

「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」

平成 17 年度採択研究代表者

平尾 敦

(金沢大学がん研究所 教授)

「代謝解析による幹細胞制御機構の解明」

## 1. 研究実施の概要

正常の組織幹細胞とは、各組織あるいは細胞の源となる細胞であり、多系統の細胞に分化する多分化能と幹細胞を再び作る自己複製能を持つ細胞と定義される細胞である。それぞれの組織においては、常に幹細胞から新しい細胞の供給を受けることによって、細胞の置き換えが起こり、組織としての機能を維持することができる。幹細胞システムが個体の生涯にわたって、機能し続けるためには自己複製能を適切に制御する必要がある。幹細胞システムを理解し、適正に制御する技術を開発することは、再生医療における技術向上において重要な課題である。一方、最近、がん組織の中にも、幹細胞的な役割を持つ“がん幹細胞”の存在が示唆され、がんの治療法開発に向けた新たな標的細胞として注目されている。本研究においては、幹細胞の制御機構を代謝制御の観点からアプローチし、理解しようとするものである。

本研究を遂行するため、各種幹細胞の動態、特性を理解し、細胞内のいかなる代謝経路を重点的に検討するか見極めることが重要である。その観点から、昨年度は幹細胞の活性酸素-p38MAPK 経路の重要性を明らかにした。この経路は細胞の老化・寿命制御因子のひとつとして考えられている。この知見から、他の老化・寿命制御因子の幹細胞制御における役割を明らかにする必要性を導き出した。細胞の老化現象は細胞内代謝の変動を伴うものであり、老化・寿命制御因子による幹細胞制御機構の解明に焦点をあてることは、代謝制御と幹細胞機能を結びつける大きな鍵になると考えられる。この概念に基づき、本年度は、線虫の寿命制御分子として知られる Daf-16 の哺乳動物におけるオルソログである FOXO の造血幹細胞制御における機能評価、ATM の他の組織幹細胞における役割、幹細胞の細胞老化におけるポリコーム遺伝子 Bmi-1 の役割、さらに神経幹細胞分化のシグナル制御の解明に取り組んだ。さらに、がん幹細胞制御への取り組みとして、脳腫瘍細胞株が幹細胞としての能力を得る状態における細胞内代謝産物の測定に取り組んだ。

## 2. 研究実施内容

### 平尾グループ

最近、線虫の長寿命変異種の解析によって、転写因子 **Daf-16** が寿命を制御していることが明らかにされてきた。この分子は、栄養飢餓状態において活性化し、ストレス抵抗性に重要な役割を果たし、線虫の寿命を保つのに貢献していると考えられている。哺乳動物においては、フォークヘッド転写因子 **FOXO** がその役割を果たし、代謝制御、細胞周期、アポトーシス、DNA 修復などに関与する多くの遺伝子の発現を制御する。また、血清除去のような一種の飢餓状態で活性化することも知られ、エネルギー環境のセンサーとして働いていることが示唆されている。そこで、本研究において、老化寿命制御因子としての **FOXO** の造血幹細胞における役割を明らかにすることを目的として取り組んだ。また、**FOXO** が栄養環境の変化に反応し、代謝制御を司る重要な分子であることから、いわゆる栄養環境と幹細胞の機能の関係を明らかにすることをねらいとした。

**FOXO3a** 欠損マウスは、雌が不妊であるものの、若いマウスは一見正常で、血液所見もほぼ正常である。ところが、欠損マウスの骨髄細胞を別のマウスに移植する、いわゆる骨髄移植を行うと、一見正常に生着しているように見えても、未分化な細胞集団の再生が低下していることが判明した。このことから、**FOXO3a** は、造血幹細胞の自己複製能に必須の機能を持つことが示唆された。そこで、マウスの造血幹細胞と知られている **CD34-KSL** 細胞を調べてみると、**FOXO3a** が幹細胞特異的に活性化していること、**FOXO3a** が欠損すると、造血幹細胞が **G0** 期に留まらず細胞周期に入ってしまうこと、それに伴い幹細胞の自己複製能が低下することが判明した。また、正常の幹細胞は、抗癌剤の投与のような外界からのストレスに抵抗性を示すのに対して、**FOXO3a** 欠損マウスで抵抗性が低下してしまうことも判明し、**FOXO3a** が幹細胞の再生能の維持機構に重要とされる細胞周期制御、ストレス応答制御に大きな役割を果たしていることを明らかにした。さらに加齢したマウスの造血幹細胞の集団を観察すると、コントロールマウスと比較し、幹細胞の頻度が減っていることを見いだした。このことから、**FOXO3a** は、長期間生体内で幹細胞プールを維持するのに必須であることが判明した。今後、**FOXO** の活性化が細胞内でいかに代謝を制御するのか、幹細胞機能のどの機能をいかに制御しているのかを理解するため、トランスクリプトームおよびメタボローム技術を使い詳細に検討する。このことによって、栄養状態、エネルギー環境という細胞内代謝に重要な制御因子がいかに幹細胞機能を制御しているかを理解し、将来、幹細胞機能の維持向上のための技術開発に寄与する知見を得ることを目指す。

がんにおける代謝制御を理解する上で、腫瘍細胞株とマウスがんモデルを中心に検討を進めた。幹細胞で発現の高い特定の遺伝子(非公開)を脳腫瘍細胞株に導入し、細胞内の代謝産物を測定したところ、細胞内で異常な代謝状態で生存していることが明らかとなった(合田グループの項参照)。この異常な代謝状態と非栄養状態でのがん細胞の生存との関係を明らかにすることが、がんの生き残り戦術の理解、さらにはがん治療へ結びつく手がかりになることが期待された。また、プライマリーの固形がんモデルとして脳腫瘍モデルの確立を行いつつあり、白血病とともにがん幹細胞研究のための基盤作りを行った。

## 須田グループ

組織幹細胞共通あるいは各組織幹細胞独自の代謝制御基盤を明らかにするために、精子幹細胞システムでの酸化ストレス制御機構の解析を試みた。精子幹細胞システムでは、移植系は確立されているものの、幹細胞分画を含む未分化型精原細胞の純化は不十分であった。そこで、細胞表面抗原の発現パターンをもとに、磁気ビーズによる分離とフローサイトメーターの2つの方法を組み合わせることにより、未分化型精原細胞を極めて高い純度(~98%)で濃縮することに成功した。これらの細胞は、Pyronin Y陰性のG0期にあり、造血系同様、細胞周期が静止状態にあることが明らかになった。この分画での酸化ストレス制御の重要性を解析するため、造血系でも用いた酸化ストレス制御に異常のあるATM欠損マウスの未分化型精原細胞分画の解析を行った。その結果、造血系同様、若年マウスでは異常がないものの、高齢になると未分化型精原細胞分画の喪失が認められた。そこで、造血系同様酸化ストレス制御の異常を疑い、マウスに抗酸化剤投与を行ったが精原細胞の喪失は回復しなかった。このことから、幹細胞システム間で異なる自己複製制御メカニズムが関与することが明らかになった。純化法を用いて詳細な検討を行った結果、精子幹細胞システムではDNA損傷応答の異常が精子幹細胞の自己複製維持に重要であることを見出した。これは、次世代にゲノム情報を正確に伝える役目をこなす精子幹細胞に特異的な制御機構と考えられ、我々の開発した未分化型精原細胞純化からのアプローチが精巣の幹細胞制御機構の解明に極めて有効な手法であることを示唆するものである。

## 合田グループ

本年度はこれまでに確立したCapillary Electrophoresis-Mass Spectrometry (CE-MS)を用いた全代謝解析を行うことで、幹細胞において特異的に発現調節されている遺伝子が“幹細胞らしさ”を維持する代謝経路の調節に関与している可能性について検討を行った。この目的のために、平尾グループにおいて未分化幹細胞で発現亢進している分子群の中からある特定の候補遺伝子Xを選択し、ラットglioma由来のC6細胞に遺伝子導入した。コントロールとしてGFP発現ベクターを導入した細胞を樹立した。これらの2つの細胞群における全代謝解析を行った。その結果、遺伝子X導入細胞では20種すべてのアミノ酸含量が低下することが明らかになった。一方、遺伝子Xの導入により細胞内乳酸含量の低下と軽度の細胞内エネルギー状態の低下を伴った糖代謝経路の抑制がみられた。これらの代謝変動は、変動した代謝産物の細胞内外の輸送動態を反映しているのかあるいは糖利用からタンパク分解によるエネルギー産生システムへの変換による可能性を示唆していると考えられる。

また、本年度は代謝動態をより詳細に解析するために、安定同位体を用いた解析システムの確立に取り組んだ。特に、未分化幹細胞が血流の少ない低酸素環境に存在することから、これら細胞におけるエネルギー代謝を解明するために、C<sup>13</sup>-glucose 負荷による細胞内代謝産物の経時的な変化を捉える条件の最適化を行い、少なくとも3時間の安定同位体への暴露によりCE-MSでの検出が可能になることが示された。今後、この安定同位体を用いた代謝動態解析を駆使することで、より詳細な幹細胞固有の代謝制御の解明に取り組む予定である。

## 田賀グループ

1) 血液系: 胎生中期の造血幹細胞培養系として大動脈・生殖原基・中腎(AGM)領域の分散培養を用いた研究から、前年度に AGM 分散培養中の CD45<sup>lowc</sup>-Kit<sup>+</sup>細胞集団に血液前駆細胞能が認められることを明らかにしたが、今年度は CD45<sup>lowc</sup>-Kit<sup>+</sup>細胞集団からより未分化性の高い細胞を特定するために、マウス成体骨髄における造血幹細胞特性の1つ side population (SP)の有無について解析した。Hoechst33342 染色により CD45<sup>lowc</sup>-Kit<sup>+</sup>細胞集団中に SP 細胞を認めた。CD45<sup>lowc</sup>-Kit<sup>+</sup>細胞集団かつ SP 細胞および CD45<sup>lowc</sup>-Kit<sup>+</sup>細胞集団かつ main population 細胞についてコロニー形成能を調べた結果、CD45<sup>lowc</sup>-Kit<sup>+</sup>細胞集団のうち SP 分画により高い造血活性を示す集団が存在することを初めて示すことができた。成体造血幹細胞も SP 分画に存在することから、胎生期～出生後を通じて未分化性の性格を持つことが明らかとなった。平尾の項、合田の項で述べた遺伝子 X はこの細胞集団で高く、代謝制御と未分化性との共通性として注目している。

2) 神経系: ふたつのサイトカイン LIF と BMP2 はそれぞれ下流の転写因子 STAT3 と Smad1 の活性化を介して神経幹細胞からアストロサイトへの分化誘導を引き起こすが、アストロサイトマーカーGFAP の遺伝子を除いて、両シグナルの標的遺伝子は未知の点が多い。本研究で、DNA マイクロアレイ解析から LIF の標的遺伝子として suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3)を同定した。興味深いことに、SOCS3 欠損神経幹細胞画分において、LIF 経路とは独立の BMP 経路に位置する転写因子 Smad1 が LIF 刺激によってリン酸化されることを見出した。BMP アンタゴニスト Noggin によってこの Smad1 の活性化が阻害されたことと、BMP2 遺伝子プロモーター領域に機能的 STAT3 応答配列を見出したことから、LIF 刺激で活性化された STAT3 によって BMP2 遺伝子の転写活性化が引き起こされ、産生された BMP2 の刺激によって Smad1 がリン酸化されることを明らかにした。JAK-STAT 経路が BMP2 の分泌を介して Smad 経路を制御するという発見はこれまでのサイトカインネットワークによる神経幹細胞制御機構に新たな洞察を与えた。

## 岩間グループ

Bmi1 による造血幹細胞制御において重要な標的遺伝子が *Cdkn2a(Ink4a/Arf)* 遺伝子座であり、異なる読み枠から翻訳される p16<sup>Ink4a</sup> と p19<sup>Arf</sup> の 2 つの蛋白をコードしている。これらの遺伝子は Bmi1 により発現が抑制的に制御されており、*Bmi1* 遺伝子欠損マウスにおいては著明な発現の亢進がみられる。*Bmi1* 欠損マウスにおける造血幹細胞の長期骨髄再構築能、*in vitro*での増殖・分化能は *Ink4a* と *Arf* 遺伝子の両方を欠損した場合 (*Bmi1*<sup>-/-</sup>*Ink4a*<sup>-/-</sup>*Arf*<sup>-/-</sup>) においてほぼ正常に回復し、Bmi1 による *Ink4a/Arf* 遺伝子の発現抑制が造血幹細胞の自己複製能の維持に必須であることが確認された。*Ink4a/Arf* の発現亢進は細胞周期進行の抑制、アポトーシスの亢進に加え、細胞老化 (cellular senescence) にも関与する。*Bmi1* 欠損造血幹細胞を培養した際に、細胞老化の特徴である細胞の肥大化や、そのマーカーである senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) 陽性細胞の著明な増加が認められ、これは *Ink4a/Arf* の欠損によって回復した。したがって、*Bmi1* の欠損により造血幹細胞の細胞老化が誘導される可能性が強く示唆され、さらなる解析を進行中である。

また、肝幹/前駆細胞活性を有するとされるマウス胎児肝臓の c-Kit-CD49f+/lowCD29+CD45-Ter119-細胞をセルソーターによって分離・回収し、自己複製能と発癌の関連性に関してプロスペクティブに解析した。これらの細胞にポリコム遺伝子 Bmi1 または beta-catenin 活性型変異体などの自己複製分子を強制発現した場合、肝幹/前駆細胞は二分化能を維持したままリプレーティング活性の有意な上昇、すなわち自己複製能の亢進を示すとともに、anchorage-independency を獲得した。Bmi1 または beta-catenin の活性型変異体を強制発現したこれらの細胞を NOD/SCID マウスの皮下、脾臓に移植したところ、それぞれ皮下腫瘍、肝腫瘍を生じた。なお、これらの現象は肝幹/前駆細胞特異的に認められ、分化傾向のある肝細胞群においては認められなかった。以上より Bmi1 および Wnt/beta-catenin シグナルは肝幹/前駆細胞の自己複製に関与し、その自己複製制御異常が肝発癌における初期イベントとなる可能性が考えられた。

### 3. 研究実施体制

#### (1) 平尾敦 (金沢大学) グループ

研究項目

- ・ 幹細胞およびがん幹細胞における代謝解析

#### (2) 合田 亘人 (慶應義塾大学) グループ

研究項目

- ・ 各種幹細胞の代謝産物の測定

#### (3) 須田 年生 (慶應義塾大学) グループ

研究項目

- ・ 幹細胞における代謝解析

#### (4) 田賀 哲也 (熊本大学) グループ

研究項目

- ・ 組織幹細胞および脳腫瘍におけるがん幹細胞の代謝解析

#### (5) 岩間 厚志 (千葉大学) グループ

研究項目

- ・ 造血幹細胞および肝がんにおけるがん幹細胞の代謝解析

#### 4. 研究成果の発表等

##### (1) 論文発表(原著論文)

###### 平尾グループ

- Ito K, Hirao A\*, Arai F, Takubo K, Matsuoka S, Miyamoto K, Ohmura M, Naka K, Hosokawa K, Ikeda Y, Suda T. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nature Med.* 12:446-451, 2006  
\*Corresponding Author
- Takubo K, Hirao A, Ohmura M, Azuma M, Arai F, Nagamatsu G, Suda T. Premeiotic germ cell defect in seminiferous tubules of Atm-null testis. *Biochem Biophys Res Commun.* 351:993-8. 2006
- Ito K, Takubo K, Arai F, Satoh H, Matsuoka S, Ohmura M, Naka K, Azuma M, Miyamoto K, Hosokawa K, Ikeda Y, Mak TW, Suda T, Hirao A. Regulation of reactive oxygen species by atm is essential for proper response to DNA double-strand breaks in lymphocytes. *J. Immunol.* 178:103-10, 2007.
- Zaugg K, Su YW, Reilly PT, Moolani Y, Cheung CC, Hakem R, Hirao A, Elledge SJ, Mak TW. Cross-talk between Chk1 and Chk2 in double-mutant thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:3805-10. 2007
- Miyamoto K, Araki YK, Naka K, Arai F, Takubo K, Yamazaki S, Matsuoka S, Miyamoto T, Ito K, Ohmura M, Chen C, Hosokawa K, Nakauchi H, Nakayama K, Nakayama KI, Harada M, Motoyama N, Suda T, and Hirao A. Foxo3a Is Essential for Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool. *Cell Stem Cell*, 2007, in press

###### 須田グループ

- Zhao C, Irie N, Takada Y, Shimoda K, Miyamoto T, Nishiwaki T, Ishikawa H, Suda T, Matsuo K: Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Matsuo Cell Metabolism*, 4: 111-121, 2006
- Ito K, Hirao A, Arai F, Takubo K, Matsuoka S, Miyamoto K, Ohmura M, Naka K, Hosokawa K, Ikeda Y, Suda T. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nature Med.* 12:446-451, 2006
- Lee SH, Rho J, Jeong D, Sul JY, Kim T, Kim N, Kang JS, Miyamoto T, Suda T, Lee SK, Pignolo RJ, Koczon-Jaremko B, Lorenzo J, Choi Y. v-ATPase V(0) subunit d2-deficient mice exhibit impaired osteoclast fusion and increased bone formation. *Nat Med*, 12: 1403-1409, 2006
- Nagamatsu G, Ohmura M, Mizukami T, Hamaguchi I, Hirabayashi S, Yoshida S, Hata Y, Suda T, Ohbo K: A CTX Family Cell Adhesion Molecule, JAM4, Is Expressed in Stem Cell and Progenitor Cell Populations of both Male Germ Cell and Hematopoietic Cell Lineages. *Mol Cell Biol*, 26: 8498-8506, 2006.
- Miyamoto K, Araki YK, Naka K, Arai F, Takubo K, Yamazaki S, Matsuoka S, Miyamoto T, Ito K, Ohmura M, Chen C, Hosokawa K, Nakauchi H, Nakayama K, Nakayama KI, Harada M, Motoyama N, Suda T, and Hirao A. Foxo3a Is Essential for Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool. *Cell Stem Cell*, 2007, in press

###### 合田グループ

- Suganuma K, Tsukada K, Kashiba M, Tsuneshige A, Furukawa T, Kubota T, Goda N, Kitajima M, Yonetani T, Suematsu M, Erythrocytes with T-state-stabilized hemoglobin as a therapeutic tool for postischemic liver dysfunction. *Antioxid Redox Signal.* 8, 1847-1855, 2006.

#### 田賀グループ

- Nobuhisa I, Ohtsu N, Okada N, Nakagata N, and Taga T. Identification of a population of cells with hematopoietic stem cell properties in mouse aorta-gonad-mesonephros cultures. *Exp Cell Res.*, 313:965-974, 2007.
- Ohtsu N, Nobuhisa I, Mochita M, and Taga T. Inhibitory effects of homeodomain-interacting protein kinase 2 on the aorta-gonad-mesonephros hematopoiesis. *Exp. Cell Res.*, 313:88-97, 2006.
- Abematsu M, Kagawa T, Fukuda S, Inoue T, Takebayashi H, Komiya S, and Taga T. bFGF endows dorsal telencephalic neural progenitors with ability to differentiate into oligodendrocytes but not GABAergic neurons. *J. Neurosci. Res.*, 83:731-743, 2006.
- Takizawa H, Kubo-Akashi C, Nobuhisa I, Sang-Mo Kwon, Iseki M, Taga T, Takatsu K, and Takaki S. Enhanced engraftment of hematopoietic stem/progenitor cells by the transient inhibition of an adaptor protein, Lnk. *Blood*, 107:2968-2975, 2006.

#### 岩間グループ

- Kato Y, Koseki H, Vidal M, Nakauchi H, and Iwama A. Unique composition of polycomb repressive complex 1 in hematopoietic stem cells. *Int. J Hematol.* 85, 179-181, 2007.
- Negishi M, Saraya A, Miyagi S, Nagao K, Inagaki Y, Nishikawa M, Tajima S, Koseki H, Tsuda H, Takasaki Y, Nakauchi H, and Iwama A. Bmi1 cooperates with Dnmt1 associated protein 1 in gene silencing. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 353, 992-998, 2007.
- Oguro H, Iwama A, Morita Y, Kamijo T, van Lohuizen M, and Nakauchi H. Differential impact of *Ink4a* and *Arf* on hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment in *Bmi1*-deficient mice. *J Exp Med* 203, 2247-2253, 2006.
- Yamazaki S, Iwama A, Takayanagi S-I, Etoh K, Ema H, and Nakauchi H. Cytokine signals modulated via lipid rafts mimics niche signals and induce hibernation in hematopoietic stem cells. *EMBO J.* 25, 3515-3523, 2006.
- Chiba T, Kita K, Zheng Y-W, Yokosuka O, Saisho H, Iwama A, Nakauchi H, and Taniguchi T. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology* 44, 240-251, 2006.

#### (2) 特許出願

平成 18 年度特許出願: 1 件 (CREST 研究期間累積件数: 2 件)