

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22638

研究課題名(和文)白血病幹細胞におけるシェルタリン因子TIN2の機能解明と新規治療法開発への応用

研究課題名(英文)Functional elucidation of shelterin factor TIN2 in leukemic stem cells and its application to the development of novel therapeutic strategies

研究代表者

新井 文用(Arai, Fumio)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：90365403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、シェルタリン因子TIN2がミトコンドリアに移行すると、活性酸素種の産生を亢進させて、造血幹細胞の自己複製能を低下させることを明らかにした。また、別のシェルタリン因子POT1とTPP1は、TIN2のミトコンドリア移行を抑制することを見いだした。一方、白血病幹細胞(L-GMP)では、ミトコンドリアTIN2が増加し、エネルギー代謝を制御している可能性が考えられた。しかしながら、L-GMPにTIN2を過剰発現させると、増殖が抑制されたことから、さらなる検討が必要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、シェルタリン因子TIN2がミトコンドリアに移行した場合、正常造血幹細胞では自己複製を抑制するが、白血病幹細胞では増殖に働くということを見出している。ミトコンドリアTIN2が正常幹細胞とがん幹細胞で異なる作用をもつという点は、新規性の高い成果であると考えられる。今後、TPP1とPOT1aのタンパク導入によるミトコンドリアTIN2の機能抑制は、正常造血幹細胞の体外増幅と白血病幹細胞の抑制の両方に応用が可能であり、再生医療とがん治療の発展に同時に貢献出来ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Shelterin complex (consisting of POT1, TPP1, TIN2, TRF1, TRF2, and RAP1) play essential roles in maintaining HSC function. We found that TIN2 localized in the mitochondria of HSCs increased reactive oxygen species (ROS) production and decreased self-renewal capacity. POT1 and TPP1 contributed to inhibiting the mitochondrial transfer of TIN2. On the other hand, TIN2 expression was upregulated in leukemic GMP (L-GMP), which possibly contributes to the energy metabolism in mitochondria in L-GMP. However, overexpression of TIN2 in L-GMP inhibited proliferation. Therefore, we need further investigation to clarify the function of mitochondrial TIN2 in leukemic stem cells.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：造血幹細胞 白血病幹細胞 TIN2 ミトコンドリア 活性酸素種

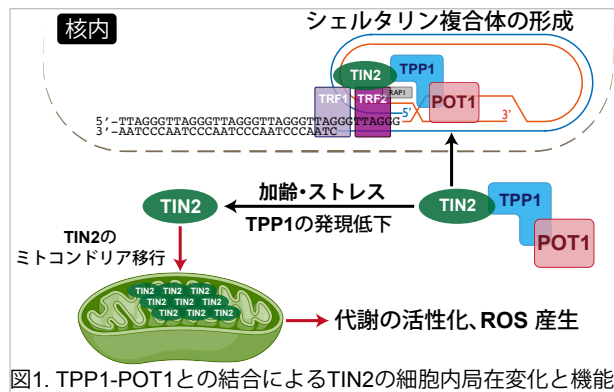
1. 研究開始当初の背景

染色体末端のテロメアは、細胞の老化やがん化に関わる重要な領域であり、Shelterin 複合体 (POT1, TPP1, TIN2, TRF1, TRF2, RAP1) によって保護されている¹。我々は、POT1a が DNA 修復応答の抑制に加え、酸化的リン酸化と活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) 産生を抑制することで、造血幹細胞の自己複製の維持と老化抑制に働くことを明らかにした²。

また、別のシェルタリン因子 TIN2 は、TPP1 および POT1 と結合して核内に移行し、テロメアの保護に働くが、TPP1 との結合がない場合はミトコンドリアに移行して代謝制御に働くことが知られている³。ミトコンドリアに局在する TIN2 (以下「ミトコンドリア TIN2」とする) は、活性 ROS の産生を誘導し、低酸素環境下では HIF1 α が誘導されて、酸化的リン酸化の抑制と解糖系の促進が起こる。

造血幹細胞では、加齢やさまざまなストレスによって POT1a と TPP1 が減少し、TIN2 量が相対的に多くなることで、ミトコンドリア移行が亢進すると考えられた (図 1)。実際に、造血幹細胞に TIN2 を過剰発現すると、ROS 産生が亢進して、造血幹細胞の骨髄再構築能が失われることを見出していた。また、通常酸素下で培養した造血幹細胞では、TIN2 がミトコンドリア内に移行し、ROS 産生が増加して幹細胞機能が障害された。一方、急性骨髄性白血病 (AML) の幹細胞分画 (L-GMP) では、正常な造血幹・前駆細胞と比べて TIN2 の発現レベルが高く、ROS 産生が亢進しているものの、AML 発症を誘導することができた。

これらの結果から、正常造血幹細胞の機能維持には、TIN2 のミトコンドリアへの移行を抑制することが重要であるのに対し、白血病幹細胞では、ミトコンドリア TIN2 が増殖・維持に必要なエネルギー代謝制御に関与していることが考えられた。



2. 研究の目的

正常造血幹細胞では、POT1、TPP1、TIN2 は複合体となって核内に移行し、Shelterin として機能することで自己複製能の維持に働くが、ミトコンドリア TIN2 は自己複製能を障害する。一方、白血病幹細胞では、ミトコンドリア TIN2 がエネルギー代謝を制御し、増殖・維持に寄与している可能性が考えられた。また、白血病幹細胞は細胞内 ROS レベル高いことから、正常幹細胞とは異なる ROS 抵抗性あるいは生存機構を持つことが予想された。そこで本研究では、TIN2 の細胞内局在の変動が造血幹細胞の機能に与える影響を明らかにするとともに、白血病幹細胞におけるミトコンドリア TIN2 を介したエネルギー代謝調節機構と ROS に対する抵抗性・生存優位性を規定する機構を明らかにすることを目的とした。さらに、正常造血幹細胞との「違い」を基に、がん治療のための新規標的を同定し、がん幹細胞の選択的除去に向けた技術基盤を確立することを目指して研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 正常造血幹細胞における TIN2 の機能解析

TIN2 は TPP1・POT1 と結合することで核内に移行し、Shelterin 複合体を形成する。したがって、POT1 と TPP1 は TIN2 の細胞内局在の制御に何らかの働きをもつと考えられる。そこで、Pot1a ノックアウト (KO) マウス造血幹細胞における TIN2 の局在を解析し、さらに、Pot1a KO 造血幹細胞の ROS 産生レベルを解析した。また、レトロウイルスを用いて造血幹細胞に TPP1 を導入し、TIN2 の細胞内局在、ミトコンドリア膜電位、ROS 産生に及ぼす作用を解析した。

TIN2 の N 末端にはミトコンドリア移行シグナル (mitochondrial targeting sequences, MTS) と TPP1 の結合に必要な Tpp1/Trf2 recruit domain (TRD) が重複しており、TIN2 [F37D/L38E] 変異体は TPP1 との結合がないためミトコンドリアに偏在する³。そこで、TIN2 [F37D/L38E] を発現するレトロウイルスを作製し、造血幹細胞に導入して TIN2 をミトコンドリアに偏在させた条件下で造血幹細胞の代謝活性化と骨髄再構築能の変化を解析した。

(2) 白血病幹細胞における TIN2 の機能解析

マウス Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺ (LSK) CD127⁻ 細胞にレトロウイルスを用いて MLL-AF9 を導入し、骨髄移植によって AML を発症したマウスから L-GMP 分画 (Lin⁻c-Kit⁺Sca-1⁻CD127⁻CD34⁺FcgR⁺GFP⁺) を分離した。次に、L-GMP と正常 GMP (n-GMP) (Lin⁻c-Kit⁺Sca-1⁻CD127⁻CD34⁺FcgR⁺GFP⁺) について、Shelterin 因子 POT1a, POT1b, TIN2, TPP1 の発現を解析した。さらに、L-GMP にレトロウイルスを用いて TIN2 を追加導入し、TIN2 の過剰発現が L-GMP の増殖に及ぼす影響について解析を行った。

(3) 細胞膜透過性 Shelterin タンパクの作製

造血幹細胞および L-GMP に Shelterin 因子群を導入するため、細胞膜透過性の可溶性タンパクを作製した。本研究では、これまでに我々が使用してきた membrane translocating motif (MTM) タグに代えて、6×His タグ + 核移行シグナル(NLS)を付与した可溶性タンパクの作製・精製を行った。

4. 研究成果

(1) 正常造血幹細胞における TIN2 の機能解析

造血幹・前駆細胞を標識できる Runx1 Enhancer⁴の制御下で CreERT を発現するマウス(シンガポール国立大学がん科学研究所より供与)と Pot1a^{fllox/fllox} マウスを交配し、タモキシフェン投与によって造血幹細胞で Pot1a を欠失させた後、TIN2 の局在を解析した。その結果、野性型造血幹細胞では TIN2 は核内に存在していたが、Pot1a KO 造血幹細胞では、ミトコンドリアに局在する TIN2 が増加していた(図 2A)。また、Pot1a KO 造血幹細胞では、ミトコンドリア膜電位の上昇と ROS 産生の亢進が見られた。

造血幹細胞の増殖を活性化させると、POT1a と TPP1 の発現量が減少し、相対的に TIN2 の量が増加して、ミトコンドリア TIN2 が増加すると予想された。そこで、LPS および Poly(I:C)をそれぞれマウスに投与し、造血幹細胞を活性化させた際の TIN2 の局在を検討した。その結果、予想通り、LPS および Poly(I:C)投与したマウスの造血幹細胞では、いずれもミトコンドリア TIN2 の著しい増加が見られた(図 2B, 2C)。

次に、造血幹細胞に TPP1 を導入し、培養後のミトコンドリア TIN2 の細胞内局在と代謝の活性化に及ぼす作用を検討したところ、TPP1 の導入によって、TIN2 のミトコンドリア移行が抑制され(図 2D)、ROS 産生も低下することが分かった。

次に、TIN2 [F37D/L38E]を導入し、TIN2 のミトコンドリアへの偏在が造血幹細胞の機能に及ぼす影響を検討したところ、ミトコンドリア膜電位の増加と ROS 産生の亢進が見られた。さらに、骨髓移植実験の結果、TIN2 [F37D/L38E] 導入造血幹細胞は骨髓再構築能が著しく低下した(図 3)。

以上の結果から、正常造血幹細胞では POT1a および TPP1 が TIN2 のミトコンドリア移行を抑制することで、未分化性を維持していると考えられた。

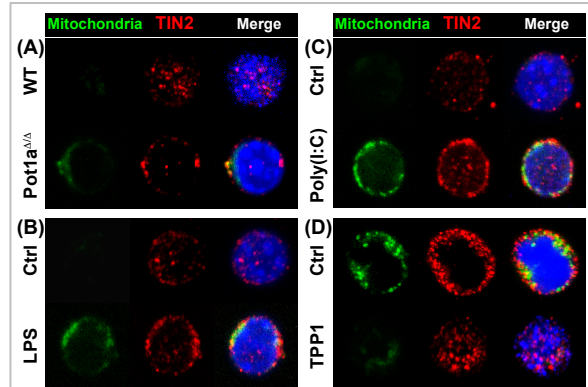


図2. 造血幹細胞におけるTIN2の細胞内局在 (A) Pot1a KOマウス、(B) LPS投与(16時間後)、(C) Poly(I:C)投与(24時間後)、(D) TPP1を過剰発現した造血幹細胞

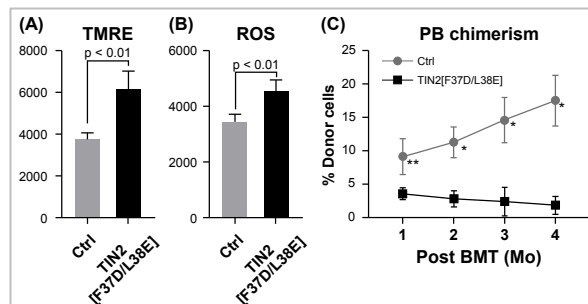


図3. TIN2[F37D/L38E]の導入による造血幹細胞の機能低下 (A) ミトコンドリア膜電位、(B) 細胞内ROSレベル、(C) 骨髓再構築能

(2) 白血病幹細胞における TIN2 の機能解析

L-GMP では、ミトコンドリア TIN2 が増加し、ROS 産生が亢進していたことから、ミトコンドリア TIN2 が白血病幹細胞の増殖・維持に必要なエネルギー代謝に関わることが想定された。まず、L-GMP と n-GMP について、POT1a、TPP1、TIN2 の発現レベルを解析したところ、L-GMP では n-GMP と比べて、POT1a、TIN2 の発現の上昇し、その一方で TPP1 の発現が低下していることが分かった(図 4A)。この結果から、L-GMP では POT1a、TPP1、TIN2 の量的不均衡が生じることで、ミトコンドリア TIN2 が増加したと考えられた。

次に、MLL-AF9 を導入して作製した L-GMP に対して、TIN2 をレトロウイルスによって追加導入し、TIN2 量を過剰に増加させた場合の L-GMP の増殖を検討した。その結果、L-GMP であっても、TIN2 が過剰に存在すると増殖が抑制されることが示された(図 4B)。しかしながら、この実験では、レトロウイルスを2度にわたって感染させていることから、実験操作自体が細胞増殖・生存に影響した可能性も考えられた。そこで、今後は細胞膜透過性タンパクを用いることで、ウイルスベクターを用いずに TIN2 を導入する必要があると考えられた。

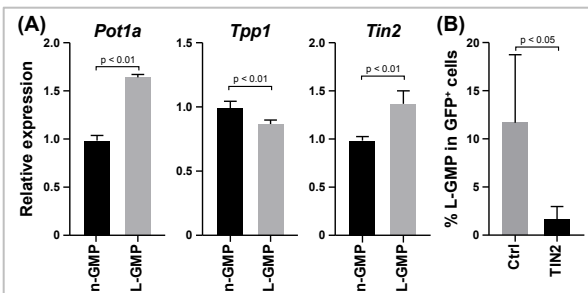


図4. L-GMPにおけるShelterin因子の発現と増殖に対するTIN2の作用 (A) n-GMPとL-GMPにおけるPot1a, Tpp1, Tin2の発現比較 (B) レトロウイルスを用いたTIN2の過剰発現によるL-GMPの増殖抑制

(3) 細胞膜透過性 Shelterin タンパクの作製

POT1 は MTM タグを付与したタンパクを作製した。一方、TPP1 は同じ方法(MTM タグ付加バージョン)では十分な量が得られなかった。MTM タグは疎水性で不溶性封入体を形成しやすく、また、精製が難しいケースが多いため、代替策として 6 × His + NLS を用いた TPP1 タンパクの作製を行った。これまでに、TPP1 の可溶性タンパクを効率よく作製・精製することができ、さらには得られたタンパクが細胞膜透過性を持っていることが確認できた。

これまでの研究成果から、正常造血幹細胞では、TIN2 のミトコンドリア移行を抑制することが自己複製能の維持に重要であることが明らかとなった。一方、白血病幹細胞では、ミトコンドリア TIN2 がエネルギー代謝の制御に関わるものの、ミトコンドリア TIN2 が過剰になりすぎると、増殖が抑制される可能性を示唆するデータも得られたことから、より詳細かつ慎重な検討が必要であると考えられた。

今後の展開としては、L-GMP に TPP1 と POT1a のタンパクを導入し、TIN2 のミトコンドリアへの局在を抑制することで、移植実験系で白血病発症を抑制できるか検討する予定である。

<引用文献>

1. de Lange T. How telomeres solve the end-protection problem. *Science* (80-). 2009;326(5955):948-952. doi:10.1126/science.1170633
2. Hosokawa K, MacArthur BD, Ikushima YM, et al. The telomere binding protein Pot1 maintains haematopoietic stem cell activity with age. *Nat Commun.* 2017;8(1). doi:10.1038/s41467-017-00935-4
3. Chen LY, Zhang Y, Zhang Q, et al. Mitochondrial Localization of Telomeric Protein TIN2 Links Telomere Regulation to Metabolic Control. *Mol Cell.* 2012;47(6):839-850. doi:10.1016/j.molcel.2012.07.002
4. Ng CEL, Yokomizo T, Yamashita N, et al. A Runx1 intronic enhancer marks hemogenic endothelial cells and hematopoietic stem cells. *Stem Cells.* 2010;28(10). doi:10.1002/stem.507

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kobayashi Hiroshi, Morikawa Takayuki, Okinaga Ayumi, Hamano Fumie, Hashidate-Yoshida Tomomi, Watanuki Shintaro, Hishikawa Daisuke, Shindou Hideo, Arai Fumio, Kabe Yasuaki, Suematsu Makoto, Shimizu Takao, Takubo Keiyo	4. 巻 28
2. 論文標題 Environmental Optimization Enables Maintenance of Quiescent Hematopoietic Stem Cells Ex Vivo	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 145 ~ 158.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.06.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kidoya Hiroyasu, Muramatsu Fumitaka, Shimamura Teppei, Jia Weizhen, Satoh Takashi, Hayashi Yumiko, Naito Hisamichi, Kunisaki Yuya, Arai Fumio, Seki Masahide, Suzuki Yutaka, Osawa Tsuyoshi, Akira Shizuo, Takakura Nobuyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Regnase-1-mediated post-transcriptional regulation is essential for hematopoietic stem and progenitor cell homeostasis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1072
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-09028-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 新井 文用	4. 巻 61
2. 論文標題 造血幹細胞の維持と増幅におけるShelterin因子POT1の機能	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 1064 ~ 1070
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.61.1064	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Arai Fumio, Stumpf Patrick S., Ikushima Yoshiko M., Hosokawa Kentaro, Roch Aline, Lutolf Matthias P., Suda Toshio, MacArthur Ben D.	4. 巻 11
2. 論文標題 Machine Learning of Hematopoietic Stem Cell Divisions from Paired Daughter Cell Expression Profiles Reveals Effects of Aging on Self-Renewal	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Systems	6. 最初と最後の頁 640 ~ 652.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cels.2020.11.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Gotoh Kazuhito, Kunisaki Yuya, Mizuguchi Soichi, Setoyama Daiki, Hosokawa Kentaro, Yao Hisayuki, Nakashima Yuya, Yagi Mikako, Uchiumi Takeshi, Semba Yuichiro, Nogami Jumpei, Akashi Koichi, Arai Fumio, Kang Dongchon	4. 巻 23
2. 論文標題 Mitochondrial Protein Synthesis Is Essential for Terminal Differentiation of CD45 ⁺ TER119 ⁺ Erythroid and Lymphoid Progenitors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101654 ~ 101654
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101654	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Konno Katsuhiko, Kulkeaw Kasem, Sasada Manabu, Nii Takenobu, Kaneyuki Ayako, Ishitani Tohru, Arai Fumio, Sugiyama Daisuke	4. 巻 25
2. 論文標題 A novel method to purify neutrophils enables functional analysis of zebrafish hematopoiesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 770 ~ 781
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12810	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Stumpf Patrick S, Arai Fumio, MacArthur Ben D	4. 巻 17
2. 論文標題 Heterogeneity and 'memory' in stem cell populations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physical Biology	6. 最初と最後の頁 065013 ~ 065013
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1478-3975/abba85	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Stumpf Patrick S., Du Xin, Imanishi Haruka, Kunisaki Yuya, Semba Yuichiro, Noble Timothy, Smith Rosanna C. G., Rose-Zerili Matthew, West Jonathan J., Oreffo Richard O. C., Farrahi Katayoun, Niranjana Mahesan, Akashi Koichi, Arai Fumio, MacArthur Ben D.	4. 巻 3
2. 論文標題 Transfer learning efficiently maps bone marrow cell types from mouse to human using single-cell RNA sequencing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 736 ~ 746
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01463-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Stumpf Patrick S., Arai Fumio, MacArthur Ben D.	4. 巻 28
2. 論文標題 Modeling Stem Cell Fates using Non-Markov Processes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 187 ~ 190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stem.2021.01.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学大学院医学研究院幹細胞再生修復医学分野ホームページ
<http://www.scr.med.kyushu-u.ac.jp>

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
英国	サウサンプトン大学			
ドイツ	アーヘン工科大学			