

## 「正常造血幹細胞および白血病幹細胞の単一細胞レベルの代謝多様性の同定と制御機構解明」

国立国際医療研究センター研究所 プロジェクト長

田久保 圭誉

### 要旨

現在の代謝プロファイリング技術では造血幹細胞のような少数細胞の代謝変化の経時的な追跡は困難である。そこで本課題では、アデノシン三リン酸 (ATP) の単一細胞定量的リアルタイム解析システムを確立・活用して、造血幹細胞における定常状態とストレス状態の間の解糖系代謝の違いとその制御機構を解明することを目的として研究した。ATP 濃度のリアルタイム測定により、増殖ストレスまたは OXPHOS 阻害で、解糖系活性を制御する酵素 PFKFB3 の活性が、ATP 要求量を満たすために数秒以内に上昇し、解糖が促進されることが示された。さらに、PFKFB3 はそれぞれのストレスでメチル化とリン酸化という異なる修飾によって活性化されることを同定した。Pfkfb3 遺伝子の過剰発現は造血幹細胞の増殖と分化細胞の産生を促進したが、Pfkfb3 の阻害・欠損はそれらを抑制した。また、本法を活用して造血幹細胞における解糖系の準備期と報酬期の意義も明らかとなった。これら結果は、ストレス下で造血を維持するための造血幹細胞の代謝の柔軟で重層的な制御を明らかにし、希少造血細胞の代謝特性と意義を深く理解するための手法を提供するものである。

### 背景・目的

細胞が生存しながら各種のイベント (運動・増殖等) を実行する際は、エネルギー通貨 ATP が消費される。すなわち、細胞活動の維持には ATP の適切な産生・消費のバランスが保たれることが肝要である。近年、エネルギー代謝バランスが組織幹細胞の運命決定に重要であることが知られるようになり、「幹細胞代謝学」という新たな融合領域が勃興している。申請者はこれと軌を一にして、骨髄に住まう造血幹細胞を制御する微小環境(ニッチ)因子として、骨髄内の低い酸素分圧が重要で、エネルギー代謝調節を通じて幹細胞性を維持し造血恒常性を保つことを報告してきた<sup>1,2</sup>。

本研究ではこの次のステップとして、血液細胞の単一細胞リアルタイム ATP 濃度解析技術を開発し、これを造血幹細胞と白血病幹細胞の代謝特性解析へ適用する。これまでの、申請者自身のものも含む既存の幹細胞代謝研究においては、特定の代謝酵素のノックアウトマウス由来の幹細胞の解析や、組織細胞から抽出した ATP を含む各種代謝物「量」のプロファイリングが中心的研究手法であった。これらに基づいて代謝経路や代謝物の組織幹細胞制御における意義や機能の解析が進んできた。しかし、これら既存研究手法には限界があり、代謝経路に特有の高度の可塑性や、各細胞の代謝物量の個性やばらつきは無視される。また、測定で細胞は失われるため、代謝物の時間変化は計測できない。スループット性や感度も低く、造血幹細胞のように希少な細胞分画の解析は困難である。さらに、代謝物は細胞内の「濃度」が重要であるが、造血幹細胞や白血病幹細胞内の ATP 濃度は全く不明である。これらの結果、「造

血幹細胞と白血病幹細胞の ATP 濃度の細胞間多様性や制御機構、それらの本質的な意義は何であるか」という根源的な問いは未だ放置されている。そこで本研究では、ATP バイオセンサー搭載血液細胞を用いた、単一血液細胞の ATP 濃度・量のリアルタイム測定技術を確立して、造血幹細胞と白血病幹細胞の代謝解析を実施してこの問いに答え、造血器腫瘍の治療標的候補も得るべく研究を実施した。

## 方法

本研究では FRET 型 ATP プローブ・GO-ATeam2 を発現するマウスモデル (GO-ATeam2 マウス) を活用して、単一細胞リアルタイム ATP 濃度解析技術を開発し活用した。遺伝子組み換え実験・動物実験については所属機関内の承認を得たうえで関連法令等を遵守して実施した。

ジェノタイプリング: GO-ATeam2 マウスの遺伝子型判定は、尾 DNA のゲノム PCR または経皮的に GFP 蛍光を確認することによって行った。

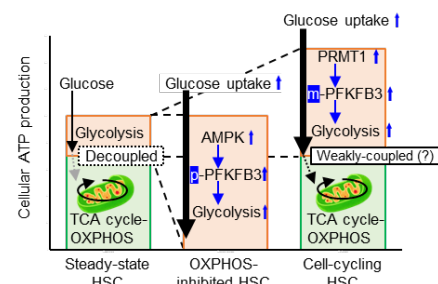
細胞調製: GO-ATeam2 マウスの骨髄は PBS+0.1%BSA でフラッシュし、培地に汎用される血清が含有する多量の栄養素への曝露を最小限にした。

リアルタイム ATP 解析: 表面マーカーを染色した GO-ATeam2 マウス由来の骨髄単核球を、最小限の塩、ビタミン、緩衝液 (HEPES および炭酸水素ナトリウム) を含み、グルコースやミトコンドリア基質は含まない培地に分注し、FRET/EGFP 比をフローサイトメーターを用いてリアルタイムで解析した。目的に応じて、様々な栄養素や代謝調節物質の存在下または非存在下で実験を行った。骨髄単核球の ATP 濃度を安定化させるため、低酸素である骨髄環境を模倣して培地を 1%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>/94%N<sub>2</sub> であらかじめ飽和させた (培地をあらかじめ飽和させない場合、グルコース、ピルビン酸、または乳酸の存在下でも、ATP 濃度は急速に低下した)。フローサイトメーターで解析されたデータから解析対象の細胞分画の単一細胞の FRET/EGFP 比を取得し、ATP 濃度に変換した。

## 結果

(i) 体外で ATP 濃度を維持できる条件の確立と ATP 濃度・量の定量測定系の確立: 生きた造血幹細胞の ATP 濃度を測定するためには、体内同様の ATP 濃度を維持することが必要であった。体外で通常の酸素分圧・血清濃度・サイトカイン濃度で造血幹細胞を培養すると、ATP が速やかに低下・枯渇することを見出した。そこで低酸素である骨髄環境を模倣して培地を 1%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>/94%N<sub>2</sub> であらかじめ飽和させた培地を用いて解析することで安定したリアルタイム ATP 解析が可能となった。この条件で様々な代謝物や栄養素等に曝露して骨髄細胞をフローサイトメーターで FRET 値を得て ATP 濃度に変換することで造血幹細胞レベルの ATP 濃度の動態が解析可能となった。フローサイトメーターで細胞の大きさを測定し、細胞の体積を算出したうえで、単一細胞ごとの ATP 量も測定することが可能であった。

(ii) 骨髄の造血幹細胞のストレス負荷時の変化とその責任分子機構: このリアルタイム ATP 解析を活用して、増殖ストレス (抗がん剤 5-FU 投与による) やミトコンドリア代謝ストレス (オリゴマイシン曝露による) によって生じる変化を解析したところ、解糖系の加速が認められた。また、その分子機構として解糖系の律速反応 PFK を活性化する分子・PFKFB3 の活性化が生じることを見出し



た。増殖ストレスでは PRMT1 を介したメチル化が、代謝ストレスでは AMPK を介したリン酸化が生じていることも確認した(図)。

(iii) 造血幹細胞のストレス負荷による代謝変化のストレス造血における意義：同定した PFKFB3 を介した代謝変化が造血幹細胞のストレス応答で果たす役割を検討するために、恒常活性化型 PFKFB3 の過剰発現実験と、造血幹細胞に至適化した CRISPR/Cas9 を用いた PFKFB3 の阻害あるいはノックアウト

図：PFKFB3によるストレスを受けた造血幹細胞の代謝リプログラミング

実験を実施した。その結果、Pfkfb3 遺伝子の過剰発現は造血幹細胞の増殖と分化血液細胞の産生とを促進した一方、Pfkfb3 の阻害・欠損は造血幹細胞の増殖および分化血液細胞産生を抑制した。

(iv) 造血幹細胞における解糖系の準備期と報酬期の機能の違いの検討：解糖系は準備期と報酬期とに分けられるがその意義は未確定であった。準備期の酵素グルコース-6-リン酸イソメラーゼ (Gpi1) と報酬期の酵素グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (Gapdh) の機能をリアルタイム ATP 解析も活用して検討した。Gapdh を欠損した増殖状態の造血幹細胞では、幹細胞機能と生存が損なわれていた。対照的に、Gapdh や Gpi1 が編集された静止状態の造血幹細胞では、細胞の生存が維持されていた。Gapdh あるいは Gpi1 を欠損した静止期造血幹細胞は、ミトコンドリアの酸化的リン酸化 (OXPHOS) を増加させることによって ATP レベルを維持したが、Gapdh を欠損した増殖性造血幹細胞では ATP レベルが減少した。一方、Gpi1 を欠損増殖性造血幹細胞は、OXPHOS の増加とは無関係に ATP レベルを維持していた。トランスケターゼ阻害剤であるオキシチアミンが Gpi1 を欠損した造血幹細胞の増殖を阻害したことから、非酸化的ペントースリン酸経路 (PPP) が Gpi1 欠損造血幹細胞における解糖系フラックスを維持する代償経路であることが示唆された。また、増殖中の造血幹細胞では、非酸化的 PPP が解糖の準備期の欠損を補うが、報酬期の欠損は補えないことが示唆された。

## 考察

本研究から、造血幹細胞を含む稀少な血液細胞の代謝特性を高感度に解析するプラットフォームを確立することができた。また、本プラットフォームを活用して、造血幹細胞の代謝可塑性はストレスの種類によって異なる PFKFB3 の活性化を引き起こされることが示された。増殖ストレスと代謝ストレスでそれぞれ生じるメチル化・リン酸化という 2 つの PFKFB3 タンパク質の修飾により、同時かつ異なるストレス下でも、解糖による ATP 産生を柔軟に制御することができると考えられた。実際、OXPHOS 阻害に応答するリン酸化を模倣するように設計された恒常活性化型 PFKFB3 変異体は、移植後の造血幹細胞再構成能力を増強した。この結果からは、PFKFB3 があるストレス (例えば増殖ストレス) によって活性化されても、異なるストレス (代謝ストレス) に応答する能力を有していることを示唆している。その結果、造血幹細胞は非常にダイナミックな解糖系の活性化能を有すると考えられた。これらを標的とした介入を行うことで、ストレス造血を効果的に誘導または管理できる可能性がある。また、本プラットフォームを活用することで従来その意義の解析が困難であった解糖系の準備期と報酬期の検討が可能であった。我々のアプローチは、今回検討したような急性のストレス応答以外の造血幹細胞の代謝応答の解析を可能にするのみならず、造血幹細胞以外の希少細胞における代謝プログラムの解析や、多様な細胞集団における様々な代謝活性の検出を可能にし、正常および疾患状態における様々な組織系の解析に応用できると考えられた。なお、本研究提案で当初計画していた白血病幹細胞における代謝解析も期間内に予備検討を終えており、代謝に着目した造血器腫瘍の頑健性と脆弱性の検討に活用されることが期待される。

## 共同研究者

綿貫 慎太郎	国立国際医療研究センター研究所・特任研究員
玉置 親平	国立国際医療研究センター研究所・研究員
小林 央	国立国際医療研究センター研究所・上級研究員
森川 隆之	国立国際医療研究センター研究所・研究員
城下 郊平	国立国際医療研究センター研究所・客員研究員
山本 正道	国立循環器病研究センター研究所・特任部長

## 引用論文

<p>[1] Takubo K, Nagamatsu G, Kobayashi CI, et al. Regulation of glycolysis by Pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells. <i>Cell Stem Cell</i>. 2013. 12:49-61.</p> <p>[2] Kobayashi H, Morikawa T, Okinaga A, et al. Environmental Optimization Enables Maintenance of Quiescent Hematopoietic Stem Cells Ex Vivo. <i>Cell Rep</i>. 2019. 28:145-158.e9.</p>
--

## 助成研究に関連した発表論文

<ol style="list-style-type: none"><li>1. Watanuki S, Kobayashi H, Sugiura Y, Yamamoto M, Karigane D, Shiroshita K, Sorimachi Y, Fujita S, Morikawa T, Koide S, Oshima M, Nishiyama A, Murakami K, Haraguchi M, Tamaki Shinpei S, Yamamoto T, Yabushita T, Tanaka Y, Nagamatsu G, Honda H, Okamoto S, Goda N, Tamura T, Nakamura-Ishizu A, Suematsu M, Iwama A, Suda T, <b>Takubo K</b>. Context-Dependent Modification of PFKFB3 in Hematopoietic Stem Cells Promotes Anaerobic Glycolysis and Ensures Stress Hematopoiesis <i>eLife</i>. in press</li><li>2. <b>Takubo K</b>, Htun PW, Ueda T, Sera Y, Iwasaki M, Koizumi M, Shiroshita K, Kobayashi H, Haraguchi M, Watanuki S, Honda ZI, Yamasaki N, Nakamura-Ishizu A, Arai F, Motoyama N, Hatta T, Natsume T, Suda T, Honda H. MBTD1 preserves adult hematopoietic stem cell pool size and function. <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i>. 2023 Aug 8;120(32):e2206860120. doi: 10.1073/pnas.2206860120. Epub 2023 Jul 31.</li><li>3. Shiroshita K, Kobayashi H, Watanuki S, Karigane D, Sorimachi Y, Tamaki S, Haraguchi M, Yamamoto M, Nakamura-Ishizu A, Okamoto S, Kataoka K, <b>Takubo K</b>. Distinct roles of the preparatory and payoff phases of glycolysis in hematopoietic stem cells. <i>Exp Hematol</i>. 2023 Aug;124:56-67. doi: 10.1016/j.exphem.2023.06.003. Epub 2023 Jun 18.</li><li>4. Shiroshita K, Kobayashi H, <b>Takubo K</b>. Evaluating the function of murine quiescent hematopoietic stem cells following non-homologous end joining-based genome editing. <i>STAR Protoc</i>. 2023 Jun 9;4(2):102347. doi: 10.1016/j.xpro.2023.102347.</li></ol>
--