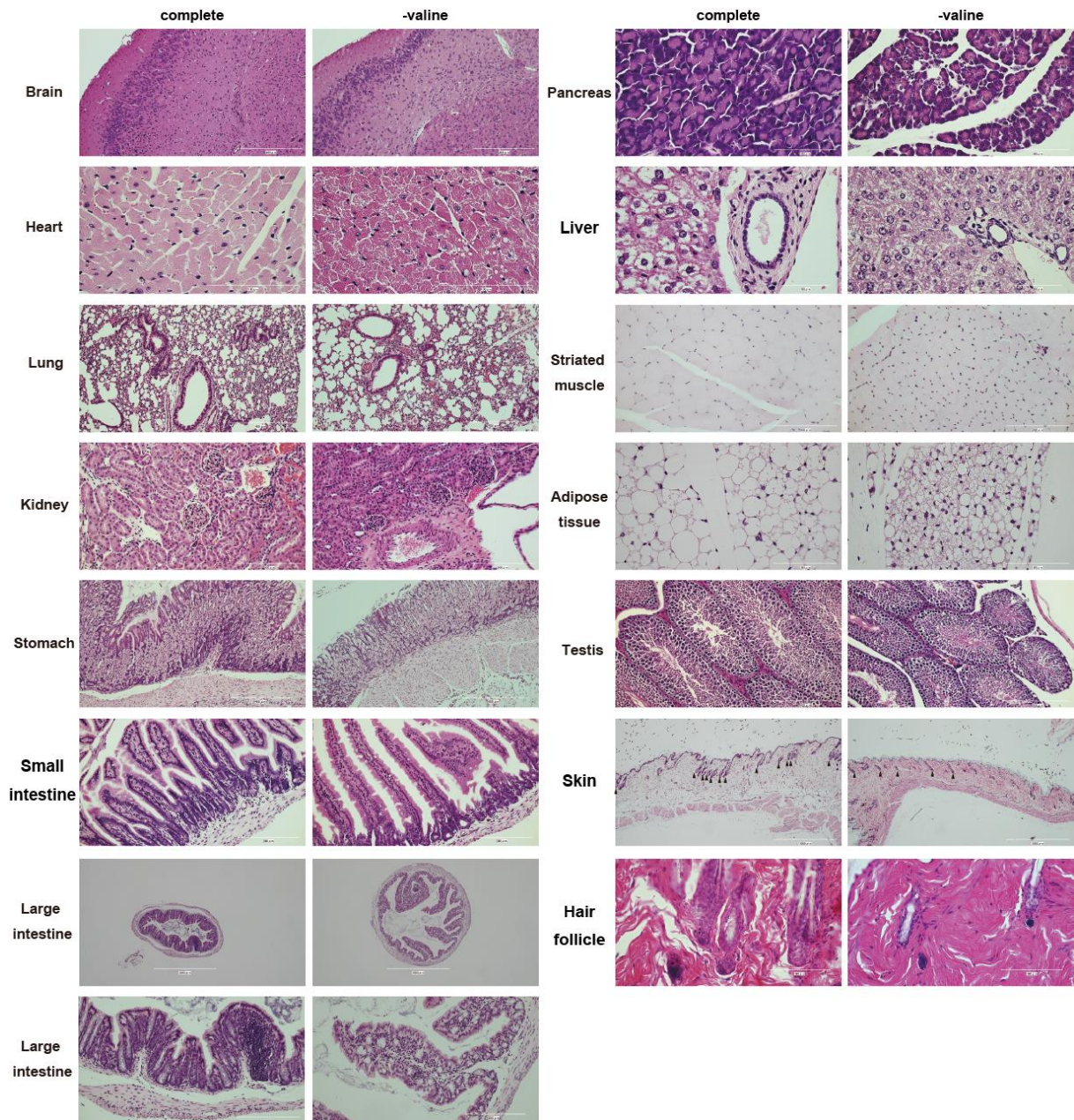


図 22. バリン欠乏環境からの回復過程

(A) -Val 飼料で 1-4 週間飼育後に complete 飼料に変更した B6 マウスの体重の推移

(B、C) -Val 飼料を 4 週間与えた後、complete 飼料に変更して 4 週間目の代表的な脾臓および胸腺 (黄色の破線) の写真

(D) -Val 飼料で 4 週間飼育後、complete 飼料に変更して 3 日目で死亡した B6 マウスの骨髄と肺の H-E 染色像。剖検では異常所見として肺水腫 (肺胞壁の肥厚と肺胞腔への液体貯留) のみ認められ、骨髄の細胞密度低下はすでに回復していた。

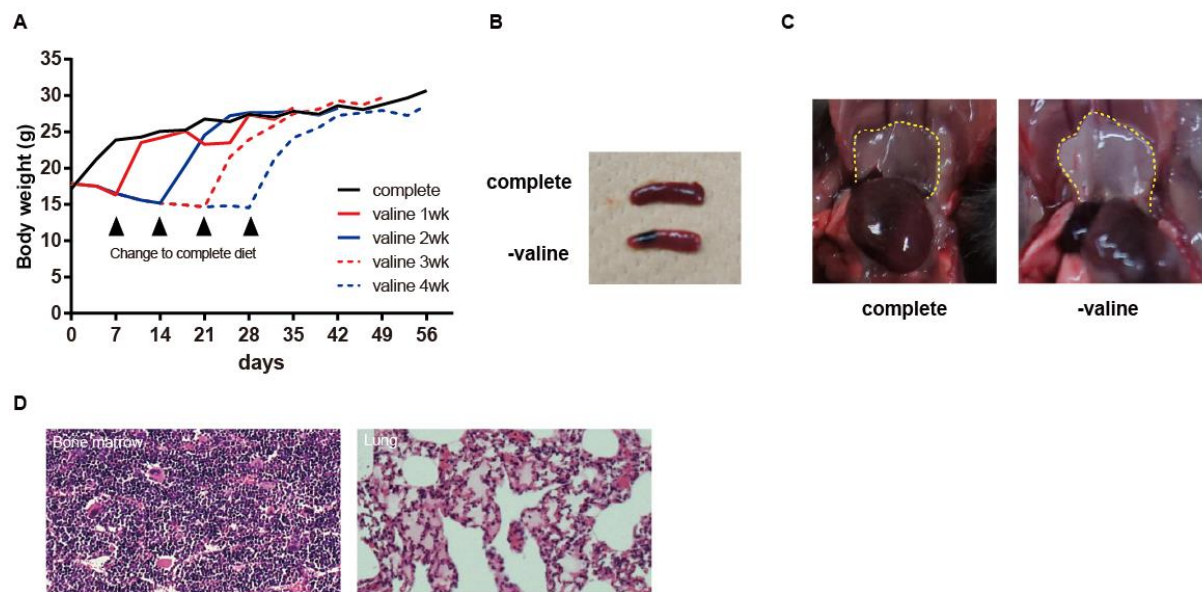


図 23. CLP 分画のバリン欠乏環境からの回復過程

(A) -Val 飼料で 2 週間飼育した後、complete 飼料へ戻す直前、回復 1 週目、2 週目の時点における CLP 分画の代表的な FACS パターン

(B) 回復過程のマウス骨髄における CLP 分画の割合の経時的解析 (各群 n=6)

結果は平均値±標準偏差で示している。 **P<0.01

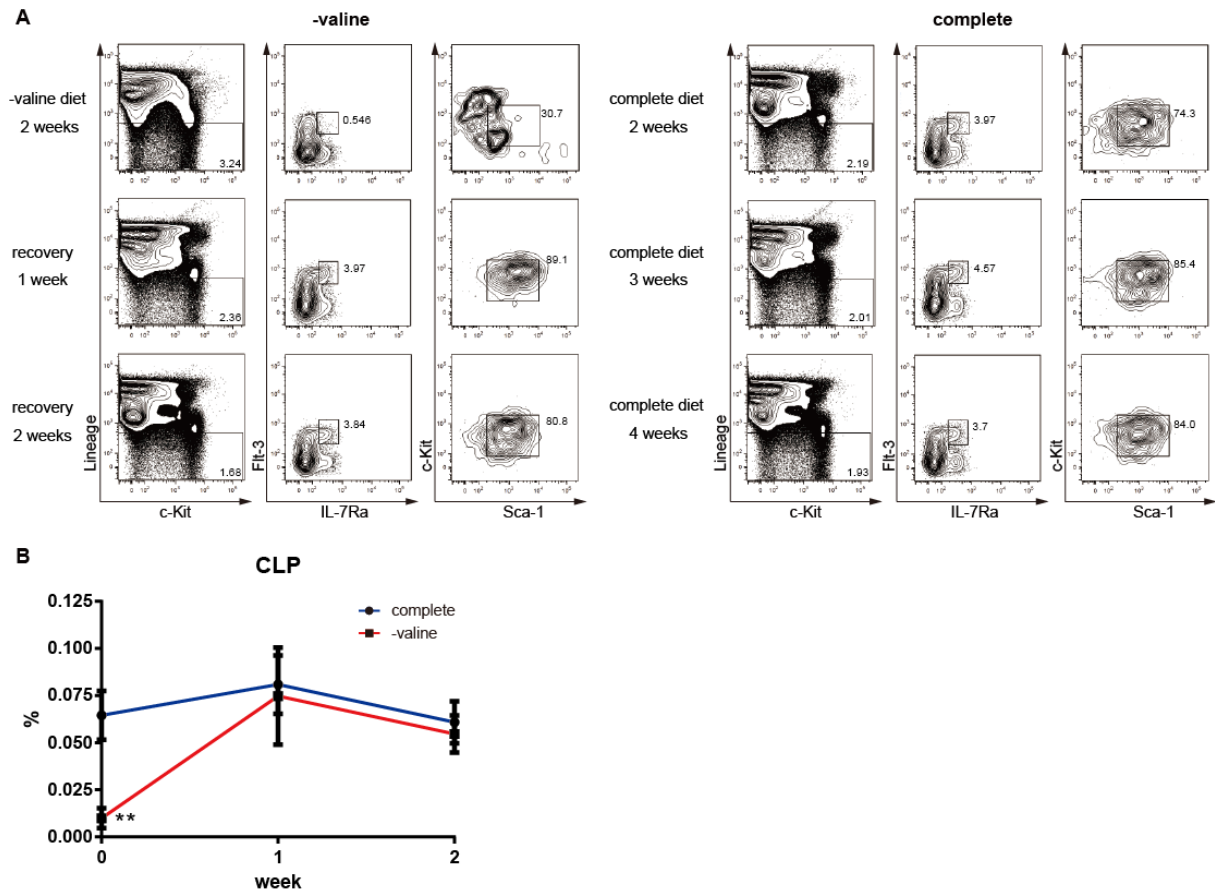
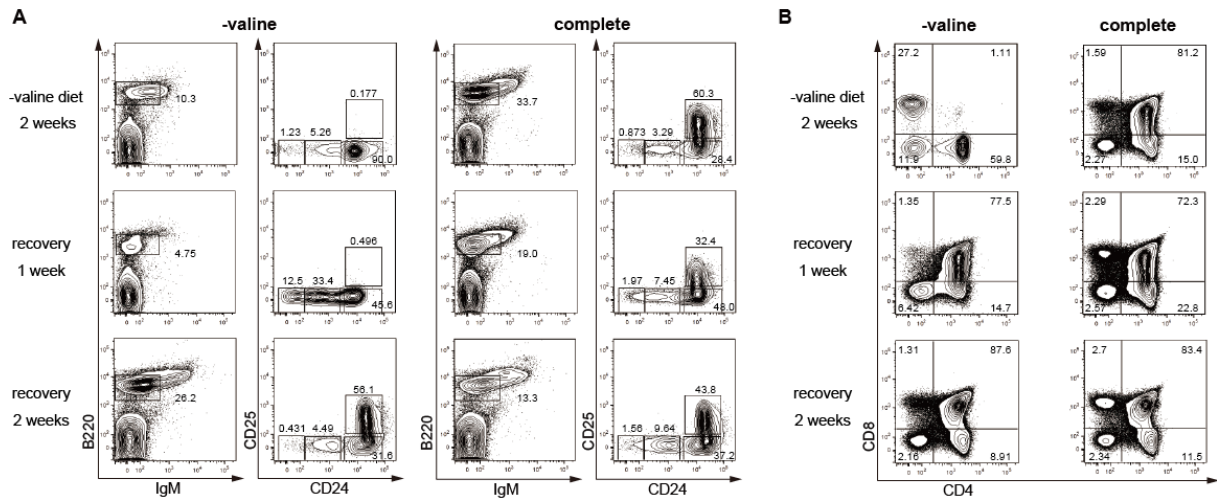


図 24. リンパ球系細胞のバリン欠乏環境からの回復過程

(A) -Val 飼料で 2 週間飼育した後、complete 飼料へ戻す直前、1 週目、2 週目における骨髄中の B 細胞の代表的な FACS パターン

(B) -Val 飼料で 2 週間飼育した後、complete 飼料へ戻す直前、1 週目、2 週目の時点における胸腺中の T 細胞の代表的な FACS パターン

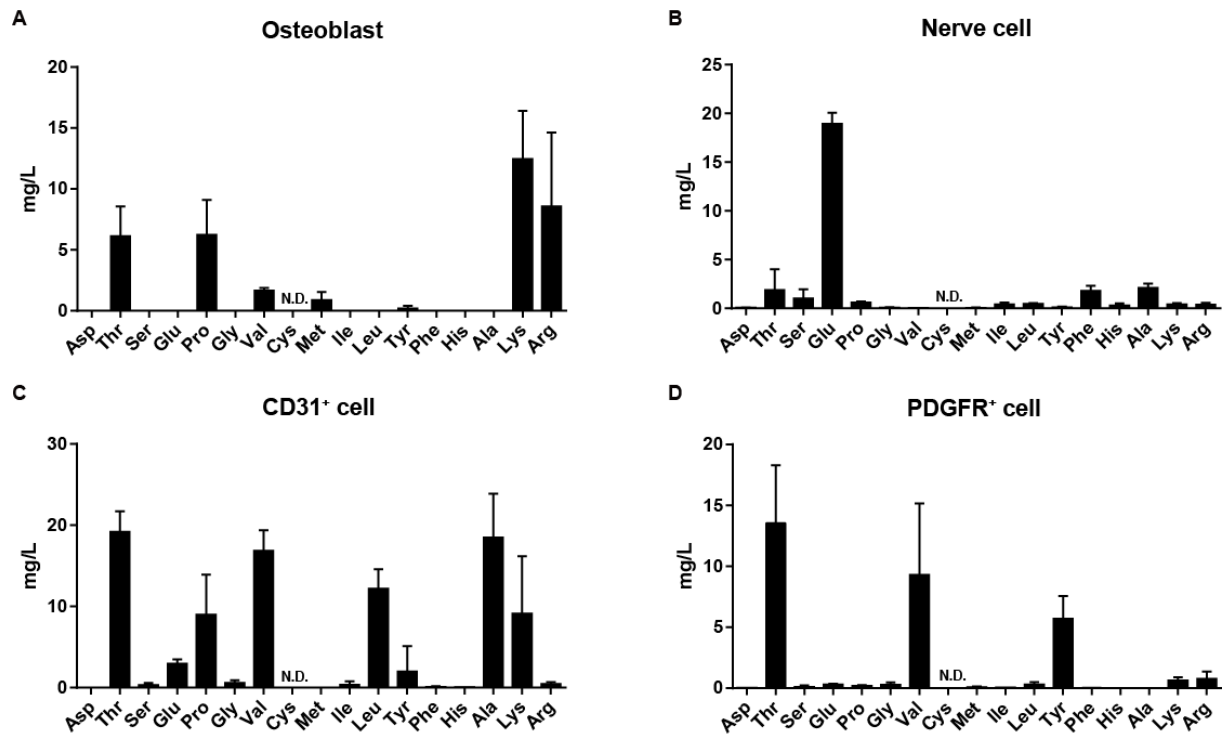


(5) ニッチ構成細胞は骨髄内においてバリンを供給している

これまでの結果から、HSC の機能を維持するためには骨髄内のアミノ酸を適切な濃度に調節することが必要であると考えられる。グリア細胞が近傍の神経細胞の恒常性を維持するために数種類のアミノ酸を分泌しているという報告があることから^{29,30}、骨髄微小環境の中でも HSC に対してアミノ酸を供給する細胞が存在するのではないかと考え、ニッチ構成細胞がアミノ酸を分泌するのかを解析した。ニッチ構成細胞としてこれまでに報告されている、骨芽細胞 (ALCAM⁺Ter119⁻CD45⁻CD31⁻)、神経細胞 (坐骨神経)、血管内皮細胞 (CD45⁻Ter119⁻CD31⁺)、PDGFR α 陽性細胞 (CD140a⁺Ter119⁻CD45⁻) を、それぞれアミノ酸を含まない培養液で3日間培養した後、上清に含まれるアミノ酸濃度について HPLC で測定した。血管内皮細胞では、Thr、Glu、Val、Leu、Ala、Lys などのアミノ酸を分泌しており、PDGFR α ⁺細胞では Thr、Val、Tyr などのアミノ酸を分泌していた (図 25)。このことから、骨髄中におけるバリンをはじめとしたアミノ酸濃度の制御にニッチ構成細胞が重要な役割を担っていることが示唆された。

図 25. 骨髄ニッチ構成細胞からの放出アミノ酸濃度の測定実験

骨芽細胞 (ALCAM⁺Ter119⁻CD45⁻CD31⁻)、血管内皮細胞 (CD45⁻ Ter119⁻ CD31⁺)、PDGFR α 陽性細胞 (CD140a⁺ Ter119⁻ CD45⁻) はそれぞれの表面マーカーによって FACS で 1×10^4 ずつ 96 穴プレートに分離し、神経細胞は坐骨神経を実体顕微鏡下で B6 マウスより採取した。アミノ酸完全欠損培養液でこれらの細胞を 3 日間培養した後、上清に含まれるアミノ酸濃度を HPLC によって測定した。(各群 n=3) 結果は平均値 \pm 標準偏差で示している。



(6) バリン欠損食餌療法による前処置のみで造血幹細胞移植が成立する

-Val 飼料をマウスに与えることで骨髄の細胞密度は低下し、長期骨髄再構築能が失われたことから、バリンを欠乏させることで造血幹細胞移植の前処置として従来行われてきた放射線照射や大量抗がん剤と同様に骨髄ニッチを空けることが可能になるのではないかと仮説を立てた。まずは、自家移植の系としてレシピエントマウス (Ly5.2) に -Val 飼料を 3 週間与えた後、通常の飼料で飼育されたドナーマウス (Ly5.1) の骨髄を移植した。同時に -Val 飼料を complete 飼料へ変更して、末梢血中のドナーのキメリズムを 3 か月間にわたって解析した (図 26A)。その結果、移植後 12 週において約 40% のレシピエントマウスでドナー細胞の生着を認め、骨髄系、B リンパ系、T リンパ系の 3 系統の細胞の出現も確認された (図 26B, C)。

次に同種移植の系でも生着するかを確認するために、NOD/scid マウスをレシピエント、B6 マウスをドナーとした移植を行った。自家移植の系では、-Val 飼料による前処置を受けたマウスのうち約半数が re-feeding 症候群様の症状で死亡したことから、-Val 飼料の投与期間を 2 週間に短縮して実験を計画した。NOD/scid マウス (Ly5.1) に -Val 飼料を 2 週間与えた後、通常の飼料で飼育された B6 マウス (Ly5.2) から分離された KSL 細胞を移植し、同時に -Val 飼料を complete 飼料へと変更して長期再構築能を評価した (図 27A)。前処置の期間が 2 週間と短かったため、移植直後にレシピエントマウスが死亡することはなかった。非常に興味深いことに、移植後 12 週間の時点で、生存しているすべてのマウスで高いキメリズムを認め (図 27B)、本来 NOD/scid

マウスにほとんど存在しないリンパ系の細胞が再構築されていることが確認された (図 27C, 図 28)。しかし、移植後 8 週過ぎたころから、レシピエントマウスに下痢や毛羽立ちが出現し始め、40%のマウス (4 / 10 匹) が死亡した。その原因を病理学的に検討したところ、皮膚の表皮基底層へのリンパ球浸潤と水疱形成、肝臓門脈域における胆管障害と *piecemeal necrosis*、小腸上皮へのリンパ球浸潤、肺胞に炎症を伴わない気管支周囲へのリンパ球浸潤を認め、GVHD 様の所見を示していた (図 29)。リンパ球浸潤の程度は、小腸や皮膚よりも肺、肝臓でより強い傾向にあった。12 週以降、-Val 飼料の前処置を受けたレシピエントマウスはすべて死亡した。一方で、complete 飼料を与えたレシピエントマウスではドナー細胞の生着を認めなかった。

図 26. 非放射線照射自家骨髄移植の解析

(A) レシピエント B6 マウス (Ly5.2) を -Val 飼料で 3 週間飼育後、B6 (Ly5.1) マウスから分離した骨髄細胞 (WBM) 1×10^7 個を経静脈的に移植した。同時に -Val 飼料を complete へ変更し、移植後 12 週間まで 4 週間毎にドナーキメリズムを解析した。

R: Recipient、D: Donor

(-Val 群は re-feeding 症候群様の症状で死亡した 16 匹は解析から除外した。)

(B) 自家移植後 12 週間におけるドナー細胞のキメリズム (complete 群 n=26; -Val 群 n=10) 各群の平均値を bar で示している。

(C) 自家移植後 12 週間における末梢血ドナーキメリズムおよび血球分化細胞の再構築

生着はドナー細胞が 1% 以上と定義し、結果は平均値 \pm 標準偏差で示している。

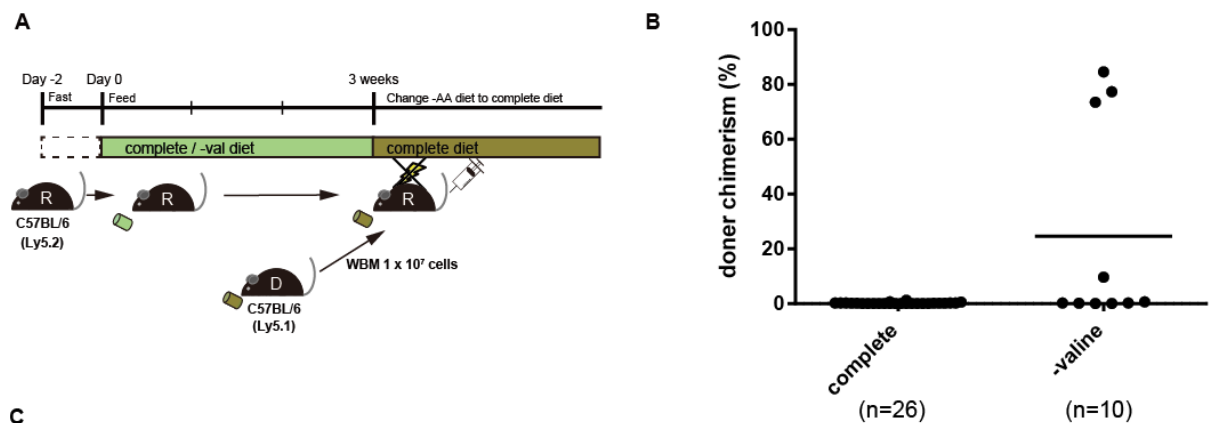


図 27. 非放射線照射同種骨髄移植の解析

(A) レシピエント NOD/scid マウス (Ly5.1) に -Val 飼料を 2 週間与えた後、B6 (Ly5.2) マウスから分離した KSL 細胞 5×10^3 個を経静脈的に移植した。同時に -Val 飼料を complete へ変更し、移植後 12 週間にわたってドナーキメリズムを解析した。

R: recipient、D: Donor

(B) 同種移植後 12 週間におけるドナー細胞のキメリズム (complete 群 n=10; -Val 群 n=6) 各群の平均値を bar で示している。

(C) 同種移植後 12 週間における末梢血ドナーキメリズムおよび血球分化細胞の再構築

生着はドナー細胞が 1% 以上と定義し、結果は平均値 \pm 標準偏差で示している。

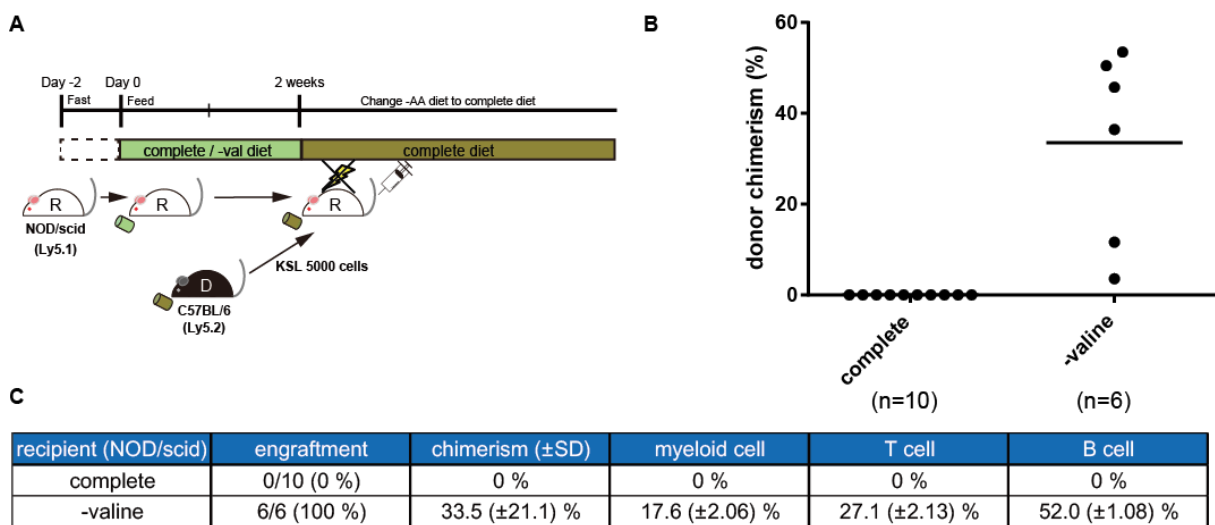


図 28. 非放射線照射同種移植後のレシピエントマウスのリンパ球再構築

(A) -Val 飼料による前処置後に同種移植したレシピエントマウスの移植後 12 週間における代表的な末梢血のリンパ系再構築の FACS パターン

(B) complete、-Val 飼料による前処置後に同種移植したレシピエントマウスの移植後 12 週間における代表的な胸腺写真(黄色の破線)

(C) complete、-Val 飼料による前処置後に同種移植したレシピエントマウスの移植後 12 週間における脾臓および胸腺の H-E 染色像

(Wp: white pulp ; Rp: red pulp)

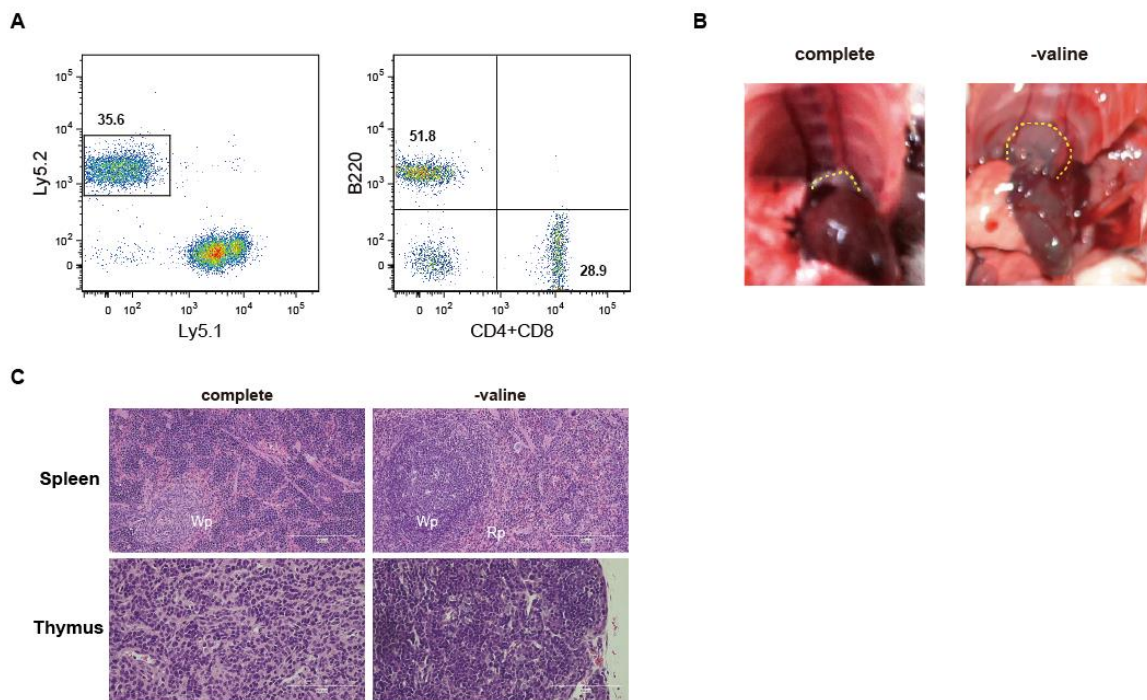
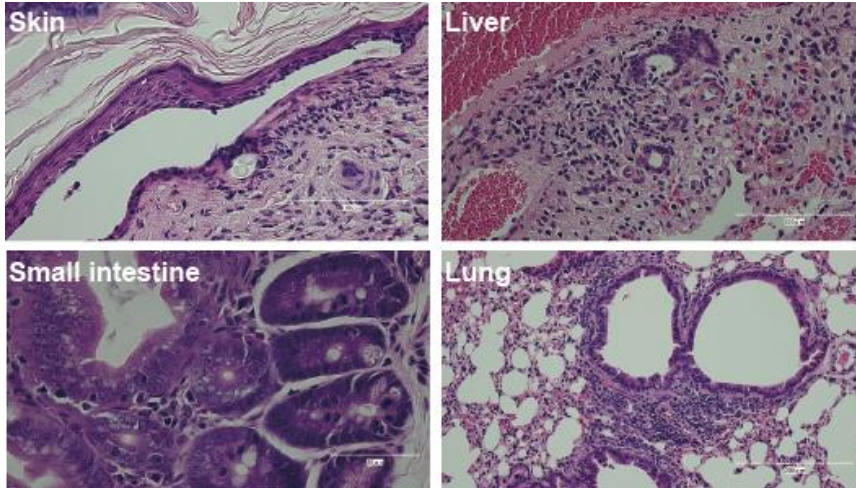


図 29. 非放射線照射同種移植後のレシピエントマウスの病理組織解析

-Val 飼料の前処置による移植後に死亡したレシピエントマウスの皮膚、小腸、肝臓、肺 H-E 染色像。表皮基底層、胆管、肺の気管支周囲、小腸上皮へのリンパ球浸潤を認めた。



VI 考察

今回、私の研究では骨髄内の造血においてアミノ酸環境が非常に重要であることを示した。特にバリン欠乏環境では造血前駆細胞よりも造血幹細胞の数が減少したが、一方で CLP やある特定の未熟な B 細胞、T 細胞の割合もまた著明に低下した (図 23, 24)。このことから、バリン欠乏は HSC において特異的に作用するとともに、多くの異なった血球分化細胞の分化段階に対しても効果を示すと考えられる。-Val 飼料から complete 飼料に戻してわずか数日で骨髄内の細胞数が戻っていたことは (図 22D)、HSC から短時間で細胞が分化したわけではなく、主にリンパ系の前駆細胞などの特定の分化段階の細胞が、バリン供給を受けた後に分化・成熟、増殖した可能性が示唆された。

バリンと同じ分枝鎖アミノ酸に属するロイシン、イソロイシンは生体内において同じ代謝経路を使用している。これまでにラット腹水肝癌細胞やヒト食道癌由来株化細胞に対するアミノ酸インバランス培養実験において、増殖抑制、抗腫瘍効果はロイシン/バリン比が最も大きく影響しているという報告があり⁴⁵、これらの分枝鎖アミノ酸自体の存在比率が重要であると考えられるが、何故 HSC においてバリンのみが重要であるかは不明である。また、主に分枝鎖アミノ酸を細胞内に取り込むために使用される共通の輸送体 L-type amino acid transporter (LAT)1, LAT2, LAT3^{46,47} は、腫瘍細胞に高発現しているという報告⁴⁸はあるものの、HSC に特異的に発現しているという報告はこれまでにほとんどない。一度に採取できる HSC の数に限界があることから、¹³C

代謝フラックス解析やメタボローム解析などの詳細な代謝経路の解析を行うことを非常に困難にしている。

今回の研究では、バリンやシステインが *in vitro* における維持に重要であるということを示した。私たちの研究室では、純化した CD34⁺KSL 細胞を SCF および TPO サイトカイン刺激して無血清培養することで、短期間は未分化性 (マウス体内での骨髄細胞再構築能) を維持する技術を確立している⁴⁹。しかし、ES 細胞と異なり *in vitro* で HSC を半永久的に培養する適切な条件がないことから、長期間のアミノ酸欠損による影響や、アミノ酸補正した後の HSC における多分化能や長期骨髄再構築能への影響を解析することはできない。NAC を加えることで -Cys 培養液で培養した HSC の増殖抑制が救援された (図 6)。システインは生体内において抗酸化物質の一つであるグルタチオン (GSH: Glutathione-SH) を合成する際の材料であり、この不足によって引き起こされる細胞内の ROS 蓄積を NAC によって救援した可能性を示している。その一方で、-Val 培養液で培養した HSC の増殖抑制は NAC によって救援できず、造血幹・前駆細胞における ROS 活性も complete 培養液で培養した時と比べてほとんど変わらなかったことから、HSC においてバリン、システイン欠乏による作用は根本的に異なっていることを示唆している。

アミノ酸の欠乏によって general control nonderepressible 2 kinase (GCN2) や protein kinase R-like ER-localized eIF2a kinase (PERK) が活性化し、小胞体ストレス応答やアポトーシスを引き起こす^{50,51}とされている。PERK は小胞体ストレスを感知して

eukaryotic initiation factor (eIF) 2a をリン酸化することで、細胞の内の翻訳速度を低下させて小胞体に入るタンパク質の合成を減少させる働きや、そのストレス除去機能を超えた時にアポトーシスを誘導する働きをしている。これまでに造血前駆細胞よりも幹細胞において PERK が特異的に発現しており、傷ついた HSC を取り除くことで造血の機能を保っていることが報告されており⁵²、今回私が示したバリン欠乏による現象が幹細胞特異的であることなどに類似性があることから、小胞体ストレスが関係している可能性が考えられる。

他にも HSC が代謝ストレスから防御する時に重要な働きをするのがオートファジーである。オートファジーは細胞内消化によって、障害をうけたミトコンドリアなどの細胞内小器官の再利用や、栄養飢餓時の一時的な栄養素の獲得をする現象で、主にインスリンシグナルおよびロイシンなどのアミノ酸シグナルに応じた mammalian target of rapamycin (mTOR) 複合体 1 の活性化により制御されている⁵³。最近の研究では、HSC は GMP と異なり、転写因子 FOXO3A の発現によるオートファジー応答によって代謝ストレスから保護されているという報告や⁵⁴、オートファジー必須遺伝子である *atg-related gene 7 (Atg7)* の発現を欠損した HSC は骨髄再構築能を失うという報告がなされている⁵⁵。今回はこの代謝システムとの関連について直接解析していないが、一般的に栄養シグナルの下流に存在する mTOR の活性化が ROS の産生を引き起こして HSC へ障害を与えることが考えられており、*in vitro* の -Val 培養条件で HSC に明らかな ROS 活性の上昇を認めなかった (図 6) ことから、オートファジーなどの

従来報告されているものとは異なったメカニズムでバリン欠乏が HSC に影響を与えていることが推測される。

今回私が行った無血清培養では、アミノ酸欠損培地に BSA や S-clone SF-03 に付属の添加剤 (インスリンやトランスフェリンなどのホルモン成長因子) を加えて培養を行っており、これらの中にも少量のアミノ酸が含まれている。HSC を -Cys 培養液で培養した時、アミノ酸完全欠損培養液で培養した時よりも増殖抑制効果が強く出現したこと (図 5B) は、序文で述べたようなアミノ酸インバランスの観点からも非常に興味深い現象である。

in vivo においてもバリン欠乏の影響が HSC に高い特異性があることを示す根拠の一つとして、-Val 飼料を与えたマウスにおいて血小板の数が減少していないことが挙げられる (図 14)。骨髓中の CD150⁺CD41⁺KSL 細胞分画は自己複製能をもつ巨核球系に限定した前駆細胞 (megakaryocyte-repopulating progenitor cells) と定義され⁵⁶、バリン欠乏条件下でも維持されている (図 16) ことから、血小板数が保たれていると考えられる。

骨髓のアミノ酸環境がどのように維持されているかは非常に興味深いことである。今回私は、ニッチ構成細胞がバリンを含めた様々なアミノ酸を分泌することでその環境を形成しているのではないかと仮説を立てた。そして、CD31⁺血管内皮細胞と PDGFR⁺の間葉系幹細胞が主にバリンを放出していることを示した (図 25 C, D)。これらの細胞は骨髓内での HSC の生存と維持のために必要なバリンを供給している一

方、骨芽細胞や非ミエリンシュワン細胞は Ang-1 や TGF- β 、その他のサイトカインを放出して HSC を休眠状態に維持している。TOF-SIMs の結果ではバリリンがスポット状に高濃度の領域が存在していたが (図 2)、ニッチ構成細胞がこのように不均一な分布を示すことは考えにくく、HSC が活発に分裂しているような部位でバリリン代謝がより活性化されていることを示している可能性が考えられる。今後、TOF-SIMs で得られたアミノ酸分布画像と免疫染色などで標識したニッチ構成細胞の分布画像とを合わせてその意義を検討する必要がある。また、in vivo 条件でのバリリン欠乏がニッチ構成細胞に与える影響は今回の解析では示されていない。血球毎に分化を支持する細胞は異なっていることから、-Val 飼料で飼育されたマウス体内で認められた造血系の異常の解析には他分野からのアプローチが望まれる。

今回の研究で示されたバリリン欠乏による影響が前駆細胞よりも HSC に特異的であることは臨床の観点からも非常に有用である。造血幹細胞移植の臨床において、レシピエント HSC は骨髄ニッチ内を占有しており、放射線照射や大量抗がん剤を使用しなければ、ドナーの HSC はほとんど生着することができない。この従来の移植前処置では副作用が多く、移植の適応が制限されてきた。一方、今回行った前処置によるバリリン欠乏の影響は造血系の器官において顕著に現れるが、それ以外の臓器に致死的な変化は認めず (図 21)、食餌を元に戻すことで速やかに回復した (図 19)。しかし、今回の私の研究では自家移植において、生着率に個体差が非常に大きく、未だ適切な移植の条件が見いだせていない。問題の一つとして、バリリン欠乏状態が長く続くほど、

通常状態に切り替えた時に出現する re-feeding 症候群の発症率が上昇すること挙げられる。そこで一般の re-feeding 症候群の治療と同様にマウスの飲み水にごく少量の L-valine を加えて徐々に欠乏状態を補正することで⁴³、その死亡率が低下することを確認している。ある種のアミノ酸は体内に投与されると一時間ほどでタンパク合成に使用されて末梢血中に出現するという報告があり⁵⁷、-Val 飼料から complete 飼料に切り替えて3日後にはすでに骨髄の細胞密度は完全に元に戻っていたこと (図 22 D) を考えると、-Val 飼料を与える期間、complete 飼料に変更、細胞を移植するタイミングについてよく検討する必要がある。また、同種移植後に NOD/scid マウスが GVHD 様の所見を呈したが、scid マウスでは胸腺上皮に異常があるということが知られており⁵⁸、胸腺での教育が不十分な T 細胞が末梢に出現することで GVHD を起こした可能性が示唆された。これまでに従来の移植前処置の代替手段として c-Kit に対するモノクローナル抗体を使用するマウスモデルの報告があるが⁵⁹、本研究によってバリン欠損食餌療法による前処置のみでも造血幹細胞移植が可能となることを示した。

HSC と骨髄ニッチとの相互作用について、同様の概念が白血病幹細胞でも提唱されている。これまでに白血病細胞との関連として、マウスの白血病細胞株を -Val 培養液で培養すると caspase-3 の活性化を介してアポトーシスに陥るという報告がなされている⁶⁰。また、微小環境との関連では、急性リンパ性白血病細胞において、骨髄の間葉系間質細胞に solute carrier family 3, member 2 (SLC3A2) というシスチン輸送体 Xc が発現しており、シスチンを細胞内に取り込んでシステインへと変換して腫瘍へと受

け渡し、腫瘍細胞内で GSH を産生して ROS から身を守っているという報告や⁶¹、慢性リンパ性白血病細胞でも同様に骨髄間質細胞が Xc を発現してシステインを腫瘍細胞へ受け渡しているという報告がなされている⁶²。東北大の西平らは、バリン欠損したアミノ酸インバランス中心静脈栄養を乳がんや肝臓がんモデルラットに施行したところ、腫瘍の縮小と共に脾臓や胸腺の萎縮、脱毛が認められたと報告した³⁷。今後、バリンをはじめとしたアミノ酸インバランス療法の研究が進められ、HSC と同様に白血病や他の癌幹細胞に対しても障害を与えることができれば、アミノ酸濃度を制御することが癌の領域でも新しい治療方法となるかもしれない。

VII 引用文献

1. TILL, J. E. & McCULLOCH, E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* **14**, 213–22 (1961).
2. TILL, J. E., MCCULLOCH, E. A. & SIMINOVITCH, L. A STOCHASTIC MODEL OF STEM CELL PROLIFERATION, BASED ON THE GROWTH OF SPLEEN COLONY-FORMING CELLS. *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**, 29–36 (1964).
3. Micklem, H. S., Ford, C. E., Evans, E. P., Ogden, D. A. & Papworth, D. S. Competitive in vivo proliferation of foetal and adult haematopoietic cells in lethally irradiated mice. *J Cell Physiol* **79**, 293–8 (1972).
4. Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H. & Nakauchi, H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* **273**, 242–5 (1996).
5. Kiel, M. J. *et al.* SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* **121**, 1109–21 (2005).
6. Schofield, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* **4**, 7–25 (1978).

7. Zhang, J. *et al.* Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* **425**, 836–41 (2003).
8. Calvi, L. M. *et al.* Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* **425**, 841–6 (2003).
9. Méndez-Ferrer, S. *et al.* Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* **466**, 829–34 (2010).
10. Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M. & Nagasawa, T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* **25**, 977–88 (2006).
11. Yamazaki, S. *et al.* Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell* **147**, 1146–58 (2011).
12. Morrison, S. J. & Scadden, D. T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* **505**, 327–34 (2014).
13. Yoshihara, H. *et al.* Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell* **1**, 685–97 (2007).

14. Qian, H. *et al.* Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* **1**, 671–84 (2007).
15. Arai, F. *et al.* Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* **118**, 149–61 (2004).
16. Greenbaum, A. *et al.* CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* **495**, 227–30 (2013).
17. Ding, L. & Morrison, S. J. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature* **495**, 231–5 (2013).
18. Yamazaki, S. *et al.* Cytokine signaling, lipid raft clustering, and HSC hibernation. *Ann N Y Acad Sci* **1106**, 54–63 (2007).
19. Adams, G. B. *et al.* Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature* **439**, 599–603 (2006).
20. Takubo, K. *et al.* Regulation of the HIF-1alpha level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* **7**, 391–402 (2010).
21. Sudo, K., Ema, H., Morita, Y. & Nakauchi, H. Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. *J Exp Med* **192**, 1273–80 (2000).

22. Cheshier, S. H., Morrison, S. J., Liao, X. & Weissman, I. L. In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3120–5 (1999).
23. Takubo, K. *et al.* Regulation of glycolysis by Pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* **12**, 49–61 (2013).
24. Miharada, K. *et al.* Cripto regulates hematopoietic stem cells as a hypoxic-niche-related factor through cell surface receptor GRP78. *Cell Stem Cell* **9**, 330–44 (2011).
25. Ito, K. *et al.* A PML–PPAR- δ pathway for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Med* **18**, 1350–8 (2012).
26. Yu, W.-M. *et al.* Metabolic regulation by the mitochondrial phosphatase PTPMT1 is required for hematopoietic stem cell differentiation. *Cell Stem Cell* **12**, 62–74 (2013).
27. Wang, J. *et al.* Dependence of mouse embryonic stem cells on threonine catabolism. *Science* **325**, 435–9 (2009).
28. Shiraki, N. *et al.* Methionine metabolism regulates maintenance and differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell Metab* **19**, 780–94 (2014).

29. Mitoma, J., Furuya, S. & Hirabayashi, Y. A novel metabolic communication between neurons and astrocytes: non-essential amino acid L-serine released from astrocytes is essential for developing hippocampal neurons. *Neurosci Res* **30**, 195–9 (1998).
30. Furuya, S. *et al.* L-serine and glycine serve as major astroglia-derived trophic factors for cerebellar Purkinje neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11528–33 (2000).
31. Kornberg, A., Daft, F. S. & Sebrell, W. H. Granulocytopenia and Anemia in Rats Fed Diets of Low Casein Content. *Science* **103**, 646–8 (1946).
32. Patt, H. M., Tyree, E. B., Straube, R. L. & Smith, D. E. Cysteine Protection against X Irradiation. *Science* **110**, 213–4 (1949).
33. Krehl, W. A., Teply, L. J., Sarma, P. S. & Elvehjem, C. A. GROWTH-RETARDING EFFECT OF CORN IN NICOTINIC ACID-LOW RATIONS AND ITS COUNTERACTION BY TRYPTOPHANE. *Science* **101**, 489–90 (1945).
34. Krehl, W. A., Teply, L. J. & Elvehjem, C. A. CORN AS AN ETIOLOGICAL FACTOR IN THE PRODUCTION OF A NICOTINIC ACID DEFICIENCY IN THE RAT. *Science* **101**, 283 (1945).
35. HARPER, A. E. Balance and imbalance of amino acids. *Ann N Y Acad Sci* **69**, 1025–41 (1958).

36. 柚木 一雄 & 松元 実. アミノ酸インバランスによる白血病の治療. 血液と脈管 **1**, 107–116 (1970).
37. Nishihira, T. *et al.* Anti-cancer therapy with valine-depleted amino acid imbalance solution. *Tohoku J Exp Med* **156**, 259–70 (1988).
38. Appelbaum, F. R. Hematopoietic-cell transplantation at 50. *N Engl J Med* **357**, 1472–5 (2007).
39. Gyurkocza, B. & Sandmaier, B. M. Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation: one size does not fit all. *Blood* **124**, 344–53 (2014).
40. Harper, A. E., Miller, R. H. & Block, K. P. Branched-chain amino acid metabolism. *Annu Rev Nutr* **4**, 409–54 (1984).
41. Stipanuk, M. H. Metabolism of sulfur-containing amino acids. *Annu Rev Nutr* **6**, 179–209 (1986).
42. Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T. & Weissman, I. L. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**, 193–7 (2000).
43. Mehanna, H. M., Moledina, J. & Travis, J. Refeeding syndrome: what it is, and how to prevent and treat it. *BMJ* **336**, 1495–8 (2008).

44. Rothenberg, E. V. Transcriptional control of early T and B cell developmental choices. *Annu Rev Immunol* **32**, 283–321 (2014).
45. 関根 義人. 培養細胞を用いたアミノ酸インバランスに関する基礎的研究. 東北大学医学博士論文 (1987).
46. Del Amo, E. M., Urtti, A. & Yliperttula, M. Pharmacokinetic role of L-type amino acid transporters LAT1 and LAT2. *Eur J Pharm Sci* **35**, 161–74 (2008).
47. Fukuhara, D. *et al.* Protein characterization of NA⁺-independent system L amino acid transporter 3 in mice: a potential role in supply of branched-chain amino acids under nutrient starvation. *Am J Pathol* **170**, 888–98 (2007).
48. Yanagida, O. *et al.* Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta* **1514**, 291–302 (2001).
49. Ema, H., Takano, H., Sudo, K. & Nakauchi, H. In vitro self-renewal division of hematopoietic stem cells. *J Exp Med* **192**, 1281–8 (2000).
50. Dever, T. E. & Hinnebusch, A. G. GCN2 whets the appetite for amino acids. *Mol Cell* **18**, 141–2 (2005).

51. Walter, P. & Ron, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* **334**, 1081–6 (2011).
52. Van Galen, P. *et al.* The unfolded protein response governs integrity of the haematopoietic stem-cell pool during stress. *Nature* **510**, 268–72 (2014).
53. Kohli, L. & Passegué, E. Surviving change: the metabolic journey of hematopoietic stem cells. *Trends Cell Biol* **24**, 479–87 (2014).
54. Warr, M. R. *et al.* FOXO3A directs a protective autophagy program in haematopoietic stem cells. *Nature* **494**, 323–7 (2013).
55. Mortensen, M. *et al.* The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance. *J Exp Med* **208**, 455–67 (2011).
56. Yamamoto, R. *et al.* Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. *Cell* **154**, 1112–26 (2013).
57. BORSOOK, H., DEASY, C. L., HAAGENS MIT, A. J., KEIGHLEY, G. & LOWY, P. H. Metabolism of C¹⁴ labeled glycine, L-histidine, L-leucine, and L-lysine. *J Biol Chem* **187**, 839–48 (1950).

58. Shores, E. W., Van Ewijk, W. & Singer, A. Disorganization and restoration of thymic medullary epithelial cells in T cell receptor-negative scid mice: evidence that receptor-bearing lymphocytes influence maturation of the thymic microenvironment. *Eur J Immunol* **21**, 1657–61 (1991).
59. Czechowicz, A., Kraft, D., Weissman, I. L. & Bhattacharya, D. Efficient transplantation via antibody-based clearance of hematopoietic stem cell niches. *Science* **318**, 1296–9 (2007).
60. Ohtawa, K. *et al.* Apoptosis of leukemia cells induced by valine-deficient medium. *Leukemia* **12**, 1651–2 (1998).
61. Bouter, J. *et al.* Image-based RNA interference screening reveals an individual dependence of acute lymphoblastic leukemia on stromal cysteine support. *Oncotarget* **5**, 11501–12 (2014).
62. Zhang, W. *et al.* Stromal control of cystine metabolism promotes cancer cell survival in chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Cell Biol* **14**, 276–86 (2012).

VIII 表

表1. アミノ酸欠損培養液におけるアミノ酸の組成表
(S-clone SF-03 とアミノ酸 1 種類を除いて同等の組成)

Amino Acids (mg/L)	Complete	A(-Ala)	C(-Cys)	D(-Asp)	E(-Glu)	F(-Phe)	G(-Gly)	H(-His)	I(-Ile)	K(-Lys)	L(-Leu)	M(-Met)	N(-Asn)	P(-Pro)	Q(-Gln)	R(-Arg)	S(-Ser)	T(-Thr)	V(-Val)	W(-Trp)	Y(-Tyr)	None
L-Alanine	2,225	0	2,225	2,225	2,225	2,225	2,225	2,225	2,225	2,225	2,225	2,225	2,225	2,225	2,225	2,225	2,225	2,225	2,225	2,225	2,225	0
L-Arginine • HCl	73.75	73.75	73.75	73.75	73.75	73.75	73.75	73.75	73.75	73.75	73.75	73.75	73.75	73.75	73.75	0	73.75	73.75	73.75	73.75	73.75	0
L-Arginine	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	0
L-Asparagine (anhydrous)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	0	25	25	25	25	25	25	25	25	0
L-Asparagine • H ₂ O	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	0	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	0
L-Aspartic Acid	13,325	13,325	13,325	0	13,325	13,325	13,325	13,325	13,325	13,325	13,325	13,325	13,325	13,325	13,325	13,325	13,325	13,325	13,325	13,325	13,325	0
L-Aspartic Acid • 2HCl	48,245	48,245	0	48,245	48,245	48,245	48,245	48,245	48,245	48,245	48,245	48,245	48,245	48,245	48,245	48,245	48,245	48,245	48,245	48,245	48,245	0
L-Cysteine • HCl • H ₂ O	8.78	8.78	0	8.78	8.78	8.78	8.78	8.78	8.78	8.78	8.78	8.78	8.78	8.78	8.78	8.78	8.78	8.78	8.78	8.78	8.78	0
L-Glutamic Acid	13,675	13,675	13,675	13,675	0	13,675	13,675	13,675	13,675	13,675	13,675	13,675	13,675	13,675	13,675	13,675	13,675	13,675	13,675	13,675	13,675	0
L-Glutamine	332.5	332.5	332.5	332.5	332.5	332.5	332.5	332.5	332.5	332.5	332.5	332.5	332.5	332.5	332.5	332.5	332.5	332.5	332.5	332.5	332.5	0
Glycine	14,375	14,375	14,375	14,375	14,375	14,375	14,375	14,375	14,375	14,375	14,375	14,375	14,375	14,375	14,375	14,375	14,375	14,375	14,375	14,375	14,375	0
L-Histidine • HCl • H ₂ O	15.74	15.74	15.74	15.74	15.74	15.74	15.74	15.74	15.74	15.74	15.74	15.74	15.74	15.74	15.74	15.74	15.74	15.74	15.74	15.74	15.74	0
L-Histidine	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	0
Hydroxy-L-Proline	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	0
L-Isoleucine	297.35	297.35	297.35	297.35	297.35	297.35	297.35	297.35	297.35	297.35	297.35	297.35	297.35	297.35	297.35	297.35	297.35	297.35	297.35	297.35	297.35	0
L-Leucine	54,525	54,525	54,525	54,525	54,525	54,525	54,525	54,525	54,525	54,525	54,525	54,525	54,525	54,525	54,525	54,525	54,525	54,525	54,525	54,525	54,525	0
L-Lysine • HCl	65,625	65,625	65,625	65,625	65,625	65,625	65,625	65,625	65,625	65,625	65,625	65,625	65,625	65,625	65,625	65,625	65,625	65,625	65,625	65,625	65,625	0
L-Methionine	16.12	16.12	16.12	16.12	16.12	16.12	16.12	16.12	16.12	16.12	16.12	16.12	16.12	16.12	16.12	16.12	16.12	16.12	16.12	16.12	16.12	0
L-Phenylalanine	25.24	25.24	25.24	25.24	25.24	25.24	25.24	25.24	25.24	25.24	25.24	25.24	25.24	25.24	25.24	25.24	25.24	25.24	25.24	25.24	25.24	0
L-Proline	18,625	18,625	18,625	18,625	18,625	18,625	18,625	18,625	18,625	18,625	18,625	18,625	18,625	18,625	18,625	18,625	18,625	18,625	18,625	18,625	18,625	0
L-Serine	28,125	28,125	28,125	28,125	28,125	28,125	28,125	28,125	28,125	28,125	28,125	28,125	28,125	28,125	28,125	28,125	28,125	28,125	28,125	28,125	28,125	0
L-Threonine	36,725	36,725	36,725	36,725	36,725	36,725	36,725	36,725	36,725	36,725	36,725	36,725	36,725	36,725	36,725	36,725	36,725	36,725	36,725	36,725	36,725	0
L-Tryptophan	7.01	7.01	7.01	7.01	7.01	7.01	7.01	7.01	7.01	7.01	7.01	7.01	7.01	7.01	7.01	7.01	7.01	7.01	7.01	7.01	7.01	0
L-Tyrosine • 2Na • 2H ₂ O	42.31	42.31	42.31	42.31	42.31	42.31	42.31	42.31	42.31	42.31	42.31	42.31	42.31	42.31	42.31	42.31	42.31	42.31	42.31	42.31	42.31	0
L-Valine	36,425	36,425	36,425	36,425	36,425	36,425	36,425	36,425	36,425	36,425	36,425	36,425	36,425	36,425	36,425	36,425	36,425	36,425	36,425	36,425	36,425	0

表 2. アミノ酸欠損飼料の組成表

Product #	A10021B complete		A05080209 -valine		A05080217 -cystine		A05080202 -leucine		A05080204 -isoleucine		A05080203 -lysine		A05080214 -histidine		A05080211 -phenylalanine		A05080210 -methionine		A10033Y -tryptophan		A05080201 -threonine		A10036 -arginine	
	gm %	kcal %	gm %	kcal %	gm %	kcal %	gm %	kcal %	gm %	kcal %	gm %	kcal %	gm %	kcal %	gm %	kcal %	gm %	kcal %	gm %	kcal %	gm %	kcal %	gm %	kcal %
Protein	17	18	16	17	17	17	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	17	16	16	16	17
Carbohydrate	69	71	69	72	69	71	70	72	69	72	70	72	69	72	69	71	69	71	69	71	69	71	69	72
Fat	5	12	5	12	5	12	5	12	5	12	5	12	5	12	5	12	5	12	5	12	5	12	5	12
total	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
kcal/gm	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9
Ingredient (gm)																								
L-Arginine	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40
L-Histidine-HCl-H2O	6	24	6	24	6	24	6	24	6	24	6	24	6	24	6	24	6	24	6	24	6	24	6	24
L-Isoleucine	8	32	8	32	8	32	8	32	8	32	8	32	8	32	8	32	8	32	8	32	8	32	8	32
L-Leucine	12	48	12	48	12	48	12	48	12	48	12	48	12	48	12	48	12	48	12	48	12	48	12	48
L-Lysine-HCl	14	56	14	56	14	56	14	56	14	56	14	56	14	56	14	56	14	56	14	56	14	56	14	56
L-Methionine	6	24	6	24	6	24	6	24	6	24	6	24	6	24	6	24	6	24	6	24	6	24	6	24
L-Phenylalanine	8	32	8	32	8	32	8	32	8	32	8	32	8	32	8	32	8	32	8	32	8	32	8	32
L-Threonine	8	32	8	32	8	32	8	32	8	32	8	32	8	32	8	32	8	32	8	32	8	32	8	32
L-Tryptophan	2	8	2	8	2	8	2	8	2	8	2	8	2	8	2	8	2	8	2	8	2	8	2	8
L-Valine	8	32	8	32	8	32	8	32	8	32	8	32	8	32	8	32	8	32	8	32	8	32	8	32
L-Alanine	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40
L-Asparagine-H2O	5	20	5	20	5	20	5	20	5	20	5	20	5	20	5	20	5	20	5	20	5	20	5	20
L-Aspartate	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40
L-Cystine	4	16	4	16	4	16	4	16	4	16	4	16	4	16	4	16	4	16	4	16	4	16	4	16
L-Glutamic Acid	30	120	30	120	30	120	30	120	30	120	30	120	30	120	30	120	30	120	30	120	30	120	30	120
L-Glutamine	5	20	5	20	5	20	5	20	5	20	5	20	5	20	5	20	5	20	5	20	5	20	5	20
Glycine	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40
L-Proline	5	20	5	20	5	20	5	20	5	20	5	20	5	20	5	20	5	20	5	20	5	20	5	20
L-Serine	5	20	5	20	5	20	5	20	5	20	5	20	5	20	5	20	5	20	5	20	5	20	5	20
L-Tyrosine	4	16	4	16	4	16	4	16	4	16	4	16	4	16	4	16	4	16	4	16	4	16	4	16
Total L-amino acids	170	680	162	648	166	664	158	632	162	648	156	624	164	656	162	648	164	656	168	672	162	648	160	640
Corn starch	550.5	2202	558.5	2234	554.5	2218	562.5	2250	558.5	2234	564.5	2258	556.5	2226	558.5	2234	556.5	2226	552.5	2210	558.5	2234	560.5	2242
Maltodextrin 10	125	500	125	500	125	500	125	500	125	500	125	500	125	500	125	500	125	500	125	500	125	500	125	500
Sucrose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cellulose	50	0	50	0	50	0	50	0	50	0	50	0	50	0	50	0	50	0	50	0	50	0	50	0
Corn Oil	50	450	50	450	50	450	50	450	50	450	50	450	50	450	50	450	50	450	50	450	50	450	50	450
Mineral mix S10001	35	0	35	0	35	0	35	0	35	0	35	0	35	0	35	0	35	0	35	0	35	0	35	0
Sodium bicarbonate	7.5	0	7.5	0	7.5	0	7.5	0	7.5	0	7.5	0	7.5	0	7.5	0	7.5	0	7.5	0	7.5	0	7.5	0
Vitamin mix V10001	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40
Choline bitartrate	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0
Yellow dye, FD&C #5	0	0	0	0	0.01	0	0.025	0	0	0	0.025	0	0.01	0	0	0	0.025	0	0.05	0	0	0	0	0
Red dye, FD&C #4	0	0	0.025	0	0	0	0.025	0	0.05	0	0	0	0.02	0	0.05	0	0	0	0	0	0.025	0	0.05	0
Blue dye, FD&C #1	0.05	0	0.025	0	0.04	0	0	0	0	0	0.025	0	0.02	0	0	0	0.025	0	0	0	0	0.025	0	0
Total	1000.05	3872	1000.05	3872	1000.05	3872	1000.05	3872	1000.05	3872	1000.05	3872	1000.05	3872	1000.05	3872	1000.05	3872	1000.05	3872	1000.05	3872	1000.05	3872

表 3. -Val 培養液と complete 培養液で培養した CD34⁺KSL 細胞の Gene ontology 解析

complete vs. -Val

GO ID	Description	<i>p</i> -value
GO:0007067	mitosis	1.80E-23
GO:0051301	cell division	1.20E-22
GO:0007049	cell cycle	1.76E-20
GO:0006260	DNA replication	3.36E-10
GO:0007052	mitotic spindle organization	1.29E-08
GO:0007059	chromosome segregation	1.41E-06
GO:0007076	mitotic chromosome condensation	1.93E-06
GO:0010569	regulation of double-strand break repair via homologous recombination	1.93E-06
GO:0000070	mitotic sister chromatid segregation	2.87E-06
GO:0030261	chromosome condensation	2.87E-06
GO:0035458	cellular response to interferon-beta	2.14E-05

表 4. -Cys 培養液と complete 培養液で培養した CD34⁺KSL 細胞の Gene ontology 解析

complete vs -Cys

GO ID	Description	<i>p</i> -value
GO:0006260	DNA replication	4.80E-13
GO:0007049	cell cycle	2.33E-11
GO:0030261	chromosome condensation	6.62E-11
GO:0051301	cell division	5.28E-10
GO:0007067	mitosis	1.79E-08
GO:0007076	mitotic chromosome condensation	5.92E-07
GO:0006974	cellular response to DNA damage stimulus	1.07E-05
GO:0007052	mitotic spindle organization	3.35E-05
GO:0010569	regulation of double-strand break repair via homologous recombination	3.35E-05
GO:0006310	DNA recombination	8.86E-05

表 5. -Val 培養液で培養した CD34⁺KSL 細胞において発現量に差の認められる遺伝子

Gene	Complete	-Val	log2(FC)	p-value	cell cycle	cell division	mitosis	DNA replication
<i>2210403K04Rik</i>	7.59	38.65	2.35	6.50E-03
<i>Aarsd1</i>	133.96	39.40	-1.77	4.40E-03
<i>Acot2</i>	15.17	57.10	1.91	5.50E-03
<i>Aqp9</i>	40.59	113.02	1.48	9.15E-03
<i>Asf1b</i>	97.78	14.03	-2.80	7.00E-04
<i>Atp2a3</i>	22.29	5.41	-2.04	3.30E-03
<i>Aurka</i>	44.28	5.93	-2.90	4.05E-03	Yes	Yes	Yes	.
<i>Aurkb</i>	80.18	6.09	-3.72	7.00E-04	Yes	Yes	Yes	.
<i>Birc5</i>	127.62	9.57	-3.74	2.10E-03	Yes	Yes	Yes	.
<i>Brca1</i>	9.94	1.93	-2.36	5.80E-03	Yes	.	.	Yes
<i>Brip1</i>	12.96	3.00	-2.11	3.80E-03
<i>Bub1b</i>	41.76	3.08	-3.76	7.00E-04	Yes	Yes	Yes	.
<i>Cad</i>	20.36	6.36	-1.68	6.60E-03
<i>Ccl4</i>	331.71	1325.53	2.00	5.50E-04
<i>Ccl5</i>	2303.99	8180.08	1.83	9.50E-04
<i>Ccl9</i>	49.07	165.60	1.75	1.35E-03
<i>Ccnb1</i>	55.88	5.34	-3.39	1.45E-03	Yes	Yes	Yes	.
<i>Ccnf</i>	31.55	3.69	-3.10	2.75E-03	Yes	Yes	Yes	.
<i>Cdc45</i>	48.19	13.67	-1.82	9.50E-03	Yes	Yes	.	Yes
<i>Cdc6</i>	67.00	14.52	-2.21	2.00E-04	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Cdca2</i>	19.56	4.08	-2.26	6.70E-03	Yes	Yes	Yes	.
<i>Cdca5</i>	50.87	12.20	-2.06	7.25E-03	Yes	Yes	Yes	.
<i>Cdca8</i>	105.93	18.77	-2.50	3.50E-04	Yes	Yes	Yes	.
<i>Cdk1</i>	45.10	4.47	-3.34	1.10E-03	Yes	Yes	Yes	.
<i>Cenpm</i>	61.85	6.53	-3.24	6.15E-03
<i>Cenpn</i>	34.51	4.55	-2.92	8.95E-03	.	.	Yes	.
<i>Chek1</i>	23.03	5.20	-2.15	7.85E-03	Yes	.	.	.
<i>Ckap2l</i>	33.36	4.04	-3.04	2.25E-03
<i>Cxcl10</i>	175.41	590.45	1.75	1.80E-03

<i>Ercc6l</i>	18.26	2.52	-2.86	4.20E-03	Yes	Yes	Yes	.
<i>F830016B08Rik</i>	12.08	61.93	2.36	2.00E-04
<i>Fbxo5</i>	44.40	4.44	-3.32	5.85E-03	Yes	Yes	Yes	.
<i>Fcer2a</i>	43.78	213.96	2.29	1.00E-04
<i>Figl1</i>	106.78	39.11	-1.45	7.20E-03
<i>Gbp2</i>	138.84	451.83	1.70	2.15E-03
<i>Gbp4</i>	12.77	76.98	2.59	5.00E-05
<i>Gbp5</i>	8.63	34.74	2.01	3.95E-03
<i>Gem</i>	41.60	6.07	-2.78	2.85E-03	.	.	Yes	.
<i>Gm14446</i>	12.39	53.81	2.12	2.60E-03
<i>Gm4951</i>	36.64	108.71	1.57	6.40E-03
<i>Gtpbp2</i>	16.96	59.18	1.80	3.30E-03
<i>Hmgb2</i>	183.30	43.86	-2.06	3.50E-04
<i>Hmmr</i>	17.90	3.84	-2.22	7.40E-03
<i>Ifi44</i>	42.99	124.35	1.53	6.20E-03
<i>Ifit1</i>	86.74	316.50	1.87	1.20E-03
<i>Ifit2</i>	20.59	78.70	1.93	1.30E-03
<i>Ifit3</i>	18.18	99.50	2.45	3.50E-04
<i>Irf7</i>	209.04	559.91	1.42	6.30E-03
<i>Kif11</i>	15.29	1.29	-3.57	8.25E-03	Yes	Yes	Yes	.
<i>Kif15</i>	16.56	1.28	-3.69	7.65E-03
<i>Kif22</i>	73.33	8.93	-3.04	6.00E-04
<i>Kif23</i>	26.51	4.79	-2.47	4.40E-03
<i>Klf6</i>	12.41	48.77	1.97	1.35E-03
<i>Kpna2</i>	605.67	209.22	-1.53	4.80E-03
<i>Lig1</i>	111.57	38.99	-1.52	6.10E-03	Yes	Yes	.	Yes
<i>Mad2l1</i>	55.76	13.26	-2.07	4.50E-03	Yes	Yes	Yes	.
<i>Mcm10</i>	36.77	7.39	-2.31	1.05E-03	.	.	.	Yes
<i>Mcm5</i>	234.05	85.51	-1.45	6.25E-03	Yes	Yes	.	Yes
<i>Mki67</i>	13.40	1.98	-2.76	7.50E-04
<i>Nasp</i>	105.20	35.94	-1.55	6.60E-03	Yes	.	.	Yes
<i>Ncapd2</i>	43.20	11.56	-1.90	1.85E-03	Yes	Yes	Yes	.
<i>Ncaph</i>	44.30	5.00	-3.15	1.55E-03	Yes	Yes	Yes	.

<i>Ndc80</i>	33.85	4.45	-2.93	7.05E-03	Yes	Yes	Yes	.
<i>Neat1</i>	19.35	78.19	2.01	1.45E-03
<i>Nrm</i>	89.90	21.18	-2.09	2.40E-03
<i>Nt5dc2</i>	6.39	0.49	-3.70	5.00E-03
<i>Nuf2</i>	28.02	3.23	-3.12	7.10E-03	Yes	Yes	Yes	.
<i>Nupr1</i>	268.48	1151.23	2.10	6.00E-04
<i>Nusap1</i>	31.42	2.23	-3.82	7.95E-03	Yes	Yes	Yes	.
<i>Pbk</i>	106.52	7.40	-3.85	6.50E-04
<i>Plk1</i>	36.19	5.34	-2.76	4.25E-03	Yes	Yes	Yes	.
<i>Pole</i>	13.70	3.60	-1.93	5.05E-03	.	.	.	Yes
<i>Ppil1</i>	254.60	87.99	-1.53	6.25E-03
<i>Prc1</i>	60.00	6.76	-3.15	2.00E-04	Yes	Yes	.	.
<i>Prim2</i>	64.34	14.37	-2.16	2.00E-03	.	.	.	Yes
<i>Rad51</i>	42.01	7.97	-2.40	5.20E-03
<i>Rad51ap1</i>	46.18	8.36	-2.47	4.15E-03
<i>Rgs1</i>	33.71	223.33	2.73	5.00E-05
<i>Rrm1</i>	210.45	46.75	-2.17	1.50E-04	.	.	.	Yes
<i>Rrm2</i>	262.61	31.81	-3.05	5.00E-05	.	.	.	Yes
<i>Rsad2</i>	20.54	74.52	1.86	2.30E-03
<i>Sgol1</i>	23.16	2.09	-3.47	4.40E-03	Yes	Yes	Yes	.
<i>Shcbp1</i>	29.22	3.38	-3.11	6.15E-03
<i>Slc2a6</i>	12.89	66.00	2.36	8.50E-04
<i>Slfn9</i>	28.58	5.68	-2.33	3.45E-03
<i>Spc24</i>	83.91	9.32	-3.17	1.45E-03	Yes	Yes	Yes	.
<i>Spc25</i>	48.82	11.41	-2.10	9.25E-03	Yes	Yes	Yes	.
<i>Sqstm1</i>	40.95	122.18	1.58	8.25E-03
<i>Stat2</i>	34.96	111.39	1.67	2.20E-03
<i>Stmn1</i>	1030.30	331.89	-1.63	1.85E-03
<i>Tacc3</i>	60.75	11.02	-2.46	4.50E-04
<i>Tgtp2</i>	27.65	104.39	1.92	7.50E-04
<i>Tk1</i>	190.40	14.25	-3.74	5.00E-05	.	.	.	Yes
<i>Tmem106a</i>	14.71	56.00	1.93	5.60E-03
<i>Tnfrsf11b</i>	16.33	73.51	2.17	1.15E-03

<i>Top2a</i>	142.55	16.21	-3.14	5.00E-05
<i>Tpx2</i>	30.85	4.34	-2.83	9.00E-04	Yes	Yes	Yes	.
<i>Traf1</i>	15.66	58.16	1.89	4.95E-03
<i>Trib3</i>	12.20	138.07	3.50	1.00E-04
<i>Trim30d</i>	7.30	25.64	1.81	8.00E-03
<i>Tsc22d3</i>	22.00	75.92	1.79	4.80E-03
<i>Tubg1</i>	109.33	32.08	-1.77	4.05E-03
<i>Tyms</i>	64.34	16.17	-1.99	8.50E-04
<i>Uhrf1</i>	163.18	50.93	-1.68	1.20E-03	Yes	.	.	.
<i>Zfp948</i>	24.78	81.04	1.71	6.00E-03

表 6. -Cys 培養液で培養した CD34⁺KSL 細胞において発現量に差の認められる遺伝子

Gene	Complete	-Cys	log(FC)	p-value	cell cycle	cell division	mitosis	DNA replication
<i>2210403K04Rik</i>	7.61	75.09	3.30	3.75E-03
<i>2700007P21Rik</i>	39.85	129.78	1.70	8.95E-03
<i>Aarsd1</i>	134.27	36.33	-1.89	9.20E-03
<i>Acot2</i>	15.20	67.37	2.15	6.50E-03
<i>Anxa5</i>	153.41	491.13	1.68	8.55E-03
<i>Aqp9</i>	40.68	163.96	2.01	3.10E-03
<i>Asf1b</i>	98.01	13.21	-2.89	2.95E-03
<i>Ccl4</i>	332.48	1435.54	2.11	1.85E-03
<i>Ccnf</i>	31.62	3.08	-3.36	8.65E-03	Yes	Yes	Yes	.
<i>Cdc6</i>	67.16	8.24	-3.03	2.00E-04	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Cdca2</i>	19.61	1.63	-3.59	9.30E-03	Yes	Yes	Yes	.
<i>Cdca8</i>	106.18	9.61	-3.47	2.50E-03	Yes	Yes	Yes	.
<i>Cdk1</i>	45.21	3.13	-3.85	5.15E-03	Yes	Yes	Yes	.
<i>Cdkn1a</i>	36.93	156.82	2.09	2.40E-03	Yes	.	.	.
<i>Cks1b</i>	213.94	36.55	-2.55	5.20E-03	Yes	Yes	.	.
<i>Cxcl2</i>	18.94	162.99	3.11	9.50E-04
<i>Cyth4</i>	17.23	66.40	1.95	8.50E-03
<i>Dtl</i>	39.99	8.47	-2.24	5.35E-03	.	.	.	Yes
<i>Exo1</i>	17.15	2.47	-2.80	6.40E-03
<i>Fcer2a</i>	43.88	181.24	2.05	1.70E-03
<i>Fen1</i>	257.16	67.39	-1.93	3.35E-03	.	.	.	Yes
<i>Figl1</i>	107.02	16.79	-2.67	1.00E-04
<i>Gatm</i>	71.23	11.60	-2.62	1.80E-03
<i>Gm12250</i>	122.55	32.60	-1.91	3.30E-03
<i>Gmnn</i>	114.59	16.92	-2.76	6.55E-03	Yes	.	.	.
<i>Hmgb2</i>	183.73	29.86	-2.62	3.00E-04
<i>Hmox1</i>	65.42	410.74	2.65	1.00E-04
<i>Kdm6b</i>	8.58	31.20	1.86	5.25E-03
<i>Klf6</i>	12.44	73.47	2.56	7.50E-04

<i>Lig1</i>	111.83	17.48	-2.68	1.50E-04	Yes	Yes	.	Yes
<i>Mcm5</i>	234.59	60.22	-1.96	2.40E-03	Yes	Yes	.	Yes
<i>Mcm7</i>	319.45	93.29	-1.78	4.70E-03	Yes	.	.	Yes
<i>Mki67</i>	13.43	1.87	-2.85	3.35E-03
<i>Nasp</i>	105.44	29.19	-1.85	6.40E-03	Yes	.	.	Yes
<i>Ncapd2</i>	43.31	6.34	-2.77	1.55E-03	Yes	Yes	Yes	.
<i>Ncapd3</i>	30.62	7.96	-1.94	8.75E-03	Yes	Yes	Yes	.
<i>Ncaph</i>	44.40	5.49	-3.02	4.55E-03	Yes	Yes	Yes	.
<i>Neat1</i>	19.39	139.16	2.84	5.00E-05
<i>Nrm</i>	90.11	12.74	-2.82	7.65E-03
<i>Nupr1</i>	269.11	879.17	1.71	8.05E-03
<i>Orc6</i>	105.12	25.83	-2.03	5.85E-03	.	.	.	Yes
<i>Pcp4l1</i>	57.67	189.91	1.72	7.80E-03
<i>Pik3ap1</i>	42.90	164.69	1.94	3.35E-03
<i>Plek</i>	43.29	163.15	1.91	3.30E-03
<i>Plk2</i>	2.98	43.95	3.88	4.60E-03
<i>Pmf1</i>	151.64	25.65	-2.56	4.80E-03	Yes	Yes	Yes	.
<i>Pole</i>	13.73	1.12	-3.62	4.70E-03	.	.	.	Yes
<i>Prim1</i>	94.83	14.76	-2.68	3.95E-03	.	.	.	Yes
<i>Prr13</i>	535.60	2126.28	1.99	3.90E-03
<i>Ptgs2</i>	13.27	58.67	2.14	1.75E-03
<i>Rad51</i>	42.11	3.69	-3.51	9.65E-03
<i>Rgs1</i>	33.79	150.46	2.15	3.80E-03
<i>Rpa2</i>	148.80	37.29	-2.00	3.90E-03	.	.	.	Yes
<i>Rrm1</i>	210.94	50.46	-2.06	1.60E-03	.	.	.	Yes
<i>Rrm2</i>	263.22	20.16	-3.71	5.00E-05	.	.	.	Yes
<i>Sat1</i>	77.65	321.71	2.05	3.70E-03
<i>Skil</i>	6.82	25.73	1.92	9.00E-03
<i>Slc40a1</i>	3.37	30.13	3.16	4.80E-03
<i>Slc7a11</i>	2.11	29.25	3.79	5.00E-04
<i>Slfn9</i>	28.65	2.93	-3.29	3.25E-03
<i>Smc2</i>	34.50	8.71	-1.99	7.30E-03	Yes	Yes	Yes	.
<i>Spc24</i>	84.11	7.79	-3.43	7.40E-03	Yes	Yes	Yes	.

<i>Sqstm1</i>	41.04	173.43	2.08	2.55E-03
<i>Stmn1</i>	1032.70	201.40	-2.36	4.00E-04
<i>Tacc3</i>	60.89	4.17	-3.87	4.00E-03
<i>Tinagl1</i>	9.85	55.37	2.49	6.05E-03
<i>Tnfrsf11b</i>	16.37	63.44	1.95	8.00E-03
<i>Top2a</i>	142.88	9.72	-3.88	5.00E-05
<i>Tpx2</i>	30.92	2.40	-3.69	2.95E-03	Yes	Yes	Yes	.
<i>Traf1</i>	15.69	68.38	2.12	8.20E-03
<i>Trib3</i>	12.23	90.44	2.89	2.40E-03
<i>Tuba1b</i>	457.00	141.39	-1.69	9.25E-03
<i>Tubg1</i>	109.58	23.69	-2.21	5.55E-03
<i>Tyms</i>	64.49	11.58	-2.48	1.55E-03
<i>Uhrf1</i>	163.57	32.65	-2.32	4.00E-04	Yes	.	.	.
<i>Vmp1</i>	218.89	788.56	1.85	3.50E-03
<i>Zfp948</i>	24.84	112.28	2.18	1.70E-03

IX 謝辞

本研究を進めるにあたり、終始親身なご指導ご鞭撻を賜りました、東京大学医科学研究所幹細胞治療分野の中内 啓光教授に謹んで感謝の意を表します。日々の実験を行うにあたり、親身なご指導や貴重なご助言を賜りました、東京大学医科学研究所幹細胞治療分野の山崎 聡博士に深く感謝申し上げます。

本研究における病理学的な解析では、東京大学医科学研究所附属病院病理部の大田 泰徳博士に多くのご支援、ご指導を頂きました。RNA シークエンスでは、理化学研究所統合生命医科学研究センターの遠藤 高帆博士に技術的指導を賜りました。また、FACS 解析では、東京大学医科学研究所幹細胞治療センターの山崎 祐治氏、石井 有実子氏に多くのご支援を頂きました。本研究はこれらの貴重な技術、ご支援がなければ成し得なかったものであり、深く感謝いたします。

日常の議論を通じて多くの貴重なご意見や実験技術指導を賜りました、東京大学医科学研究所幹細胞治療分野の葛西 正孝博士、渡辺 素生博士、大津 真博士、渡会 浩志博士、石田 礼子氏、石田 隆氏、塚田 端夫氏、金澤 彩乃氏、研究生活全般にわたりご協力、ご支援をいただきました津久井 弘子氏、岡田 京子氏をはじめ研究室の皆様に心より感謝いたします。