

平成 27 年 5 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670453

研究課題名(和文) テロメア結合蛋白POT1の増強によるヒト造血幹細胞の体外増幅技術への挑戦

研究課題名(英文) Challenge to the ex vivo expansion technology of human hematopoietic stem cells by exogenous telomere-binding protein POT1

研究代表者

細川 健太郎 (Hosokawa, Kentaro)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90569584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々はまず、過度な分裂の繰り返しによって造血幹細胞におけるPot1の発現が低下することを見出した。そこで外因性にPot1を供給することで造血幹細胞のテロメア保護作用を維持し、DNA損傷応答や細胞老化を抑制できることを見出した。さらに、増幅された細胞の骨髄再構築能に基づく幹細胞活性も対照群と比較して有意に高いことから、機能性の造血幹細胞が増幅されたと考えられた。一方で、ヒト造血幹細胞に対しても、同様に培養下でhPOT1の供給を行うことで、DNA損傷応答を軽減し、高い幹細胞活性を示すヒト造血幹細胞を増幅することができた。今後、この培養技術をもとにした安全かつ効率的な体外増幅技術の確立が期待される。

研究成果の概要(英文)：Repeated cell divisions induce DNA damage accumulation, which impair stem cell function during ageing. However, the general molecular mechanisms by which this occurs remain unclear. Here, we show that expression of Pot1a, a component of shelterin, is crucial for the prevention of telomeric DNA damage response (DDR) and maintenance of hematopoietic stem cell (HSC) activity during ageing. We observed that HSCs express high levels of Pot1a during development, yet this expression declines with age. Knockdown of Pot1a induced an age-related phenotype, marked by increased telomeric DDR, and reduced long-term reconstitution activity. In contrast, overexpression of Pot1a or treatment with exogenous Pot1a protein prevented telomeric DDR, enhanced telomerase activity. Similar result was observed upon treatment of human HSCs with recombinant human POT1 protein. These results highlight a general, reversible mechanism by which ageing compromises mammalian stem cell activity.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：造血幹細胞 体外増幅 テロメア DNA損傷応答 老化 自己複製

## 1. 研究開始当初の背景

生体組織を長期に亘って維持するためには、幹細胞を頂点としたシステム、特に幹細胞の自己複製能と多分化能の維持が不可欠である。近年、造血幹細胞増幅の研究領域では、自己複製に関連した分子を操作し、造血幹細胞の自己複製を促進する報告がされているが(Krosil J et al., 2003; Suzuki T et al., 2006; Delaney C et al., 2010)、いずれも増殖時に起こるストレスには着目しておらず、これらの方法では、その影響を受けることが考えられる。細胞分裂の過程で起こり得る DNA ダメージを検知/修復する機構に、Replication Protein A (RPA)-ATR 経路が知られている。この機構は分裂時に露出する一本鎖テロメア DNA も認識し、細胞を老化や細胞死へと誘導するが、健全細胞においては shelterin 複合体の一つ Pot1 によって ATR の経路が競合阻害されている。Pot1 は、一本鎖テロメア DNA に特異的に結合し、テロメアのループ形成および染色体の安定性に寄与している(Hockemeyer D et al., 2006)。

## 2. 研究の目的

幹細胞は多分化能および自己複製能を持つ細胞と定義され、個体や組織の発生・維持などに重要な役割を果たしていると考えられている。近年造血機能回復を目的とした造血幹細胞移植が行われ、幹細胞に対する需要は高い。しかし体外培養により誘導される幹細胞の老化や細胞死が障壁となるため、安定的な造血幹細胞の増幅は未だ成功していない。そこで本研究では、一本鎖テロメア DNA 結合性タンパク質 Pot1 に着目し、造血幹細胞における分裂時のテロメア DNA の安定性と自己複製能の維持について検討する。さらにこの知見を基盤にして、これまでにないヒト造血幹細胞の体外増幅技術の開発を目指す。以上より、Pot1 という種を越えて保存された根元的な分子の作用機序を明らかにすることで、幹細胞の増幅という究極のテーマに挑戦する。

## 3. 研究の方法

1) Tert 欠損マウスを用いたテロメレースに関する mPot1a の機能解析：mPot1a の作用がテロメレースを介したものであるかを確認するために、Tert 欠損マウス由来造血幹細胞に mPot1a を導入し、骨髄再構築能を比較した。

2) mPot1a の過剰発現がテロメア長の維持に及ぼす影響の検討：mPot1a を導入した野生型および Tert 欠損マウス由来造血幹細胞を移植し、生着後 4 か月以上経過した後にドナー由来造血幹細胞のテロメア長を telomere Flow FISH 法を用いて比較した。mPot1a がテロメレース等を介してテロメア伸長活性を制御している場合、移植後においてもテロメア長の短小化が抑制されていることが考えられる。

3) mPot1a の導入による ATR 経路の制御機構の検討：mPot1a の過剰発現系において、移植後の造血幹細胞のテロメア領域における DNA 損傷応答を免疫染色法により ATR チェックポイントシグナル分子群 (RPA、ATR、Chk1) および DNA 損傷マーカー 53BP1 について解析した。これまでに申請者は、移植された造血幹細胞のテロメア領域の DNA ダメージ応答が、mPot1a の過剰発現によって抑制されることを見出しているが、その機構が ATR シグナルの抑制によるものであるかを確認した。

4) mPot1a タンパクの導入による造血幹細胞の体外増幅に対する検討：mPot1a を添加する培養条件で得られた造血幹細胞の骨髄再構築活性の定量を行うために、限界希釈法を用いた移植を実施した。また mPot1a 処理によって得られた造血幹細胞のテロメア領域における安定性について、DNA 損傷応答を基準に評価し、この細胞のテロメアの安定性を元の細胞と比較した。このような検討からマウスにおける造血幹細胞増幅のための至適培養条件を見出すことを目標とした。

5) ヒト POT1 タンパクの直接導入によるヒト造血幹細胞の増幅方法の確立：mPot1a を用いたマウス造血幹細胞の増幅方法を、ヒト臍帯血造血幹細胞に応用し、実際に ex vivo で増幅できる条件を検討した。細胞膜を透過する MTM 結合型組換え hPOT1 の未分化な造血幹細胞に対する機能を検討するために、造血幹細胞を hPOT1 存在下で培養し、免疫不全マウスへの移植を行って機能面・安全面の検討を行い、至適培養条件の確立を目指した。

## 4. 研究成果

1) Tert 欠損マウスを用いたテロメレースに関する mPot1a の機能解析：野生型及び Tert 欠損マウス由来造血幹細胞に対し、レトロウイルスベクターを用いて Pot1a を導入し、長期骨髄再構築能の比較を行った結果、Pot1a 導入群はコントロール群と比較して有意に高い骨髄再構築能を示した。一方で Tert 欠損群と対照群を比較すると、Tert 欠損群の骨髄再構築能は著明に低下していることから、造血幹細胞の自己複製能の維持機構において Tert の役割が重要であることが分かった。これらのことから、外因性 Pot1a の機能は Tert 非依存性であるが、自己複製能の維持に両者の存在は不可欠であることが示された。

2) mPot1a の過剰発現がテロメア長の維持に及ぼす影響の検討：Pot1a をレトロウイルスにより導入した野生型および Tert 欠損マウス由来造血幹細胞を移植し、ドナー由来造血幹細胞のテロメア長の比較を行った。その結果、4 群のテロメア長にいずれも有意差はなく、テロメレースの持つテロメア伸長活性に対

し、Pot1a の強制発現の影響はないことが示唆された。

3) mPot1a の導入による ATR 経路の制御機構の検討: mPot1a の過剰発現系において、移植後の造血幹細胞のテロメア領域における DNA 損傷応答を免疫染色法により ATR チェックポイントシグナル分子群 (RPA、ATR、Chk1) および DNA 損傷マーカー-53BP1 について解析した。各 ATR シグナル分子の foci がテロメア領域に存在するものを Telomere dysfunction-induced foci (TIF)として計測した結果、一細胞あたりの TIF の数が Pot1a 導入群では対照群と比較して有意に低いことが分かった。このことから造血幹細胞における Pot1a の強制発現が ATR シグナルを抑制していることが考えられた。

4) mPot1a タンパクの導入による造血幹細胞の体外増幅に対する検討: 外因性細胞膜透過性タンパク質 MTM-Pot1a を添加する培養条件にて、マウス造血幹細胞の体外増幅を行い、さらに限界希釈法を用いてその骨髄再構築活性の定量を行った。その結果、MTM-Pot1a を添加した群では約 2.8 倍の幹細胞活性を有することが分かった。また MTM-Pot1a 処理によって得られた造血幹細胞のテロメア領域における DNA 損傷応答を基準にその安定性を検討したところ、MTM-Pot1a 添加群では有意に DNA 損傷応答を抑制していることを見出した。

5) ヒト POT1 タンパクの直接導入によるヒト造血幹細胞の増幅方法の確立: 遺伝子発現解析の結果、ヒト骨髄または臍帯血造血幹細胞においてもマウスと同様に、未分化な分画において POT1 およびシエルタリン因子群の発現が有意に高いことが分かった。また、臍帯血由来造血幹細胞における POT1 の発現は、成体骨髄由来造血幹細胞よりも有意に高いことを見出した。一方で、同じ骨髄由来でも老齢になると POT1 の発現が低下することから、ヒト造血幹細胞の老化と POT1 の発現の低下に関連性があることが示唆された。マウス造血幹細胞の体外培養の解析結果から、分裂が亢進するにつれて Pot1 の発現は低下し、DNA 損傷応答が増加することを明らかにしている。また、老齢マウス由来造血幹細胞は、Pot1 の発現が低くさらに体外培養により著明な DNA 損傷応答を引き起こすが、この培養下に外因性膜透過タンパク質の導入技術を用いて mPot1a を導入した結果、有意に骨髄再構築能の回復が見られることを明らかにした。このことから、培養による Pot1 の発現低下を抑えることで、DNA 損傷応答と細胞老化および自己複製能の低下を抑制することができたと考えられる。この結果をもとに、ヒト臍帯血由来造血幹細胞の体外培養時における POT1 の発現低下による DNA 損傷応答の抑制のため、外因性 hPOT1 の導入を

行ったところ、対照群と比較して有意に DNA 損傷応答を抑制することを見出した。さらにこの添加条件を用いて体外培養後、ヒト未分化造血幹細胞の実数を計測したところ、対照群と比較して約 2 倍の増幅効果を認めた。一方で、この増幅された細胞の骨髄再構築能を検討するため、免疫不全マウスに対し限界希釈骨髄移植を行って算定したところ、対照群と比較して幹細胞活性として約 4.5 倍の高い活性を示すことを明らかにした。(論文投稿中)

#### 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 4 件)

1) Ikushima YM, Arai F, Hosokawa K, Toyama H, Takubo K, Furuyashiki T, Narumiya S, Suda T. Prostaglandin E(2) regulates murine hematopoietic stem/progenitor cells directly via EP4 receptor and indirectly through mesenchymal progenitor cells. *Blood*. 121 (11): 1995-2007, 2013 (査読有)

2) Yamashita M, Nitta E, Nagamatsu G, Ikushima YM, Hosokawa K, Arai F, Suda T. Nucleostemin is indispensable for the maintenance and genetic stability of hematopoietic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 441 (1): 196-201, 2013 (査読有)

3) Horio E, Kadomatsu T, Miyata K, Arai Y, Hosokawa K, Doi Y, Ninomiya T, Horiguchi H, Endo M, Tabata M, Tazume H, Tian Z, Takahashi O, Terada K, Takeya M, Hao H, Hirose N, Minami T, Suda T, Kiyohara Y, Ogawa H, Kaikita K, Oike Y. Role of Endothelial Cell-Derived Angptl2 in Vascular Inflammation Leading to Endothelial Dysfunction and Atherosclerosis Progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 34 (4): 790-800, 2014 (査読有)

4) Sakamoto H, Takeda N, Arai F, Hosokawa K, Garcia P, Suda T, Frampton J, Ogawa M. Determining c-Myb Protein Levels Can Isolate Functional Hematopoietic Stem Cell Subtypes. *Stem Cells*. 33 (2):479-90., 2015 (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

[国際会議における発表(いずれも査読あり)]

1) Kentaro Hosokawa, Toshio Suda and Fumio Arai.: Shelterin component protection of telomeres 1 (Pot1) plays a critical role in the self-renewal of HSCs. ISEH 42th Annual Scientific Meeting. Vienna, Austria, August, 2013

2) Kentaro Hosokawa, Yoshiko Ikushima, Benjamin MacArthur, Toshio Suda, Fumio Arai.

POT1 regulates self-renewal activity of cord blood hematopoietic stem cells. ISEH 43th Annual Scientific Meeting. Montreal, Canada, August, 2014

[国内学会・シンポジウム等における発表（いずれも査読あり）]

3) Kentaro Hosokawa, Fumio Arai, Yumiko Gomei and Toshio Suda: Functional analysis of POT1 in the maintenance of Hematopoietic stem cells.

第 11 回幹細胞シンポジウム（東京）平成 25 年 5 月

4) Kentaro Hosokawa, Toshio Suda and Fumio Arai: 造血幹細胞の自己複製に対するテロメア結合因子 Pot1 の機能解析

第 75 回日本血液学会学術集会（札幌）平成 25 年 10 月

5) Kentaro Hosokawa, Yoshiko Ikushima, Benjamin MacArthur, Toshio Suda, Fumio Arai: Pot1 regulates hematopoietic stem cell activity during aging

第 12 回幹細胞シンポジウム（福岡）平成 26 年 5 月

〔図書〕（計 0 件）

〔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：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.scr.med.kyushu-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

細川 健太郎 (Hosokawa Kentaro)

九州大学大学院・医学研究院・助教

研究者番号：90569584

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：