

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03711

研究課題名(和文) シェルタリン因子による造血微小環境(ニッチ)の機能制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidating the functional regulation mechanism of the hematopoietic microenvironment (niche) by the shelterin factor

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) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、造血幹細胞(HSC)の主要なニッチ細胞である間葉系幹細胞(MSC)の機能と老化制御について、特にシェルタリン因子POT1aの役割に注目して解析を行った。MSCの機能は老化とともに低下し、これがHSCの機能低下に関わることが考えられる。本研究では、POT1aがMSCの未分化性と骨芽細胞への分化能力を維持し、老化による機能低下を抑制することを明らかにした。また、POT1aの欠損はMSCの造血支持能を低下させ、間接的にHSCの機能を低下させることが分かった。これらの知見は、老化による血液疾患の予防と治療法の確立に向けた重要な一歩となると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MSCの老化は、骨芽細胞への分化能力の低下を伴い、これが骨粗鬆症などの疾患発症につながる可能性がある。本研究では、老化がMSC内のPOT1aの発現を低下させる一方で、POT1a導入により老化したMSCの骨分化能力が回復することを明らかにした。これらの結果から、POT1aが加齢に伴う骨関連疾患の治療ターゲットとなる可能性を示している。さらに、MSCの機能異常はHSCの機能低下、リンパ球の産生減少、そしてそれに続く免疫機能の低下につながる可能性がある。したがって、老化したMSCでPOT1の機能を活性化できれば、それは高齢者の造血機能や免疫機能の回復を可能にする基盤となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the function and aging regulation of mesenchymal stem cells (MSCs), the primary niche cells of hematopoietic stem cells (HSCs). We focused on the functional role of the shelterin factor POT1a in regulating MSC. MSC function, which declines with aging, is postulated to be involved in the functional decline of HSCs. This study found that POT1a maintains the stem cell activity of MSCs and their capacity to differentiate into osteoblasts and suppresses their functional decline with aging. In addition, the study showed that loss of POT1a reduced the hematopoietic supportive capacity of MSCs and impaired HSC function. These findings suggest that POT1a is essential in maintaining MSCs and their function as niche cells. The results of this study may be a crucial step toward establishing methods for the prevention and treatment of aging-related hematologic diseases.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：POT1 間葉系幹細胞 造血幹細胞 ニッチ

## 1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞 (hematopoietic stem cell: HSC) は骨髄内の特殊な微小環境 (ニッチ) に局在し、周囲のニッチ細胞 (支持細胞) と相互作用することにより未分化性を維持している。しかしながら加齢の過程では、造血幹細胞の機能低下だけでなく、ニッチ細胞の減少や機能障害も生じることにより、造血システム全体の恒常性が変容する。

HSC のニッチ細胞としては、間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) が重要な役割を果たしている (Morrison S, Scadden DT. Nature 2014)。HSC と MSC の相互作用は、生涯に渡る造血維持に重要であるが、老化が進む過程においては、細胞内在性および環境要因によるさまざまなストレス (DNA 損傷や酸化ストレスなど) の蓄積、代謝プログラムの変化などが生じることで MSC の機能にも異常が生じる。その結果は、血球産生の異常や免疫機能の低下、さらには白血病をはじめとした血液疾患の発症につながると考えられる (Maryanovich M et al. Nat Med. 2018; Raaijmakers MH et al. Nature 2010)。したがって、造血ニッチの機能低下メカニズムを理解し、これを抑制する因子を同定することは、造血の恒常性維持機構を理解する上で重要である。また、一度低下した造血ニッチの機能を回復させる技術の確立は、高齢者の造血機能の回復、さらには難治性血液疾患の予防と治療法の確立に向けた重要課題である。

シェルタリンは、POT1, TPP1, TIN2, TRF1, TRF2, RAP1 から成るタンパク複合体であり (図 1)、テロメア T ループ構造の形成、DNA ダメージ応答 (DDR) の抑制や染色体末端の修復異常の抑制によりテロメアを保護している (de Lange, T. Science 2009)。我々は、POT1a がテロメア領域だけでなく、非テロメア領域でも DDR を抑制し、さらには活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) の産生を抑制することで HSC の自己複製能の維持に働くことを明らかにした (Hosokawa K et al. Nat Commun. 2017)。

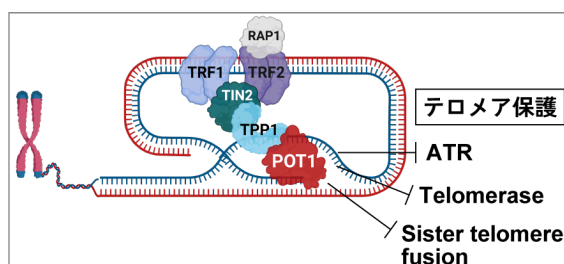


図1. シェルタリン複合体と POT1 の機能

また、POT1a の導入によって老化 HSC のミエロイド偏重 (Myeloid skewing) が回復することから、HSC の老化制御に POT1a が関わることも明らかにしている。我々は HSC のみならず、MSC 分画においても POT1a が発現しており、その発現レベルが加齢に伴って低下することを見いだした。さらに、MSC 特異的に Pot1a を欠損させた (Pot1a KO) マウスでは、MSC の減少や HSC の機能異常が見られた。これらの結果から、Pot1a は間葉系組織の構築、MSC の未分化性維持とニッチ機能の制御に重要な役割を果たしていると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、シェルタリン因子 POT1a に注目し、骨髄の主要ニッチ細胞である MSC の造血支持能 (ニッチ機能) の制御における POT1a 働きを明らかにする。さらに、シェルタリン因子群の導入により、老化ニッチ細胞の機能を回復させる技術を確認することを目指す。MSC の機能維持における POT1 の機能解明は、老化による造血異常の分子メカニズムの理解にもつながり、その研究成果は、高齢者の造血機能の回復や難治性血液疾患の予防・治療法確立に向けた基盤と成り得ると考えられる。

## 3. 研究の方法

### (1) MSC の未分化性維持における POT1 の機能

Pot1a<sup>fl/fl</sup> マウスから分離した MSC を培養し、Cre タンパクを導入して in vitro で Pot1a を欠損させた (Pot1a<sup>ΔΔ</sup>) MSC の骨分化能を解析した。また、Pot1a<sup>fl/fl</sup> マウスを NG2-Cre (細動脈周囲の MSC を標識する, Kunisaki Y et al. Nature 2013) および LepR-Cre (類洞血管周囲の MSC を標識する, Zhou BO et al. Cell Stem Cell 2014) マウスと交配し、細動脈ニッチと類洞血管ニッチの MSC で Pot1a を欠損させた Pot1a KO マウスを作製し、MSC の分化に対する Pot1a の機能を解析した。

### (2) MSC のニッチ機能の制御における POT1 の機能

NG2-Cre; Pot1a<sup>fl/fl</sup> および LepR-Cre; Pot1a<sup>fl/fl</sup> マウスから HSC を分離して機能解析を行った。

### (3) POT1 による MSC の老化制御

POT1 の導入による老化 MSC の機能回復を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) MSC の未分化性維持における POT1 の機能

Pot1a<sup>ΔΔ</sup>について、骨・軟骨・脂肪分化マーカーの発現を検討した。その結果、Pot1aのKOによって骨芽分化 (Alpl、Opn)、軟骨分化 (Sox9) マーカーの発現が低下する一方で、脂肪分化マーカー (Pparg) の発現が上昇することが明らかとなった。また、Pot1a<sup>ΔΔ</sup>は骨芽細胞への分化が低下していた(図2, Nakashima K et al. in revision)。

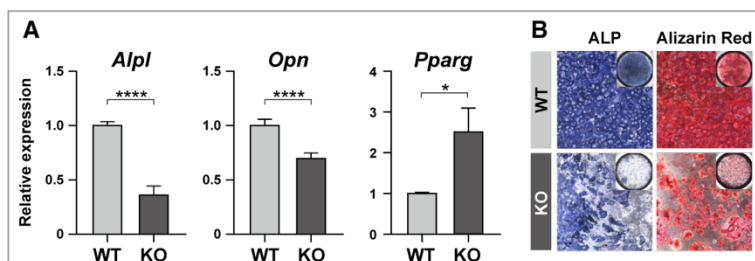


図2. Pot1a KOによる骨分化能の低下

(A) Pot1a KO (Pot1a<sup>Δ/Δ</sup>) MSCにおける骨芽細胞マーカー (Alpl, Opn) と脂肪細胞マーカー (Pparg) の発現

(B) 骨芽細胞分化実験, アルカリフォスファターゼ(ALP)染色とアリザリンレッド (Alizarin Red染色, 石灰化)

NG2-Cre; Pot1a<sup>fl/fl</sup> マウスの解

析結果では、骨髄ストローマ細胞数の減少、MSC から骨芽細胞への分化異常および骨の発育不全が観察された。さらに、Pot1a KO MSC では酸化的リン酸が低下し、細胞内脂肪酸の蓄積と DDR の増加が確認された (Nakashima K et al. in revision)。一方で、LepR-Cre; Pot1a<sup>fl/fl</sup> マウスでは、ストローマ細胞内の MSC が減少していました。また、MSC における ROS 産生の亢進、ミトコンドリア膜電位の上昇、DDR の亢進が見られた (manuscript in preparation)。これらの結果から、POT1a は MSC の未分化性の維持に重要な役割を果たしており、その欠損は MSC の骨芽細胞への分化能力を低下させることが明らかになった。

### (2) MSC のニッチ機能の制御における POT1 の機能

NG2-Cre; Pot1a<sup>fl/fl</sup> マウスでは、HSC の存在比率や機能に大きな変化は見られなかったが、B リンパ球が減少していることが確認された (Nakashima K et al. in revision)。そこで、B リンパ球産生に関わる IL-7 の発現レベルを解析したところ、KO マウスと野性型 (wild type, WT) マウスの間には差が見られなかったが、IL-7 を産生する骨芽細胞の数が減少していることが分かった。

一方、LepR-Cre; Pot1a<sup>fl/fl</sup> マウスでは、細胞周期が静止期にある HSC が減少していた。さらに、Pot1a KO マウスから分離した HSC を用いた骨髄移植実験を行ったところ、Pot1a KO HSC の骨髄再構築能の低下がみられた (manuscript in preparation)。これらのデータは、Pot1a の KO によって MSC に異常が生じ、間接的に HSC の機能が障害されて、静止期維持と骨髄再構築能が低下したことを示唆している。また、骨髄内では LepR<sup>+</sup> MSC の方が NG2<sup>+</sup> MSC よりも細胞数が多いため、HSC に及ぼす影響が大きくなったと考えられた。以上の解析結果から、POT1a は MSC の維持に加えて、ニッチ細胞としての機能維持に重要な役割をもつことが明らかとなった。

### (3) POT1 による MSC の老化制御

MSC は老化に伴い骨芽細胞への分化能が低下し、脂肪細胞への分化が亢進する (Moerman EJ et al. Aging Cell 2004; Bethel M et al. Curr Osteoporos Rep 2013)。Pot1a<sup>ΔΔ</sup>では、骨芽細胞マーカーの発現低下と脂肪細胞マーカーの発現亢進が見られたことから、Pot1a KO MSC は老化 MSC と類似した状態になっている可能性が考えられた。実際に、老化マウスから分離した MSC では Pot1a の発現が低下していることから、POT1a は老化による MSC の機能低下に関連していると考えられた。そこで、Pot1a を過剰発現させるレトロウイルスベクターを老化マウスの MSC に導入したところ、若齢マウス MSC に比べて低下していた骨芽細胞マーカーの発現が回復することが分かり、MSC の分化能維持における Pot1a の重要性が示唆された (Nakashima K et al. in revision)。

### 引用文献

- Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. Nature. 505 (7483): 327-334, 2014.
- Maryanovich M, Zahalka AH, Pierce H, Pinho S, Nakahara F, Asada N, Wei Q, Wang X, Ciero P, Xu J, Leftin A, Frenette PS. Adrenergic nerve degeneration in bone marrow drives aging of the hematopoietic stem cell niche. Nat Med. 24 (6): 782-791, 2018.
- Raaijmakers MH, Mukherjee S, Guo S, Zhang S, Kobayashi T, Schoonmaker JA, Ebert BL, Al-Shahrour F, Hasserjian RP, Scadden EO, Aung Z, Matza M, Merkenschlager M, Lin C, Rommens JM, Scadden DT. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. Nature. 464 (7290): 852-857, 2010.
- de Lange T. How telomeres solve the end-protection problem. Science. 326 (5955): 948-952, 2009.
- Hosokawa K, MacArthur BD, Ikushima YM, Toyama H, Masuhiro Y, Hanazawa S, Suda T, Arai F.

The telomere binding protein Pot1 maintains haematopoietic stem cell activity with age. *Nature communications*. 8 (1): 804, 2017.

6. Kunisaki Y, Bruns I, Scheiermann C, Ahmed J, Pinho S, Zhang D, Mizoguchi T, Wei Q, Lucas D, Ito K, Mar JC, Bergman A, Frenette PS. Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature*. 502 (7473): 637-643, 2013.
7. Zhou BO, Yue R, Murphy MM, Peyer JG, Morrison SJ. Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. *Cell Stem Cell*. 15 (2): 154-168, 2014.
8. Moerman EJ, Teng K, Lipschitz DA, Lecka-Czernik B. Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR-gamma2 transcription factor and TGF-beta/BMP signaling pathways. *Aging Cell*. 3 (6): 379-389, 2004.
9. Bethel M, Chitteti BR, Srour EF, Kacena MA. The changing balance between osteoblastogenesis and adipogenesis in aging and its impact on hematopoiesis. *Curr Osteoporos Rep*. 11 (2): 99-106, 2013.
- 10.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

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

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>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<br>23                    |
| 2. 論文標題<br>Mitochondrial Protein Synthesis Is Essential for Terminal Differentiation of CD45 <sup>+</sup> TER119 <sup>+</sup> Erythroid and Lymphoid Progenitors   | 5. 発行年<br>2020年               |
| 3. 雑誌名<br>iScience   | 6. 最初と最後の頁<br>101654 ~ 101654 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.isci.2020.101654   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Konno Katsuhiro, Kulkeaw Kasem, Sasada Manabu, Nii Takenobu, Kaneyuki Ayako, Ishitani Tohru, Arai Fumio, Sugiyama Daisuke | 4. 巻<br>25              |
| 2. 論文標題<br>A novel method to purify neutrophils enables functional analysis of zebrafish hematopoiesis                              | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Genes to Cells  | 6. 最初と最後の頁<br>770 ~ 781 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/gtc.12810   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Stumpf Patrick S, Arai Fumio, MacArthur Ben D        | 4. 巻<br>17                    |
| 2. 論文標題<br>Heterogeneity and 'memory' in stem cell populations | 5. 発行年<br>2020年               |
| 3. 雑誌名<br>Physical Biology                                     | 6. 最初と最後の頁<br>065013 ~ 065013 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1088/1478-3975/abba85           | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する                  |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>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, Niranjan Mahesan, Akashi Koichi, Arai Fumio, MacArthur Ben D. | 4. 巻<br>3               |
| 2. 論文標題<br>Transfer learning efficiently maps bone marrow cell types from mouse to human using single-cell RNA sequencing   | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Communications Biology  | 6. 最初と最後の頁<br>736 ~ 746 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s42003-020-01463-6  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する            |

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

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Nakashima K, Kunisaki Y, Hosokawa K, Yao H, Yuta R, Akashi K, Ohga S, Arai F |
| 2. 発表標題<br>POT1a is essential for mesenchymal niches supporting B cell development      |
| 3. 学会等名<br>第84回日本血液学会学術集会   |
| 4. 発表年<br>2022年   |

〔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  
<https://www.lab.med.kyushu-u.ac.jp/scr/>  
 幹細胞再生修復医学分野ホームページ  
<https://www.lab.med.kyushu-u.ac.jp/scr/>

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                          | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)            | 備考 |
|-------|--|----------------------------------|----|
| 研究分担者 | 細川 健太郎<br><br>(Hosokawa Kentaro)<br><br>(90569584) | 九州大学・医学研究院・講師<br><br><br>(17102) |    |
| 研究分担者 | 八尾 尚幸<br><br>(Yao Hisayuki)<br><br>(90835282)      | 九州大学・医学研究院・助教<br><br><br>(17102) |    |

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  |  |  |