

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09469

研究課題名(和文) 脱ユビキチン化酵素USP10による造血幹細胞および白血病幹細胞維持機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of the maintenance of hematopoietic and leukemia stem cells by deubiquitinating enzyme USP10

研究代表者

樋口 雅也 (HIGUCHI, Masaya)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：50334678

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)：細胞内ストレス応答に関わる脱ユビキチン化酵素USP10のノックアウト(KO)マウスを作製した。KOマウスは骨髄不全を伴う重度の貧血により生後1年以内にすべて死亡した。骨髄不全は造血幹細胞(Hematopoietic Stem Cell: HSC)のアポトーシスによる枯渇が原因であり、HSCのアポトーシスは胎生14.5日に始まっていた。胎仔肝臓由来のUSP10 KO HSCを野生型(WT)照射マウスに移植しても血球系細胞の再構築は認められず、逆にWT HSCをKOマウスに移植すると完全に再構築できた。したがってUSP10はHSCの維持に必須の脱ユビキチン化酵素であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Ubiquitin specific peptidase 10 (USP10) is involved in cellular stress responses and we made USP10 knockout (KO) mice to analyze its in vivo functions. All USP10 KO mice died within 1 year after birth because of bone marrow failure with pancytopenia. Bone marrow failure in these USP10-KO mice was associated with remarkable reductions of hematopoietic stem cells (HSCs) in bone marrow and fetal liver. Such USP10-KO fetal liver started to exhibit enhanced apoptosis of HSCs at around E14.5. Transplantation of USP10 KO HSCs into irradiated WT mice failed to reconstitute multilineage hematopoiesis, whereas transplantation of USP10-competent bone marrow cells into USP10-KO mice did. These results suggest that USP10 is an essential deubiquitinase for hematopoiesis and functions by inhibiting apoptosis of HSCs.

研究分野：血液学 ウイルス学 細胞生物学

キーワード：USP10 造血幹細胞 脱ユビキチン化酵素 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

我々は HTLV-1 のトランスフォーミング蛋白 Tax に結合する細胞因子として Ubiquitin Specific Peptidase 10 (USP10) を同定した。USP10 はユビキチン化された蛋白質からユビキチンを切断する脱ユビキチン化酵素活性を持つ分子であった。

USP10 は RNA 結合蛋白である G3BP と複合体を形成し、ストレス顆粒の形成において重要な働きをもつ。ストレス顆粒とは細胞が様々なストレス (ウイルス感染、活性酸素、紫外線、ヒートショック、小胞体ストレスなど) に曝された際に誘導性に作られる、mRNA と RNA 結合蛋白の集合体である。ストレス顆粒は、上記ストレスによる細胞障害を最小限に食い止める役割を果たしている。USP10 はストレス顆粒に局在することによって、細胞内活性酸素種 (ROS) の産生を低下させることが明らかとなった。一方で、HTLV-1 Tax は USP10 と結合し、ストレス顆粒形成を阻害し、細胞内 ROS を上昇させる。この ROS の上昇が HTLV-1 感染細胞の増殖を促進し、ATL の発症につながることを我々は提唱した。以上より USP10 は、ストレス応答、なかでも ROS の産生抑制において重要な制御因子であり、ウイルスに対する抑制因子としても機能することを明らかにした。

次に我々は、USP10 の生体内機能を明らかにするために、USP10 ノックアウト (USP10-KO) マウスを作製した。USP10-KO マウスは成長遅延を示し、1年以内にすべてのマウスが死亡した。病理組織解析の結果、USP10-KO マウスは骨髄造血不全をとまなう重度の貧血に陥っていることが判明した。また生後 8 週の KO マウスの骨髄細胞を FACS により解析したところ、造血幹細胞 (Hematopoietic Stem Cell: HSC) を含む Lineage⁻ Sca-1⁺c-Kit⁺ (LSK) の分画の消失が認められた (図 1)。

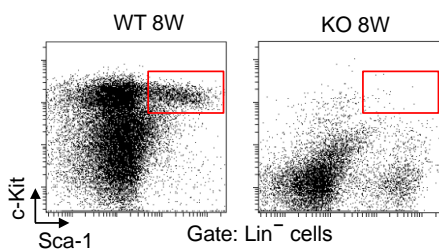


図 1 USP10 KO マウスにおける HSC の消失

これらの結果より、生体内において USP10 は HSC の維持に必須の分子であることが明らかとなった。ストレス応答反応の異常が HSC の消失につながることは、数多くの先行研究により示されており、USP10-KO マウスの表現型も、この事実と合致する。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて本研究では、

USP10-KO マウスを研究材料として、造血幹細胞および白血病幹細胞の維持における USP10 の機能を明らかにすることを目的とする

(1) USP10-KO マウスにおける HSC 減少時期の同定

USP10-KO マウスは 8 週齢の時点で HSC がほぼ消失する (図 2)。HSC の減少が生後どの段階から始まるのかを同定するために、週齢ごとに KO マウス骨髄の HSC 数を FACS 解析により計測する。HSC の減少が胎児の段階から始まる可能性もあるため、胎児より肝臓細胞を分離し、HSC 数を定量する。

(2) USP10-KO HSC 移植による血球系細胞再構築の解析

USP10-KO マウスでみられる HSC の消失が、HSC の異常によるものなのか、あるいは幹細胞ニッチなどの HSC 以外の異常に起因するものなのかを明らかにするために、USP10-KO マウスより HSC を採取し、放射線照射を施したレシピエントマウスに移植することで、野生型 (WT) 環境における USP10-KO HSC の血球系細胞再構築能を定量する。逆に USP10-KO マウスに USP10-WT の HSC を移植することで、KO マウス内において血球系細胞構築がレスキューされるかを検討する。

(3) USP10-KO マウスにおける HSC 減少の原因解明

USP10-KO マウスにおいて HSC がなぜ減少するのか、そして HSC にどのような異常が起こっているのかは不明である。HSC の消失が細胞周期の異常によるものなのか、もしくは細胞死によるものなのかを、FACS 解析により明らかにする。また、in vitro で培養した USP10-KO HSC に様々なストレスを与え、ストレス下における USP10-KO HSC の異常事象を生化学的解析により明らかにする。

(4) USP10 が脱ユビキチン化する標的基質分子の同定

USP10 が脱ユビキチン化する標的基質分子としていくつかの報告があるが、いずれも USP10-KO マウスの表現型とは合致しない。したがって、造血幹細胞の維持に関与する未知の USP10 標的基質分子が存在することが予想される。質量分析を用いた解析により、新たな USP10 の基質分子を同定する。

(5) 白血病幹細胞における USP10 の機能解析

白血病幹細胞は白血病の発症、病態、治療抵抗性などに深く関与している。白血病モデルマウスを用いて、白血病幹細胞維持における USP10 の機能を解析し、USP10 をターゲットとした白血病治療のための基礎的情報を得る。

3. 研究の方法

(1) USP10-KO マウスにおける HSC 減少時期の同定

HSC の著減が生後どの段階から始まるのかを明らかにするために、1 週齢の USP10-KO マウスから骨髓細胞を分離し、Lineage、Sca-1、c-Kit 抗体の染色により LSK 分画の細胞を定量する。さらに、CD150、CD48 の染色も加え、LSK 分画のうち Long-term (LT) HSC、Multipotent Progenitor (MPP)、Hematopoietic Progenitor Cell (HPC)、Lineage Committed Progenitor (LCP) のどの細胞集団が減少しているのかを明らかにする。もし 1 週齢の段階で LSK 細胞の著減が認められた場合には、胎生 14.5 日齢および 17.5 日齢の胎児より肝臓細胞を調製し、LSK、CD150、CD48 の染色により胎児肝臓の造血幹細胞数を計測する。

(2) USP10-KO HSC 移植による血球系細胞再構築の解析

USP10-KO マウス (Ly-5.2) より HSC を採取し、放射線照射を施したレシピエントマウス (Ly-5.1) に野生型 (WT) の骨髓細胞 (Ly-5.1) とともに移植する。移植マウスの末梢血を経時的に採取し、骨髓系細胞、B 細胞、T 細胞中の Ly-5.2 陽性細胞の割合を FACS にて計測する。以上の解析によって、WT 環境における USP10-KO HSC の血球系細胞再構築能を定量する。逆に USP10-KO マウスに WT マウスの HSC を移植することで、USP10-KO マウス内において血球系細胞構築がレスキューされるかを検討する。

(3) USP10-KO マウスにおいて HSC が著減するメカニズムの解明

細胞周期およびアポトーシスの解析

USP10-KO マウスの骨髓あるいは胎児肝臓の HSC 分画を固定後、Ki-67 抗体およびヘキストにより染色し、G0 期を含めた HSC の細胞周期を解析する。さらに AnnexinV および DAPI 染色により HSC 分画の細胞死を定量する。これらの解析により、HSC の著減が細胞周期の異常によるものなのか、もしくは細胞死によるものなのかを明らかにする。

HSC における ROS 産生量の測定

我々の *in vitro* 解析の結果は、USP10 欠損が細胞内 ROS の上昇を招くことを示した。そこで、USP10-KO HSC における ROS の量を蛍光プローブ (CellRox Green) により測定する。

in vitro HSC 培養系を用いた解析

HSC は SCF や TPO などのサイトカイン添加培地で短期間培養することが可能である。USP10-KO マウスの骨髓あるいは胎児肝臓より HSC を分離後、*in vitro* 培養を行い、サイトカイン除去、栄養飢餓、低酸素、小胞体ストレスなどのストレスを与え、USP10-KO

HSC のストレス感受性を検討する。さらに、ストレス下における USP10-KO HSC の細胞内事象の異常を生化学的解析も交えて明らかにする。

(4) USP10 標的分子の同定

USP10-KO マウス繊維芽細胞株 (MEF) にタグを付加した WT-USP10 もしくは 脱ユビキチン化酵素活性をなくした変異型 USP10 を安定発現させる。これらの細胞より抗タグ抗体を用いて USP10 複合体を精製し、1 次元あるいは 2 次元ゲル電気泳動を行い、WT-USP10 でのみ免疫沈降される蛋白を検出する。ゲルから切り出した後に、LC-MS/MS を用いた質量分析により蛋白を同定する。USP10 結合蛋白のうち、USP10 による脱ユビキチン化によって安定化する蛋白を同定する。

(5) 白血病幹細胞における USP10 の機能解析

HSC に Bcr-Abl を発現させることで CML を発症するモデルマウスを作ることが可能である。そこで、ERT2-Cre をもつ USP10 Flox マウスを作製し、このマウスの HSC に Bcr-Abl をレンチウイルスにより導入後、レシピエントマウスに移植し、CML を発症させる。その後、白血病幹細胞の USP10 を Tamoxifen 投与によりロックアウトし、CML 幹細胞が消失するかを検討する。

4. 研究成果

(1) 1 週齢の USP10-KO マウスの骨髓では LSK 分画が著減し、さらに LSK CD150 (+) CD48 (-) の LT-HSC 数も著減していた (図 2)。

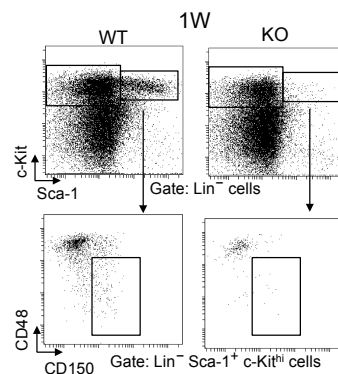


図 2 USP10-KO マウス(1 週齢)での LT-HSC の著減

週齢を遡り E17.5、E14.5 の胎児肝臓の解析を行ったところ LT-HSC の減少は E14.5 で始まっていた。一方で LCP を含む LK 分画では KO マウスでの減少は認められなかった (図 3)。以上より USP10-KO マウスでは LT-HSC の減少が E14.5 から認められることが明らかとなった。そして LT-HSC の特異的な減少が骨髓不全の原因であることが示唆された。

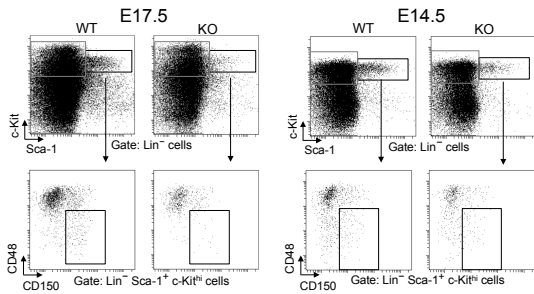


図3 USP10-KO 胎仔肝臓におけるLT-HSCの減少

(2) USP10-KO マウス胎仔肝臓細胞を照射 WT マウスに移植したところ、血球系細胞の再構築は認められなかった(図4左)。一方 WT マウス骨髄細胞を KO マウスに移植したところ Myeloid、B、T 細胞が完全にレスキューされた(図4右)。このことから USP10-KO マウスの骨髄不全はニッチ側の異常ではなく、造血幹細胞自身の異常により起こることが示された。

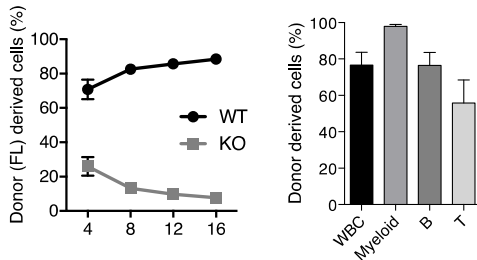


図4 造血幹細胞移植実験

(3) E14.5 胎仔肝臓の LT-HSC の細胞周期を検討したところ WT、KO 間で G0、G1 期の割合に差は認められなかった。また ROS の産生量にも差はなかった。しかしながら KO では LT-HSC、MPP、HCP のアポトーシスが亢進していた。一方 LCP のアポトーシス亢進は認められなかった。以上より USP10-KO マウスにおける造血幹細胞の減少は、アポトーシスによって起こっていることが明らかとなった(図5)。

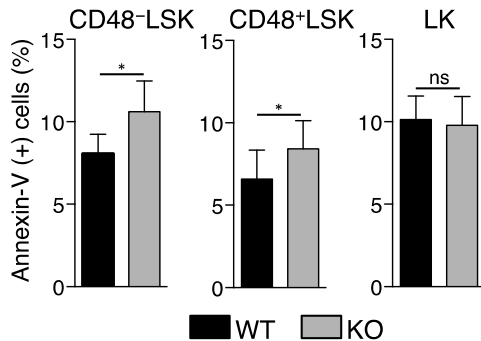


図5 USP10-KO HSC のアポトーシスの亢進

次に胎仔肝臓 HSC の *in vitro* 培養を行ったところ USP10-KO HSC はサイトカイン飢餓に対して脆弱性を示した。この表現形は WT の USP10 を戻すことでレスキューできたが脱ユビキチン活性を欠く変異体ではレスキ

ューできなかった。したがって USP10 は HSC において何らかの基質を脱ユビキチン化し、サイトカイン飢餓時のアポトーシスを抑制していることが示唆された。

(4) USP10 の基質を同定するため USP10 結合タンパク質の同定を試みた。予備実験としてマウス T 細胞株 CTLL-2 に PA-tag 付加 USP10 を安定発現させ、PA-tag 抗体により免疫沈降後、1D ゲルの銀染色を行った。特異的なバンドを切り出し LC-MS/MS を行ったところヒストン H1 が同定された。ヒストン H1 はリンカーヒストンとして機能するだけでなく、DNA 2 重鎖切断 (DSB) などの DNA ダメージの際にユビキチン化され、DNA 修復の最初のステップにおいて足場蛋白として機能する。そこで USP10 はヒストン H1 の脱ユビキチン化酵素であり、DNA ダメージ応答 (DDR) を制御するという仮説のもと、USP10 の DDR における機能を解析した。USP10-KO MEF 細胞を Zeocin 処理し DSB を誘導、 γ H2AX 抗体染色により DSB の程度をみたところ、USP10 KO MEF では処理前から DSB が有意に高く、Zeocin 処理後の修復も WT に比べ遷延化していた。この現象は各種ヒト細胞株の USP10 ノックダウンでも認められた。このことから USP10 は DDR において重要な機能をもつことが示唆された。今後は DDR の異常が USP10-KO マウスの表現型の原因であるか否か、さらに解析を進める予定である。

(5) Rosa26 遺伝子座に ERT2 Cre をノックインしたマウスと USP10 flox マウスを交配し、全身で USP10 をコンディショナルに KO するためのマウスを作成した。Tamoxifen 投与による KO の影響を調べるとともに、CML モデルマウスを使ったコンディショナル KO を行う予定である。

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3件)

Kozakai T, Takahashi M, Higuchi M, Hara T, Saito K, Tanaka Y, Masuko M, Takizawa J, Sone H, Fujii M. MAGI-1 expression is decreased in several types of human T-cell leukemia cell lines, including adult T-cell leukemia. *Int J Hematol.* 2018; 107:337-344. doi: 10.1007/s12185-017-2359-1. 査読有

Yamawaki K, Ishiguro T, Mori Y, Yoshihara K, Suda K, Tamura R, Yamaguchi M, Sekine M, Kashima K, Higuchi M, Fujii M, Okamoto K, Enomoto T. Sox2-dependent inhibition of p21

is associated with poor prognosis of endometrial cancer. Cancer Sci. 2017 108:632-640. doi: 10.1111/cas.13196. 査読有

Higuchi M, Kawamura H, Matsuki H, Hara T, Takahashi M, Saito S, Saito K, Jiang S, Naito M, Kiyonari H, Fujii M. USP10 Is an Essential Deubiquitinase for Hematopoiesis and Inhibits Apoptosis of Long-Term Hematopoietic Stem Cells. Stem Cell Reports. 2016 7:1116-1129. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.11.003. 査読有

〔学会発表〕(計3件)

宇谷 公一、清水 典明、樋口 雅也、リン酸化 SIRT1 は過剰な複製開始を防止することで染色体安定性へ寄与する、第76回日本癌学会学術総会、2017

樋口 雅也、大桑 孝子、姫田 敏樹、川村 宏樹、藤井 雅寛、脱ユビキチン化酵素 USP10 は造血幹細胞の維持に必須である、第53回日本細菌学会中部支部会、2016

樋口 雅也、川村 宏樹、原 敏文、高橋 雅彦、藤井 雅寛、脱ユビキチン化酵素 USP10 は造血幹細胞の維持に必須である、第77回日本血液学会学術集会、2015

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋口 雅也 (HIGUCHI, Masaya)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：50334678