

平成 21年 6月 16日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007 - 2008

課題番号：19790676

研究課題名（和文） 老化制御因子による白血病発症抑制の分子機構

研究課題名（英文） Accommodative roles of ATM and TERT in hematopoietic stem cell aging.

研究代表者 仁田 英里子 (NITTA ERIKO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80401123

研究成果の概要： 老化やストレス応答に重要な役割を担う ATM と TERT について、特に造血幹細胞の老化制御機構を、ノックアウトマウスを用いて解析した。両分子が協調した分子制御機構により個体レベルでの老化やストレス応答に対して影響することを示唆し、さらに両分子は造血幹細胞に於ける生理的な老化とストレス状況下に誘導される老化の両方の制御に関わり、その細胞レベルでの老化制御は独立した機構で老化が相加的に増強する可能性を示唆した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 内科系臨床医学・血液内科学

キーワード： 幹細胞・老化・がん

## 1. 研究開始当初の背景

申請者の属する研究グループでは、細胞周期チェックポイント分子 ATM(ataxia teleangiectasia mutated)ノックアウトマウスに於ける造血幹細胞の解析を行ってきた。ATMはヒトの早老症で遺伝子に変異が発見された分子でDNAダメージ修復を司るため、その老化制御とストレス応答に於ける役割が注目される。ATMノックアウトマウスの造血幹細胞では酸化ストレスによる活性酸素種(ROS:reactive oxygen species)が蓄積する結果、細胞周期が抑制され自己複製能を喪失することが明らかになった。幹細胞は成体の中で自己複製を

継続する細胞で本来細胞老化が抑制されているが、ATMノックアウトマウスの造血幹細胞では酸化ストレスに対する防御応答が失われたためROSが蓄積し細胞老化が引き起こされた結果、自己複製能を喪失したと考えられる。さらに老化制御に重要な分子としてテロメラーゼタンパク質 TERT (telomere reverse transcriptase)が注目される。TERT はテロメア延長を司るが、分化した細胞では殆ど見られず成体では生殖細胞や幹細胞に発現に限られる。しかしがん細胞ではこのテロメラーゼの活性が上昇していることが知られ、最近のがん細胞株での研究からはストレス応答や細胞

増殖促進などテロメア延長とは異なる TERT の役割・機能が示唆されている。また最近ヒトの造血不全症例でテロメラーゼ構成因子の遺伝子変異が高頻度に認められることが報告されテロメラーゼが造血幹細胞の自己複製に必須であることが示唆されたため、TERT は老化とがん抑制制御の鍵を担う分子である可能性が高いと考えられている。

## 2. 研究の目的

特に ATM と TERT は何れも酸化ストレスによる ROS 蓄積の抑制や DNA ダメージ修復を司る分子であり老化やストレス応答に重要な役割を担っている為、この 2 分子に注目してまずは造血幹細胞の酸化ストレスに対する細胞応答に於いて両分子の役割を具体的に解明する。

ATM および TERT それぞれについて、酸化ストレス応答と老化制御に果たす役割を明らかにし、さらには ATM・TERT 両分子の協調によるストレス応答と老化の分子機構を解明する。

## 3. 研究の方法

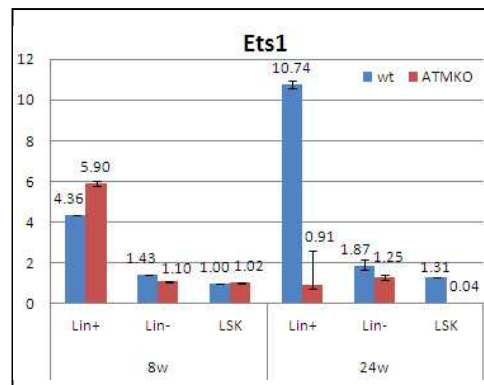
まず ATM ノックアウトマウスの造血幹細胞の解析を行い、申請者の属する研究グループが明らかにした造血幹細胞に於ける酸化ストレスと p16<sup>INK4a</sup> を介した自己複製能の分子制御機構の知見を土台にして発展させ、特にこれまで細胞老化について解明されてきた分子制御機構との関連を更に詳細に検討した。

さらに TERT ノックアウトマウスについても解析を進めた。マウスはヒトに比べてテロメアが長く世代を重ねなければテロメア短縮による影響が現れない為、テロメア延長とは異なった機構により TERT が細胞内で持つ役割を解析することが可能である。ATM ノックアウトマウスで報告した造血幹細胞の解析を再現応用することで、TERT が酸化ストレス応答と老化制御に果たす役割を明らかにした。

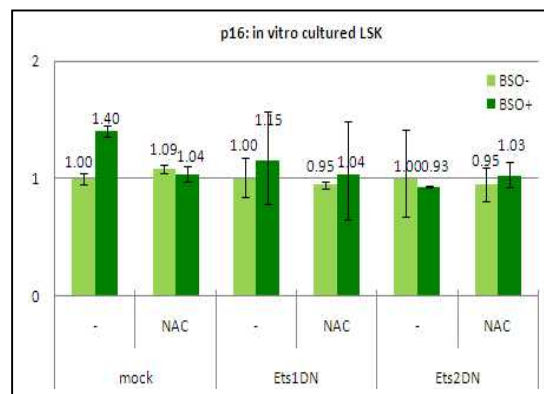
更には ATM・TERT 両分子の協調による分子機構を解明する為、ATM・TERT ダブルノックアウトマウスを作成して同様の解析を行った。ATM と比較解析して両分子の役割の相同と相違を明らかにし、更には ATM と TERT のダブルノックアウトマウスの造血幹細胞に於いて両分子の協調によるストレス応答と老化の分子機構を解明した。

## 4. 研究成果

(1) ATM ノックアウトマウスの解析を進展させ造血幹細胞に於いて老化因子 p16<sup>INK4a</sup> を増加させる分子制御機構を更に詳細に検討するため、細胞老化の研究に於いて p16<sup>INK4a</sup> の発現増加を調節する分子機構が明らかにされている Ets1・2 が造血幹細胞に於ける p16<sup>INK4a</sup> の制御についてもこの分子機構を適応するか検証した。まず野生型とノックアウトマウスにつき若年/老年個体の造血幹細胞に於ける Ets1・2 の発現レベルを比較したところ、若年マウスでは差異を認めず老齢マウスのみ造血幹細胞分画で Ets1・2 共に発現レベルが著明に減少していた (図)。



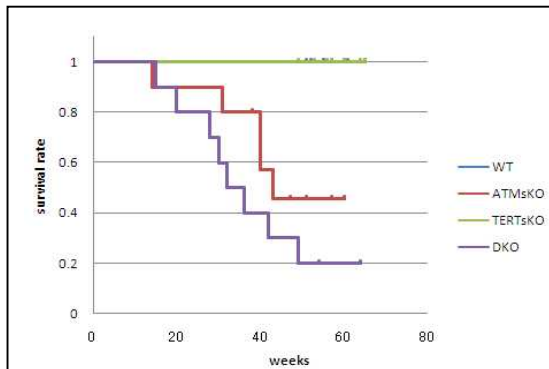
そのため *in vitro* で造血幹細胞の ROS による p16<sup>INK4a</sup> の発現上昇を解析する系を応用し、Ets1・2 およびドミナントネガティブのレトロウイルスを導入して解析したところ、ROS による p16<sup>INK4a</sup> の発現上昇は Ets1・2 のドミナントネガティブ導入により優位に抑制された (図)。



このことから Ets1・2 が造血幹細胞に於いても老化に伴う p16<sup>INK4a</sup> の増加に直接的に作用している可能性を示唆した。

(2) ATM・TERT 両分子の協調によるストレス応答と老化制御に果たす機構を解明する為、ATM・TERT ダブルノックアウトマウスを作成した。

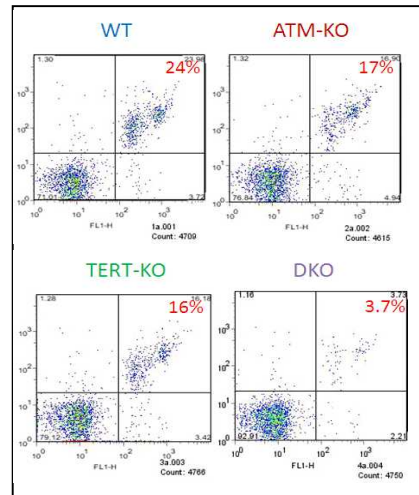
まず個体レベルで二重のストレス防御因子欠損の影響を観察したところ、TERT は単独ノックアウトでは寿命に影響しないが、ATM・TERT ダブルノックアウトマウスでは ATM 単独ノックアウトに比し寿命が短縮した(図)。



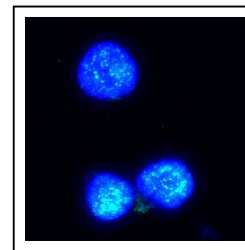
また各遺伝子型で体重を比較したところ寿命と同様 TERT 単独では体重に影響しないが ATM・TERT ダブルノックアウトでは ATM ノックアウトに対して低体重が見られ、この結果より ATM・TERT は両分子の協調した分子制御機構により個体レベルでの老化やストレス応答に対して影響することを示唆した。

また各遺伝子型をドナーにした造血幹細胞移植を行ったところ TERT 単独では一次移植に於いては野生型と差が見られないが ATM・TERT ダブルノックアウトでは ATM ノックアウトよりも再構築能が低下しており、この結果より ATM・TERT は両分子の協調した分子制御機構により造血幹細胞の老化やストレス応答に対しても影響することを示唆した。

次に細胞レベルでの老化機構を明らかにする為、造血幹細胞の細胞学的解析を行った。生体内の細胞の老化は生理的な老化とストレス状況下に誘導される老化が混在していると言われるが、造血幹細胞では生理的な老化に伴って分化方向の変化によりリンパ球の減少と顆粒球の増加を生じ myeloid shift と呼ばれるのに対し、ストレス状況下に誘導される老化は DNA ダメージの蓄積に司られ H2AX foci の蓄積により観察される。ATM および TERT 単独ノックアウトマウスでは何れも myeloid shift と H2AX foci 蓄積の両方を認め、更に ATM・TERT ダブルノックアウトマウスでは myeloid shift、H2AX foci 蓄積のいずれもが相加的に増強することを明らかにした(図)。



ATM・TERT ダブルノックアウトマウスでは myeloid shift により B cell が減少している



ATM・TERT ダブルノックアウトマウスでは H2AX foci が蓄積している

この結果より ATM と TERT は何れも造血幹細胞に於ける生理的な老化とストレス状況下に誘導される老化の両方の制御に関わり、またダブルノックアウトでは ATM・TERT による細胞レベルの老化制御は独立した機構で老化が相加的に増強する可能性を示唆した。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
特になし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

仁田 英里子 (NITTA ERIKO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80401123

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし