

論文の内容の要旨

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

〈背景〉

造血幹細胞 (hematopoietic stem cell : HSC) は、自己複製能と多分化能を持ち、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で存在している。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。この約 10 年間で HSC の恒常性を維持する機構として、様々なニッチ構成細胞、HSC を支持する因子、解糖系や脂肪酸代謝などの代謝経路の関与が報告されてきたが、未だ不明な点が多く、特にアミノ酸と HSC についての報告は非常に少ない。

生体内の 20 種類あるアミノ酸は恒常性を保つために最も重要な因子の一つであり、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ることが知られている。1946 年、Arthur Kornberg 博士がラットに低タンパク質の飼料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の表現系が改善することを報告した。こ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。

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放射線照射や大量抗がん剤の投与が行われているが、この前処置による急性期の臓器障害により、移植治療の適応となる患者の数は限られてきた。また、特に若年者では二次性発癌、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。

〈目的〉

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、アミノ酸濃度の制御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。

〈方法〉

血清、骨髄中のアミノ酸濃度とその分布を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と飛行時間型二次イオン質量分析法 (TOF-SIMS) で解析した。HSC における必須アミノ酸を調べるために、

20 種類あるアミノ酸から 1 種類を欠損した培養液を作成した。各培養液で stem cell factor と thrombopoietin の存在下、1 週間無血清培養した HSC の細胞数で増殖能を評価し、その細胞を致死的な放射線照射したマウスへ移植することで長期骨髄再構築能について解析した。また、培養細胞における ROS (reactive oxygen species) 活性を 2',7'-dichlorofluorescein diacetate を用いて測定した。各培養液で 24 時間培養した HSC の遺伝子発現は、RNA シークエンスによって比較した。次に、in vivo 解析のために 1 種類のアミノ酸を欠損した人工飼料を作成し、一定期間飼育したマウスの末梢血および骨髄における HSC をはじめとする様々な血球細胞分画の解析を全血球計算および FACS で行った。また、全身臓器への影響を hematoxylin-eosin 染色で病理組織学的に評価した。ニッチ構成細胞からの分泌アミノ酸を測定するために、各細胞を 3 日間アミノ酸欠損培養液で培養後、上清を HPLC で測定した。非放射線照射骨髄移植は、2-3 週間-Val 飼料で飼育したレシピエントマウスに正常のマウス骨髄細胞または造血幹・前駆細胞を移植し、同時に-Val 飼料から complete 飼料に変更することでを行い、ドナー細胞が生着するかを長期的に解析した。

〈結果〉

骨髄のアミノ酸環境が末梢血と異なっているかを調べるため、血清と骨髄液中に含まれる遊離アミノ酸の濃度を比較した。骨髄中のアミノ酸濃度は血清よりもはるかに高く、構成する各アミノ酸の割合も異なっていた。次に骨髄で個々のアミノ酸がどのように分布しているのかを調べたところ、多くのアミノ酸は均一に分布する中、C4H10N⁺イオン種は特定の部位に局在していることが認められた。

HSC における必須アミノ酸を調べるために、マウスの HSC 分画である CD34⁺KSL (c-kit⁺, Sca-1⁺, Lineage⁻) 細胞を 1 種類のアミノ酸を欠損させた培養液で 1 週間培養して増殖能を評価した。システイン (-Cys)、バリン (-Val) 欠損培養液において HSC の増殖は阻害された。これらの培養細胞を致死的な放射線照射したマウスへ競合細胞と共に移植し、長期的に末梢血のドナー細胞キメリズムを評価したところ、やはり-Cys と-Val 培養液で培養した HSC は生着しなかった。また、造血前駆細胞 (CD34⁺KSL) における増殖能を調べたところ、-Cys、-Lys 培養液において著明な増殖の抑制を認めたが、-Val 培養液では HSC ほどの抑制を認めなかった。次に、-Cys、-Val 培養液における増殖抑制の原因を解析するために、造血幹・前駆細胞である KSL 細胞における ROS 活性を測定した。-Cys で著明な ROS の上昇を認めたが、-Val では上昇していなかった。そこで、抗酸化物質である n-acetyl cysteine (NAC) を加えて HSC を培養したところ、-Cys において増殖抑制が救援された。さらに、これらの培養液で 24 時間培養した HSC の遺伝子発現を RNA シークエンスで解析したところ、コントロール培養液と比較して cell cycle, mitosis, cell division, DNA replication の遺伝子セットの発現が低下していた。

in vivo における造血への影響を調べるために、人工的に合成した complete、バリン欠損 (-Val)、シスチン欠損飼料を作成し、各飼料で 4 週間飼育したマウスの骨髄中の CD34⁺KSL 細胞の割合、末梢の白血球数を測定したところ、-Val 群でのみ有意に低下していた。シスチンは非必須アミノ酸であることから、体内で欠乏を代償されたと考えられ、以後-Val 飼料に焦点を当てて解析を行

った。-Val 飼料で飼育したマウスの経時的な解析を行ったところ、末梢血において白血球、赤血球数は減少していたが血小板数は変わらなかった。CD34⁺KSL とは別の HSC 分画である CD150⁺CD41⁺CD48⁺KSL 細胞の骨髄における経時的な解析でも、-Val 群で HSC の割合は低下していることが確認された。また、CD34⁺KSL 細胞の細胞周期解析では、G0 期の細胞の割合は complete 群と変わらなかった。造血前駆細胞の解析では、common myeloid progenitor cells (CMP) の割合が減少していたが、granulocyte / monocyte progenitor cells (GMP)、megakaryocyte / erythroid progenitor cells (MEP) の割合には差がなかった。さらに、バリン欠乏環境における HSC の機能を調べるために、-Val 飼料と complete 飼料で飼育したマウスそれぞれの骨髄を用いた競合的骨髄再構築法を行い、移植後のドナー細胞のキメリズムを評価した。移植後 1、2 か月まではキメリズムは変わらなかったが、3 か月目に -Val 群でキメリズムは劇的に低下した。

次に、-Val 飼料で飼育したマウスのすべての臓器について病理組織学的な解析を行った。骨髄は細胞数の低下・細胞密度の減少を認め、脾臓は重量が減少して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。胸腺も著明に萎縮し、皮髄境界が不明瞭になっていた。それ以外の臓器では、毛包数の減少、平滑筋細胞の萎縮、褐色脂肪細胞の増加、小腸絨毛の伸長・菲薄下などの変化が認められたが、致死的な異常所見は認めなかった。また、-Val 飼料開始と共に徐々に体重は減少したが、complete 飼料へ戻すと速やかに体重は回復し、萎縮していた胸腺、脾臓も元の大きさに戻ることが確認された。しかし、長期間バリン欠損飼料で飼育したマウスの約半数では、通常飼料に戻すと数日で re-feeding 症候群様の肺水腫をきたして死亡した。

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重要であると考えられる。骨髄ニッチ内でどの細胞がバリンを供給しているのか調べたところ、血管内皮細胞、間葉系幹細胞で主にその分泌が確認された。

最後に、骨髄移植の前処置として放射線照射せずにバリン欠損飼料のみを与えることで移植が成立するか、C57BL/6 (B6) から B6 へ移植する自家移植の系と B6 から NOD/scid へ移植する同種移植の系で検討した。自家移植では、移植後 12 週間で 40%のマウスにドナー細胞が生着し、骨髄系、T、B リンパ球系の 3 系統の出現を認めた。同種移植では全てのマウスでドナー細胞は生着し、NOD/scid マウス体内でリンパ球の再構成を認めたが、移植片対宿主病様の症状が出現した。

〈考察〉

今回の研究では造血にアミノ酸環境が非常に重要であることを示した。これまで、他の幹細胞では、マウス胚性幹細胞でトレオニン、ヒト胚性幹細胞や人工多能性幹細胞でメチオニンが重要であると報告されている。

TOF-SIMS で特徴的な分布をした C4H10N⁺イオン種に相当するアミノ酸はバリンである。バリンはニッチ構成成分の一つである血管の平滑筋に多く含まれるとされ、骨髄ニッチとの関連が示唆される。

NAC によって -Cys 条件の HSC が救援され、-Val では救援できなかったことは、HSC におけ

る2つのアミノ酸の代謝過程が異なっていることを示している。分枝鎖アミノ酸のバリン、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が、何故 HSC の維持にバリンが重要であるかは依然不明である。これらのアミノ酸は共通の輸送体で細胞内に取り込まれるが、HSC 特異的な輸送体の報告はこれまでにほとんどない。一度に採取できる HSC の数に制限があることから、 ^{13}C 代謝フラックス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。

バリン欠乏環境が HSC に高い特異性があることを示す証拠として、-Val 飼料を与えたマウスでは血小板の数が減少していないことが挙げられる。骨髄中の $\text{CD150}^+\text{CD41}^+\text{KSL}$ 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と定義され、今回の -Val 条件下ではこの分画が維持されていたため血小板数は減少しなかったと考えられる。

バリン欠乏による障害は造血系組織に顕著に現れるが、それ以外の臓器に致死的な変化は認めず、通常飼料に戻すことで速やかに回復する。これまで、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したマウスモデルの報告があるが、本研究でバリン欠損食餌療法でも容易に移植の前処置が可能になることが示された。

また、HSC と骨髄ニッチの相互作用と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、マウス白血病細胞株を -Val 培地で培養すると caspase-3 の活性化を介してアポトーシスするという報告、間葉系間質細胞がシスチン輸送体 Xc で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リンパ性白血病細胞へ渡すことで、腫瘍細胞内でグルタチオンを産生して ROS から身を守るという報告などがある。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を進めることで、HSC と同様に白血病や他の癌幹細胞でも新しい治療方法となることが期待される。