

Title	活性酸素のp38MAPKを介する造血幹細胞寿命制御
Sub Title	
Author	伊藤, 圭介(Ito, Keisuke) 平尾, 敦(Hirao, Atsushi) 須田, 年生(Suda, Toshio)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2007
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.84, No.3 (2007. 9) ,p.165- 168
JaLC DOI	
Abstract	Hematopoietic stem cells(HSCs)are able to self-renew and to differentiate along all hematopoietic lineages throughout the entire life-time of organism. Appropriate control of HSC self-renewal is crucial for the maintenance of hematopoietic homeostasis. Here we show that activation of p38MAPK in response to increasing levels of reactive oxygen species (ROS) limits the lifespan of HSCs in vivo. In Atm (-/-) mice, elevation of ROS levels induces HSC-specific phosphorylation of p38MAPK accompanied by a defect in the maintenance of HSC quiescence. Inhibition of p38MAPK rescued ROS-induced defects in HSC repopulating capacity and in the maintenance of HSC quiescence, indicating that the ROS-p38MAPK pathway contributes to exhaustion of the stem cell population. Furthermore, prolonged treatment with an antioxidant or an inhibitor of p38MAPK extended the lifespan of HSCs from wild-type mice in serial transplantation experiments. These data show that inactivation of p38MAPK protects HSCs against loss of self-renewal capacity.
Notes	受賞記念講座(三四会奨励賞)
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20070900-0165

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

受賞記念講座 (三四会奨励賞)

活性酸素の p38MAPK を介する造血幹細胞寿命制御

¹慶應義塾大学医学部 発生分化生物学, ²スローンケタリング記念癌センター 癌生物学・遺伝学教室,

³金沢大学がん研究所 腫瘍分子科学研究部門 遺伝子・染色体構築研究分野

伊藤圭介^{1,2)}・平尾敦³⁾・須田年生¹⁾

ABSTRACT

Hematopoietic stem cells (HSCs) are able to self-renew and to differentiate along all hematopoietic lineages throughout the entire life-time of organism. Appropriate control of HSC self-renewal is crucial for the maintenance of hematopoietic homeostasis. Here we show that activation of p38MAPK in response to increasing levels of reactive oxygen species (ROS) limits the lifespan of HSCs in vivo. In *Atm* (-/-) mice, elevation of ROS levels induces HSC-specific phosphorylation of p38MAPK accompanied by a defect in the maintenance of HSC quiescence. Inhibition of p38MAPK rescued ROS-induced defects in HSC repopulating capacity and in the maintenance of HSC quiescence, indicating that the ROS-p38MAPK pathway contributes to exhaustion of the stem cell population. Furthermore, prolonged treatment with an antioxidant or an inhibitor of p38MAPK extended the lifespan of HSCs from wild-type mice in serial transplantation experiments. These data show that inactivation of p38MAPK protects HSCs against loss of self-renewal capacity.

Key Words : Reactive Oxygen Species, p38MAPK, Hematopoietic Stem Cell

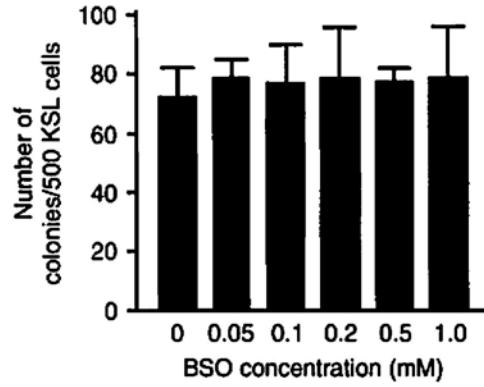
緒 言

老化・寿命制御への活性酸素 (Reactive oxygen species: ROS) の関与を示唆する研究報告は多数あるが、抗酸化剤投与による寿命延長に関しては現在まで結論が出ていなかった^{1,2)}。幹細胞は多分化能と自己複製能を併せ持つ細胞と定義される。その未分化性維持機構を解明する事は、幹細胞の特性を理解する上でも必須であり、再生医療の中心的な課題である。造血幹細胞は個体の生存期間を通じて造血細胞を作り続けるが、その寿命制御機構は解明されていない。我々は *Atm* (ataxia telangiectasia mutated) 欠失マウスを用いた解析から造血幹細胞の自己複製制御におけるレドックス制御の重要性を示してきた³⁾。本研究では造血幹細胞での酸化ストレスにตอบสนองする自己複製制御分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

I. 造血幹細胞の細胞内活性酸素に対する高感受性

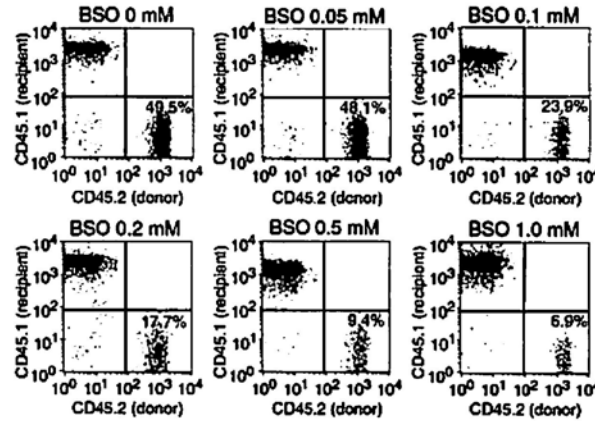
まず始めに、野生型マウスから造血幹細胞分画 c-Kit⁺Sca-1⁺Lin⁻ (KSL) 細胞を採取し酸化剤を用いて細胞内活性酸素を上昇させ幹細胞機能に対する影響を検討した。前駆細胞に対する影響は軽度 (図1a) であるのに対し、幹細胞の骨髓再構築能に強い障害をきたすことを見出した (図1b)。以上の結果から細胞内活性酸素抑制は野生型幹細胞においてもその自己複製能維持に重要であることが示唆された。すでに我々は *Atm* 欠失マウスの解析から幹細胞レベルでの p16^{INK4a} 発現調節が自己複製能制御に重要であることを示してきた³⁾。野生型造血幹細胞においても活性酸素産生による p16^{INK4a} 上昇が観察された (図1c) ことから、酸化ストレスにตอบสนองする自己複製制御分子メカニズムを解明するためには p16^{INK4a} の発現調節の解明が重要と考えた。我々は、酸化ストレスによる p16^{INK4a} 発現上昇に関与していると多

1a



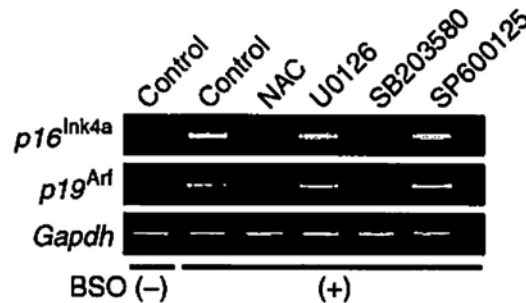
*BSO (Buthionine Sulfoximine):
グルタチオン合成酵素阻害剤。
投与により細胞内活性酸素が産生。

1b



*Ly45.2マウス由来造血細胞をDonorにLy45.2マウス由来造血細胞をCompetitorに用い、放射線照射をしたLy45.1マウスに移植を行い、骨髓再構築をRecipientマウスの末梢血にて調べた。
Donor由来細胞はLy45.2陽性であり、CompetitorもしくはRecipient由来細胞はLy45.1陽性となる。
図より、BSOの濃度依存性に末梢血中のDonor由来細胞が減少している事が分かる。

1c



*NAC (N-acetyl-L-cysteine): グルタチオン前駆体。抗酸化作用を持つ。
*U0126: MAPキナーゼ1及び2(MEK1/2)の選択的阻害剤。
MEK1に非競合的に結合して酪氨酸活性を阻害することにより、ERKのリン酸化による活性化を妨ぐ。
*SB203580: p38MAPK特異的阻害剤。
*SP600125: JNK (c-jun N-terminal kinase) 阻害物質。

図1 造血幹細胞特異的な細胞内活性酸素に対する p38MAPK 活性化 (Ito K et al : Nat. Med. 12 : 446-451, 2006 の Figure 1b, c. Figure 2b を一部改変し、許可を得て転載)

a, b 細胞内活性酸素の前駆細胞機能(a), 造血幹細胞機能(b)に対する影響

c 野生型造血幹細胞に対し細胞内活性酸素産生時に p16^{INK4a} 上昇を認め、p38MAPK 特異的阻害剤投与によりその上昇が抑制された

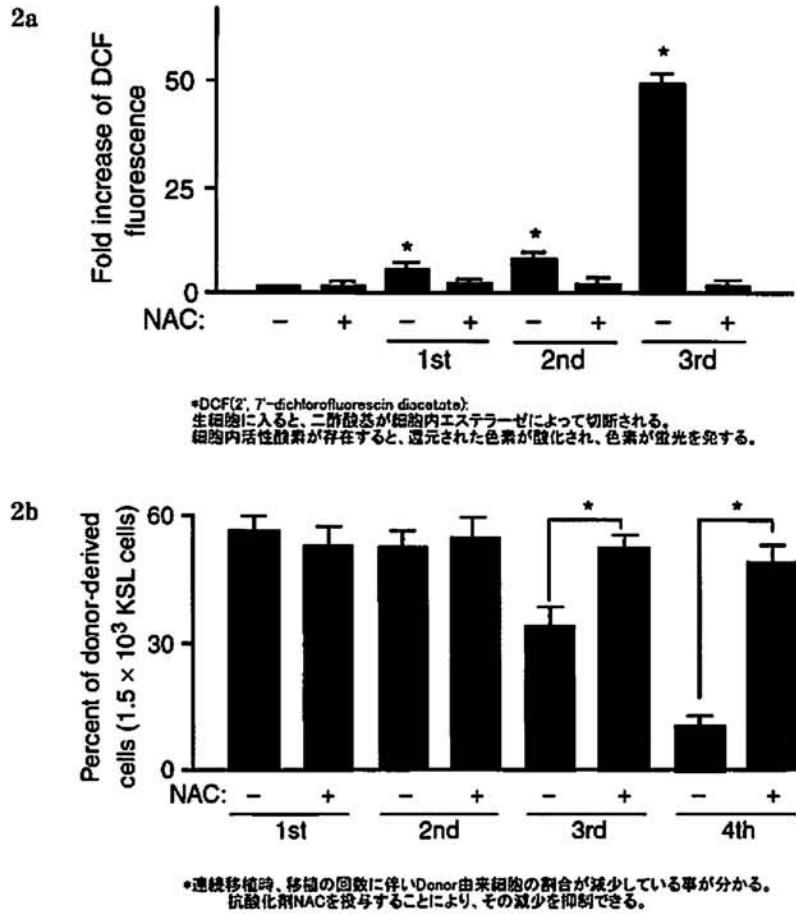


図2 p38MAPK 活性化阻害による連続移植時の造血幹細胞寿命延長

- a. 連続移植による造血幹細胞内活性酸素の上昇及び抗酸化剤投与による抑制 (Ito K et al ; Nat. Med. 12 : 446-451, 2006 の Figure 4a を一部改変し、許可を得て転載)
- b. p38MAPK 活性化阻害による造血幹細胞機能低下抑制 (Ito K et al ; Nat. Med. 12 : 446-451, 2006 の Figure 4f を一部改変し、許可を得て転載)

数報告されている MAPK (mitogen-activated protein kinase) に注目した。その結果、細胞内活性酸素の上昇により、造血幹細胞特異的に p38MAPK が活性化されることが判明した。p38MAPK 特異的阻害剤投与により p16^{INK4a} 上昇が抑制されたが、ERK (extracellular regulatory kinase) 及び JNK (c-Jun-amino terminal kinase) 阻害剤投与では p16^{INK4a} 発現に変化は見られなかった (図1c)。以上の結果より、p38MAPK が造血幹細胞における酸化ストレスに応答した p16^{INK4a} の発現調節因子であると考えられた。

II. p38MAPK 活性化阻害による連続移植時の造血幹細胞寿命延長

次に我々は、ROS-p38MAPK シグナルが野生型造血幹細胞の寿命制御に生理的に関与しているかにつき検討

を進めることにした。造血幹細胞の寿命は個体の寿命に比較し非常に長いと考えられている⁵⁾。そのため、造血幹細胞の寿命制御機構を検討する事は困難であった。しかし近年、造血幹細胞を連続移植するとその機能が低下することが報告され⁶⁾、連続移植を用いて造血幹細胞の寿命を検討することが可能になった。連続移植時における造血幹細胞の細胞内活性酸素を測定したところ移植回数に相関して ROS の上昇を認めた (図2a)。連続移植時に抗酸化剤を投与することにより、細胞内活性酸素上昇は抑制され (図2a)、連続移植による造血幹細胞機能低下を回復できることが判明した³⁾。さらに、連続移植時に造血幹細胞特異的な p38MAPK 活性化が認められ⁴⁾、p38MAPK 阻害剤を長期に投与することにより造血幹細胞の機能の低下を抑制した (図2b)。以上の結果から細胞内活性酸素上昇が p38MAPK 活性化制御を介して造血幹細胞の寿命制御に関与していると結論付けた。

総 括

幹細胞と老化という一見全く違う分野の融合という新たな観点から造血幹細胞機能解明に取り組み、老化・寿命制御に関わる活性酸素・p38MAPK が幹細胞未分化性維持に重要な働きをしていることが判明した。近年、再生不良性貧血をはじめとする疾患で p38MAPK の関与が示唆されている⁷⁾。我々が明らかにした造血幹細胞寿命制御シグナルがヒト疾患に対する新たな治療法開発に役立つことができればと考えている。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、ご指導、御校覧、多大なるご助言を頂きました慶應義塾大学医学部発生分化生物学教室の諸先生方に深甚なる謝意を表します。

参考文献

- 1) Schriener, S. E. *et al. Science* (2005) 308, 1909-1911.
- 2) Kujoth, G. C. *et al. Science* (2005) 309, 481-484.
- 3) Ito, K *et al. Nature* (2004) 431, 997-1002.
- 4) Ito, K *et al. Nat. Med.* (2006) 12, 446-451.
- 5) Harrison, D. E. (1975) 30, 279-285.
- 6) Allop, R.C. *et al. Nat. Med.* (2003) 9, 369-371.
- 7) Verma, A. *et al. J. Immunol.* (2002) 168: 5984-5988.