

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461411

研究課題名(和文) TERT複合体が司る造血幹細胞制御と骨髄機能不全

研究課題名(英文) HSC regulation by TERT-binding proteins, chromatin remodeling factor BRG1/BRM

研究代表者

仁田 英里子(Nitta, Eriko)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：80401123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：造血細胞においてBRG1は前駆細胞や分化した細胞の一部にも発現する一方で、BRMは長期再構築能を持つ未分化な造血幹細胞に特異的に発現しており、造血幹細胞の維持にはBRMが重要である可能性を考えられた。BRMノックアウトマウスを用いて解析を行ったところ、造血幹細胞移植においてBRM欠損造血幹細胞は特異的に失われ、BRMが造血幹細胞の長期再構築能維持に重要であることが示された。このときBRM欠損造血幹細胞では細胞周期が活性化しており、BRMは造血幹細胞の静止期維持に貢献していることが示唆された。これらの性質はいずれも造血幹細胞特異的に見られ、BRMが造血幹細胞特異的な制御因子であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Among many players in the epigenetic regulation, the SWI/SNF ATP-dependent chromatin remodeling factor BRG1 has recently been demonstrated to be essential for leukemic stem cell (LSC) maintenance. Whereas BRG1 is implicated in the pathogenesis of Fanconi anemia and bone marrow failure, BRM, the homologue of BRG1, is expressed more specifically in HSCs compared with BRG1 and appeared to be involved in physiological regulation of HSCs. We have demonstrated an essential role of BRM in the maintenance of HSCs using genetically modified BRM-null mice. BRM-null HSCs showed profoundly impaired reconstitution capacity in competitive BMT assays and exhibited more activate cell cycling than wild type HSCs after bone marrow transplantation, suggesting that BRM plays a role in reversion of cycling HSCs into a quiescent state.

研究分野：造血幹細胞

キーワード：造血幹細胞 エピジェネティクス クロマチンリモデリング BRG1 BRM TERT

### 1. 研究開始当初の背景

再生不良性貧血(aplastic anemia:AA) は骨髄低形成を来たす一つの症候群で、発症機序として造血幹細胞自身の質的異常と免疫学的機序による造血幹細胞の傷害が考えられているが、その根本的な機構は不明である。

先天性骨髄不全 dyskeratosis congenita (DKC) の原因遺伝子として同定された DKC1、telomerase RNA component (TERC) および telomerase reverse transcriptase (TERT) はいずれもテロメラーゼ複合体を構成する分子である。骨髄不全疾患の成因にテロメラーゼ複合体の異常が重要なことは疑いないが、その発症機構には未だ不明な点が多い。1990年代の TERT 発見を受けて Weissmann らが行った TERT ノックアウトマウスの解析によれば、造血幹細胞の維持にテロメア伸長は必要であるが十分ではなかった。その後、TERT によるテロメア長非依存的な幹細胞維持機能や、テロメア損傷による代謝やミトコンドリア機能への直接的影響が示唆され、TERT が幹細胞を制御する機構は単一でない可能性がある。骨髄不全疾患群を均一の疾患として捉えられない原因の一部は TERT がこの様に細胞内で複数の働きを持つ性質によるのかもしれない。

### 2. 研究の目的

TERT のテロメアに関連しない結合分子として同定された核小体因子やクロマチンリモデリング因子は、TERT のテロメア長非依存的な機能解明の足掛かりになる。そのためこれらの核小体の恒常性維持、クロマチンリモデリング因子を中心とした転写制御は何れも造血幹細胞の機能維持の鍵と考えられ、これらの機構の破綻が TERT に関連した造血不全疾患の成因に直接繋がると考えられる。

骨髄不全疾患群の成因を解明し明確に境界分けすることで、治療反応性を推測し個々の症例に合った治療を適応できる知識を得ることは、長期生存を得られる現在こそ急務である。本研究課題により造血幹細胞制御の鍵分子である TERT が司る造血幹細胞の維持制御の分子機構を解明し、その生理的機構の破綻により発症する幹細胞病である骨髄不全疾患の発症機構やその疾患群の境界の解明に迫り、それらの症例の治療成績向上に貢献することを目的とする。

### 3. 研究の方法

造血幹細胞が TERT により維持制御される機構として、核小体の恒常性維持およびクロマチンリモデリング因子 BRM を中心としたタンパク質複合体による転写ダイナミクス制御に注目し解析する。

TERT ノックアウトマウスや老齢マウスにおいて電子顕微鏡での観察による核小体構造、核小体ゲノムにおけるダメージ蓄積などにより核小体の恒常性について評価を行い、造血幹細胞のホメオスタシス保持と核小体の恒常性維持の関連性を明らかにし、核小体そのものの存在意義にも迫る。

TERT 結合因子であるクロマチンリモデリング因子 BRM の造血幹細胞維持における重要性を解明し、BRM 複合体への関与が推測される分子について検証を行うと同時に、網羅的探索を加えて重要な因子を同定する。

### 4. 研究成果

(1) TERT と結合する核小体因子については nucleostemin による造血幹細胞の p53 依存性アポトーシス防御機構を解明し、報告した(研究業績 7)。さらに p53 による老化と幹細胞の制御に着目して p53 の共役因子でアポトーシス促進分子 Aspp1 による造血幹細胞プールの健全性維持機構を明らかにした(研究業績 4)。これまでの研究結果より、精巧に日常的ダメージから防御された造血幹細胞におけるストレス応答の分子機構の一端を紐解き、それが長期に蓄積して惹起される造血幹細胞の老化機構の解明に寄与した(図 1)。

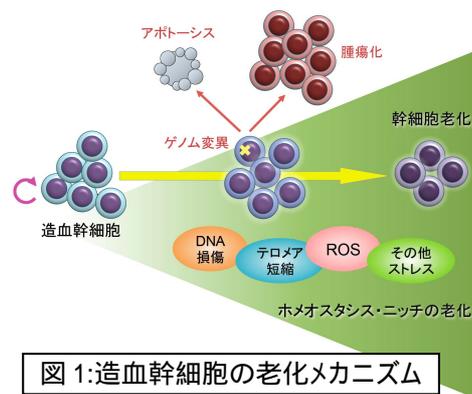
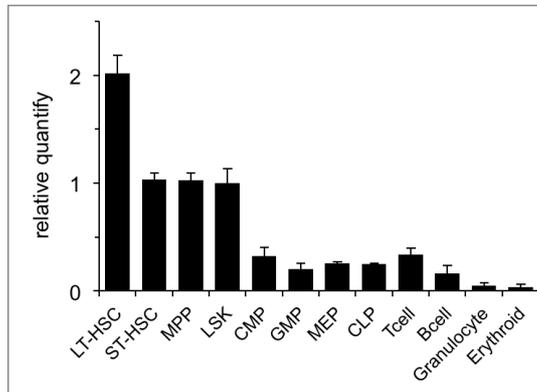


図 1:造血幹細胞の老化メカニズム

(2) TERT 結合因子であるクロマチンリモデリングの中心因子 BRG1/BRM のうち、BRM が造血細胞において幹細胞特異的に発現していることを示し(図 2)、BRM が造血幹細胞制御に重要である可能性を示唆した。

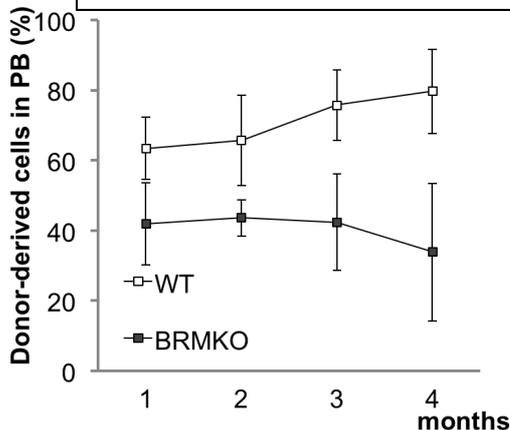
そこで BRM ノックアウトマウスを得てその造血幹細胞機能について解析したところ、BRM を欠損した造血幹細胞は競合的造血

図2: 造血細胞における BRM 発現



幹細胞移植において長期再構築能が野生型に比し著しく低下しており、幹細胞機能が損なわれていることが判明した(図3)。

図3: BRM 欠損 HSC による骨髄移植



造血幹細胞機能が損なわれる原因として、BRM 欠損造血幹細胞は細胞周期が活性化しており、通常の造血幹細胞が置かれているべき静止期の維持が失われていると考えられた。これらの性質は全て幹細胞特異的に見られ、クロマチンリモデリング分子 BRM が造血幹細胞の維持制御に重要であることを明らかにした。

現在、その分子生物学的機構に迫るため、BRM 複合体への関与が推測される分子について検証を行うと同時に、網羅的探索を加えて重要な因子の同定を試みている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

1. Koide S, Oshima M, Takubo K, Yamazaki S, Nitta E, Saraya A, Aoyama K, Kato Y, Miyagi S, Nakajima-Takagi Y, Chiba T, Matsui H, Arai F, Suzuki Y, Kimura H, Nakauchi H, Suda T, Shinkai Y, Iwama A.

Setdb1 maintains hematopoietic stem and progenitor cells by restricting the ectopic

activation of non-hematopoietic genes.

Blood. 128(5), pp638-49. 2016 (査読あり)

2. Yamashita M, Nitta E, Suda T.

Regulation of hematopoietic stem cell integrity through p53 and its related factors.

Ann N Y Acad Sci. 1370(1), pp45-54. 2016 (査読あり)

3. Yamashita M, Nitta E, Suda T.

Maintenance of hematopoietic stem cell integrity and regulation of leukemogenesis by p53 and its coactivator Aspp1.

Rinsho Ketsueki. 56(12), pp2426-33. 2015 (査読あり)

4. Yamashita M, Nitta E\* and Suda T.\*

Aspp1 preserves hematopoietic stem cell pool integrity and prevents malignant transformation.

Cell Stem Cell. 17(1), pp23-34. 2015 (査読あり) (\*corresponding authors)

5. Nitta E and Iwama A.

The cancer stem cell model in hematological malignancies.

Nihon Rinsho. 73(5), pp733-8. 2015 (査読なし)

6. Nitta E and Iwama A.

Diploid, not polyploid: new platelet producers.

Blood. 124(17), pp2620-2. 2014 (査読あり)

[学会発表](計 5 件)

1. Nitta E, Yamashita M, Motohiko Oshima, Iwama A and Suda T. Chromatin remodeling factor BRM is essential for the maintenance of HSC quiescence.

第77回日本血液学会学術集会 平成27年10月16日 ホテル日航金沢, 石川県金沢市

2. Nitta E, Yamashita M, Motohiko Oshima, Iwama A and Suda T. Chromatin remodeling factor BRM is essential for the maintenance of HSC quiescence.

International Society of Experimental Hematology 44th Annual Meeting. 平成27年9月17日 Kyoto international conference center, 京都府京都市

3. Nitta E, Yamashita M, Motohiko Oshima, Iwama A and Suda T. Chromatin remodeling factor BRM is essential for the maintenance of HSC quiescence.

The 15<sup>th</sup> Stem Cell Research Symposium. 平成27年5月29日 Ito international research center, 東京都文京区

4. Nitta E, Yamashita M and Suda T. Chromatin remodeling factor BRM protects HSCs from ROS stress via maintaining quiescence.

第76回日本血液学会学術集会 平成26年11月1日 大阪国際会議場, 大阪府大阪市

5. Nitta E, Yamashita M, Iwama A and Suda T. Chromatin remodeling factor BRM protects HSCs from ROS stress via maintaining quiescence.

International Society of Experimental Hematology 43nd Annual Meeting. 平成26年8月23日 Montreal, Canada.

〔図書〕(計 3 件)

1. Nitta E, Iwama A.

造血幹細胞を制御する遺伝子 1.ポリコム遺伝子ほかエピジェネティクス制御遺伝子

造血器腫瘍アトラス第5版. p37-44. 2016 日本医事新報社 (査読なし)

2. Nitta E, Iwama A. 骨髄の構造.

Principles and practice 血液・造血器・リンパ系. p38-43. 2015 文光堂 (査読なし)

3. Cheong J-W, Nakamura-Ishizu A, Nitta E, Suda T

Hematopoietic Stem Cell Aging and Oxidative Stress

Stem Cells: From Basic Research to Therapy: Basic Stem Cell Biology, Tissue Formation during

Development, and Model Organisms. Vol.1, p88-107. 2014 CRC Press (査読なし)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

仁田 英里子 (NITTA, Eriko)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号: 80401123

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者

須田 年生 (SUDA, Toshio)

研究者番号: 60118453

岩間 厚志 (IWAMA, Atsushi)

研究者番号: 70244126

山下 真幸 (YAMASHITA, Masayuki)