

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09907

研究課題名(和文)造血幹細胞の未分化性維持に対する転写因子Foxp2の機能解析

研究課題名(英文)Function of Foxp2 in the maintenance of hematopoietic stem cells.

研究代表者

細川 健太郎 (Hosokawa, Kentaro)

九州大学・医学研究院・講師

研究者番号：90569584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究によって静止期造血幹細胞においてFoxp2の特異的発現があることを見出し、Foxp2が造血幹細胞の細胞周期を負に制御していることが示唆された。Foxp2欠損マウス由来造血幹細胞では造血幹細胞の細胞周期の活性化がみられ、また増殖時に見られるいくつかのシグナル経路の活性化や、エネルギー産生の亢進が示唆された。一方で、Foxp2を外因性に過剰発現させた造血幹細胞は、細胞周期抑制因子を高発現し、増殖促進するシグナル系を抑えることがわかった。またこの細胞は移植のストレスに耐え、骨髄再構築能を長期間に渡って維持できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血幹細胞が生体において長期間に渡って維持されるためには、細胞周期を低速に抑えることが必須であるが、これまでどのようなシグナル系を介して静止期に維持されるのかは不明であった。そこで本研究では、静止期造血幹細胞に特異的なFoxp2を介した維持機構について解析を行い、Foxp2が影響を与えるいくつかのシグナル経路を見出すことができた。さらに、造血幹細胞に対して外因性にFoxp2の発現を高めることで静止期の維持を促進し、幹細胞の活性自体も長期間に保持できることが分かった。本研究成果は、幹細胞制御技術の開発において重要な知見となることが考えられ、生体外でのヒト造血幹細胞の遺伝子治療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：This study found that Foxp2 was specifically expressed in quiescent hematopoietic stem cells (HSCs), and suggested that Foxp2 negatively regulates the cell cycle of HSCs. Foxp2-deficient mouse-derived HSCs were found to have activation of the cell cycle, activation of several signal pathways observed during proliferation, and enhancement of energy production. On the other hand, HSCs exogenously overexpressing Foxp2 were found to highly express CDK inhibitors and suppress the signal system that promotes proliferation. It was also shown that these cells can withstand the stress of transplantation and maintain long-term bone marrow reconstitution ability.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：造血幹細胞 細胞周期 Foxp2

1. 研究開始当初の背景

生体組織には幹細胞をヒエラルキーの頂点とした幹細胞システムが存在し、組織の恒常性を維持している。幹細胞には自己複製能と多分化能という特異な能力が備わっているが、幹細胞システムが適切に機能するためには、この自己複製能の正確な制御を必要とする。近年、体性幹細胞の動態は周囲の微小環境(幹細胞ニッチ)によって厳密に制御されており、幹細胞-ニッチ細胞間の接着分子やいくつかの環境因子が複合的に関わることで、幹細胞の細胞周期を静止させ分化を抑制することが明らかになっている。

これまでに我々は、造血幹細胞とその微小環境(ニッチ)の相互関係による自己複製能と静止状態の維持について研究を進め、Angiopoietin-1 (Angpt1)、Thpo、N-cadherin、PGE2などがニッチ分子として造血幹細胞の未分化性維持に働くことを報告してきた。また、これらのニッチ分子の中でも特に重要な Tie2/Angpt1 シグナルによって、造血幹細胞で誘導される因子の探索を進めた結果、転写因子 Foxp2 の発現が Control との比較において高度に誘導されることを見出した。

Foxp2 は、ヒトの家族性言語および音声障害の原因遺伝子であることや(Lai et al. 2001)、発生期から脳、肺、腸、骨組織および骨髄組織にも部分的に発現して器官形成を調節していることが報告されているが(French et al. 2007, Shu et al. 2007, Gascoyne et al. 2015)、造血幹細胞における Foxp2 の機能については不明な点が多い。これまでに我々は Foxp2 による造血幹細胞の未分化性の維持について研究を進め、以下のことを明らかにしている。

静止期造血幹細胞で特異的に Foxp2 が発現している
Angpt1 により Foxp2 の発現が誘導される
shRNA による Foxp2 の発現抑制により、造血幹細胞の長期培養後のコロニー形成能が低下し、逆に強制発現によって向上する
Foxp2 の強制発現により p21 の発現が誘導される
老齢マウス由来造血幹細胞では若齢よりも Foxp2 が著明に高発現する

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究成果を進展させ、以下に述べる点について明らかにすることを目的とした。

1. 生理的条件下における Foxp2 を介した未分化性維持機構の解明
Foxp2 の機能欠損マウス (Foxp2 の単一塩基置換を行った遺伝子改変マウス, Foxp2 KI マウス) および造血組織特異的に Foxp2 を欠損したマウス (Foxp2 cKO マウス) を用い、定常状態における造血幹細胞の未分化性の維持に対する Foxp2 の機能を明らかにする。
2. ストレス造血時における Foxp2 の機能解明
ストレス造血 (連続移植および 5-フルオロウラシル (FU) の投与、放射線照射) 後の造血組織回復期において、Foxp2 が造血幹細胞の細胞周期や自己複製の制御に与える影響を明らかにする。
3. Foxp2 の転写制御標的の同定
Foxp2 が静止期造血幹細胞に特異的に発現することから、細胞周期の制御に関与することが予想されたため、細胞周期制御因子や増殖制御因子に着目して候補の同定を行っていく。標的候補分子に関する発現増強および欠損マウスを用いた解析を行い、造血幹細胞の未分化性維持機構に対する影響を明らかにする。

3. 研究の方法

- 1) 定常状態におけるマウス HSC の解析: フローサイトメトリー (FCM) により、表面抗原の組み合わせから Lin-sca-1+c-Kit+CD48-CD150+CD34-(HSC)として分画し、全骨髄中の割合および絶対数を計測した。
- 2) マウス HSC の骨髄移植実験: マウス HSC を FACS により分離し、致死量放射線照射したレシピエントマウスにコンペティターとして骨髄単核球と共に注入し、4週間おきにドナー HSC 由来の血球キメリズムを末梢血において、FCM を用いて計測した。また、2次移植時は、放射線照射したレシピエントマウスに移植後 4 か月後の 1次移植マウスの全骨髄を移植した。その後の解析は 1次移植と同様に行った。移植後 4 か月後のマウス骨髄は、回収して FCM にて骨髄 HSC 中のキメリズムや細胞周期などを解析した。
- 3) 骨髄造血幹細胞の細胞周期解析は FCM にて、PyroninY-または Ki67-を指標として行った。

4. 研究成果

- 1) 造血幹細胞 (HSC) の Foxp2 を介した未分化性維持機構を解明するため、生体内の HSC における Foxp2 の機能、さらに 転写標的候補の発現制御に関して解析を行った。

Foxp2 KI マウスを用い、定常状態における HSC の未分化性維持に対する Foxp2 の機能を解析した。超音波発声に障害のあるホモマウスは被養育行動が持続せず、2-3 週齢で致死になるため、成体での解析が困難である。そこで今回はヘテロマウスの解析を行ったところ、HSC の分画自体や静止期にある割合が低下していることが分かった。さらに移植を行って骨髄再構築能比較すると、1 次移植における末梢血においては有意な差は認められなかったが、骨髄 HSC 分画においては Foxp2 KI マウス群においてキメリズムが有意に低下しており、静止期 (G0) の HSC 分画も減少していた。さらに、2 次移植を行ったところ、Foxp2 KI マウス群で末梢血キメリズムの低下が認められた。

予備実験の結果から Foxp2 の転写標的候補の一つとして p21 を選択した。この分子および Foxp2 の発現変化について、放射線照射後あるいは 5-FU 投与による骨髄抑制後の HSC において継時的に解析した。放射線照射した場合、4 時間後まで Foxp2 の発現は上昇し、以降は低下して 16 時間後には元の水準に戻った。また p21 も同様の発現様式を示していたことから、Foxp2 による p21 の発現制御への関与が示唆された。次に骨髄抑制による HSC の細胞周期変化に対し、day2 (静止期 HSC の割合が増加) では Foxp2 および p21 の発現が著明に上昇し、それ以降の細胞周期活性化時には発現が定常時の水準まで戻ることが分かった。以上の結果から、生理的環境下において Foxp2 は自己複製能の維持に関与しているが、特にストレス環境下においては、p21 の発現制御を介して細胞周期の静止期維持に機能していることが示唆された。

- 2) 造血幹細胞 (HSC) の Foxp2 を介した未分化性維持機構を解明するため、Foxp2 欠損マウスを用いた生理的条件下における HSC の表現型解析、および ストレス環境下の HSC における Foxp2 の機能解析を行った。

生理的条件下において HSC の表現型を解析するため、造血細胞特異的に Foxp2 を欠損するコンディショナル欠損 (cKO) マウスを用いて解析を行った。欠損マウスでは、前駆細胞レベルでの異常は見られなかったが、HSC および一部の多能性前駆細胞において有意に減少することが分かった。また、細胞周期の静止状態の維持についても障害されており、G0 期にある HSC が減少していた。また、この時の cKO マウスにおける細胞周期制御因子や増殖に関連した遺伝子発現は、静止状態が障害されていることを裏付けるものであった。

ストレス環境下における Foxp2 の機能解析を行うために、cKO マウスに対し、5-FU の投与による骨髄抑制を行い、その後の造血回復を比較したところ、コントロールでは投与後 7 日目に静止状態の回復が始まるのに対し、cKO マウスでは遅延していることが分かった。また、HSC 分画の回復自体も遅れることが分かった。Foxp2 KI マウスに対して同様の実験を行ったところ、こちらも Foxp2 KI マウスで 7 日目の造血回復が遅れるという結果が得られ、Foxp2 の核内における機能が HSC の静止期への移行に重要な役割を持つことが考えられた。

以上の結果から、Foxp2 は細胞周期関連因子の発現を制御し、HSC の静止状態の維持に機能していることが示唆された。

- 3) 造血幹細胞 (HSC) の Foxp2 を介した未分化性維持機構を解明するため、引き続き Foxp2 欠損マウスを用いた生理的条件下における HSC の表現型解析、および ストレス環境下の HSC における Foxp2 の機能解析を行った。

生理的条件下における HSC の表現型を発現遺伝子の差異から解析するため、Foxp2 cKO マウスを用いて網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、cKO マウス由来 HSC では、酸化リン酸化、ミトコンドリア呼吸鎖に関連した遺伝子発現が亢進しており、ミトコンドリアを介したエネルギー代謝が活性化していることが示唆された。このことは、cKO マウス由来 HSC におけるミトコンドリア膜電位の増強や活性酸素種の増加を裏付けるものであると考えられる。また、古典的 b-catenin シグナルや炎症応答に関連した遺伝子発現の亢進や、幹細胞マーカーの発現減少が見られた。このことは、cKO マウス由来 HSC の細胞周期の静止状態の維持が障害されているという結果とも合致している。このような cKO マウスの HSC を移植したところ、骨髄再構築能がコントロールと比較して有意に低下することが分かった。生体で HSC の細胞周期の静止機構における Foxp2 の機能を明らかにするため、cKO マウスに対して 5-FU の連続投与により断続的な骨髄抑制を行ったところ、コントロールでは連続投与後も半数程度の生存が確認できたが、cKO マウスでは 2 - 3 回の投与により生存できないことが分かった。このことは、cKO マウスでは骨髄抑制後の一時的な細胞周期の活性化が戻りにくい結果とも関連していることが示唆された。

以上の結果から、Foxp2 は定常時において幹細胞の静止期の維持に寄与し、骨髄抑制後の HSC

の静止状態の回復にも機能することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hosokawa Kentaro, MacArthur Ben D., Ikushima Yoshiko Matsumoto, Toyama Hirofumi, Masuhiro Yoshikazu, Hanazawa Shigemasa, Suda Toshio, Arai Fumio	4. 巻 8(804)
2. 論文標題 The telomere binding protein Pot1 maintains haematopoietic stem cell activity with age	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-017-00935-4.	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 該当する

1. 著者名 Hosokawa K, Macarthur BD, Ikushima Y, Toyama H, Masuhiro Y, Hanazawa S, Suda T, Arai F.	4. 巻 58(8)
2. 論文標題 Functional analysis of Protection of Telomeres 1a (Pot1a) in regulation of hematopoietic stem cell aging.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Rinsho Ketsueki.	6. 最初と最後の頁 942-949
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11406/rinketsu.58.942.	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 該当する

1. 著者名 Hosokawa K, Arai F.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 The role of telomere binding molecules for normal and abnormal hematopoiesis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Hematol.	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-018-2432-4.	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kentaro Nakashima, Yuya Kunisaki, Kentaro Hosokawa, Shouichi Ohga, Fumio Arai
2. 発表標題 POT1a deficiency in mesenchymal niche cells results in bone marrow failures and skeletal retardation
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kentaro Hosokawa, Saki Morimoto, Yuya Kunisaki, Haruka Imanishi, Tomoko Hyoda, Yasufumi Uehara, and Fumio Arai
2. 発表標題 Foxp2 is necessary for maintenance of quiescence in hematopoietic stem cells.
3. 学会等名 ISEH 46th Annual Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Saki Morimoto, Kentaro Hosokawa, Yuya Kunisaki, Haruka Imanishi, Tomoko Hyoda, Yasufumi Uehara, Fumio Arai
2. 発表標題 造血幹細胞の未分化性維持における転写因子Foxp2の機能解析
3. 学会等名 第79回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	新井 文用 (Arai Fumio) (90365403)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	