

Title	Human AK2 links intracellular bioenergetic redistribution to the fate of hematopoietic progenitors(Abstract_要旨)
Author(s)	Saiki, Norikazu
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2018-05-23
URL	https://doi.org/10.14989/doctor.k21265
Right	Final publication is available at https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X1830370X
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

京都大学	博士 (医科学)	氏名	佐伯 憲 和
論文題目	Human AK2 links intracellular bioenergetic redistribution to the fate of hematopoietic progenitors (ヒトアデニル酸キナーゼ2は細胞内エネルギー分子の分配を介して血液前駆細胞の分化運命を制御する)		
(論文内容の要旨)			
<p>アデノシン三リン酸 (ATP)は細胞を維持する上で必須のエネルギー通貨であり、主に細胞質やミトコンドリアで産生され、細胞内の各小器官で消費される。多細胞生物においては分化段階によって ATP の産出拠点が異なることが知られており (Folmes <i>et al.</i>, <i>Cell Metab.</i>, 2011)、ATP の細胞内分布が動的に変化することが考えられる。Adenylate Kinase 2 (AK2)はミトコンドリア膜間隙に局在するアデニル酸代謝酵素であり、AK 間でのリン酸基転移連鎖ネットワークにより細胞内の ATP 分布を制御する。AK2 の機能喪失変異によって発症する細網異形成症 (Reticular dysgenesis; RD)は、著名な骨髄血液前駆細胞の分化障害とそれに伴う重症複合免疫不全症及び好中球成熟停止を主徴とする免疫不全症であるが、AK2 機能欠損と代謝変動が造血前駆細胞の運命制御につながるメカニズムは全くわかっていない (Lagresle-Peyrou <i>et al.</i>, <i>Nat. Genet.</i>, 2009)。そこで本論文では 2 名の RD 患者から人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells; iPSCs)を樹立し、<i>in vitro</i>での血液細胞分化系によって得られた血液細胞および血液前駆細胞を用いてエネルギー分子の分配と細胞分化運命決定の関係性および発症メカニズムにアプローチした。</p> <p>RD-iPSCs から好中球および T 細胞系列への分化誘導を実施したところ、好中球の成熟および T 細胞系列表面マーカーの発現を認めなかった一方で、RD-iPSCs に AK2 を強制発現させた対象比較株では、これらの分化遅滞が健常人由来株と同程度まで回復していた。さらに発生初期の造血前駆細胞である CD34 陽性 KDR 陽性血液血管前駆細胞 (Hemoangiogenic progenitor cells; HAPCs)の造血能をコロニー形成アッセイによって検証したところ、患者株では造血コロニーの形成が著しく障害されていた。以上の結果より、RD においては極めて初期の分化段階において多方向への血液分化障害が起こっていることが示唆された。</p> <p>AK2 の主要な役割であるエネルギー分子の動的な局在変化が、前駆細胞の分化運命決定に強く影響を与えることが考えられるが、これまでの分化段階ごとの代謝解析は細胞全体を平均化した定量方法が主であり、細胞内小器官ごとのエネルギー分子の量に関しては言及されてきていなかった。そこで、ATP 濃度に応じて蛍光共鳴エネルギー移動によって蛍光色が変化し、付与された局在化シグナルによって細胞質、ミトコンドリア、核それぞれの ATP 分布を定量できる蛍光プローブである ATeam (Imamura <i>et al.</i>, <i>PNAS</i>. 2009)を RD-iPSCs に導入後、分化誘導した HAPCs を高解像共焦点顕微鏡によって 1 細胞・1 細胞小器官レベルで観察・撮影した。得られた蛍光画像から画像解析プログラムによって細胞内 ATP 分布を定量し、比較を行ったところ、未分化の段階では ATP 分布に特徴的な差は検出されなかった一方で、HAPCs においては患者株では AK2 強制発現株と比べてミトコンドリアでは ATP 量が有意に高く、核では低い値を示した。この結果から、AK2 は分化段階特異的にミトコンドリア→核間での ATP 分布調節の役割を担っていることが示唆された。さらに分化表現系との関連を立証するために、</p>			

マイクロアレイ法による遺伝子発現解析を分化段階ごとに実施したところ、患者株では特に HAPCs の段階において血液細胞分化に重要な遺伝子発現パターンの形成が障害されていることがわかった。

これまで RD に関しては ATP 輸送を担う AK2 が原因遺伝子としながらも、エネルギー分子の分布と分化異常との関連性には直接的に言及されてこなかった。本論文は iPSCs による疾患・血液分化モデルに対して細胞内 ATP の分子イメージングと網羅的遺伝子発現解析を駆使することで、ミトコンドリア-核間での ATP 分布の異常が、分化異常を引き起こす遺伝子発現プロファイルに制限することを明らかにした。本知見は今後、エネルギー分子の分布調節機能が持つ分化制御プロセスの詳細な解明と、RD の根本的な病態の解明につながることを期待される。

(論文審査の結果の要旨)

本研究は非常に稀な重症複合免疫不全症候群である細網異形成症患者 2 名から iPS 細胞を樹立し、その血液分化表現系を評価することで、疾患 iPS 細胞モデルとしての病態解析における妥当性を示した。さらに、患者由来検体からは取得することが困難な血液前駆細胞を分化誘導後、分化能に関して解析することで、分化異常の起点となる前駆細胞を同定した。この疾患 iPS 細胞株をモデルとして、エネルギー分子の細胞内分布と細胞分化の関連性に着目し、FRET 法を基盤とした ATP 可視化プローブを用いたライブイメージングとマイクロアレイ法によるトランスクリプトーム解析によって、AK2 による細胞内エネルギー分子の再分配が担う血液前駆細胞の分化運命決定機構に関して言及した。結果、AK2 は血液前駆細胞の分化段階特異的にミトコンドリア-核間での ATP 量の調節に寄与していることが明らかとなり、患者由来 AK2 欠損株由来血液前駆細胞では核内 ATP の減少によって遺伝子発現プロファイルが変動しており、このプロファイル異常が前駆細胞の分化を著しく制限していることが示唆された。

以上の研究は細胞内エネルギー分布調節機構と細胞分化の関連性および細網異形成症の病態メカニズムの一端の解明に貢献し、細胞分化に関するより詳細な理解と今後の病態解析の発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（ 医科学 ）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 30 年 5 月 7 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。