

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293228

研究課題名(和文) テロメアDNA損傷回避による造血幹細胞の老化抑制と体外増幅

研究課題名(英文) Prevention of age-related deregulation of hematopoietic stem cell function through the protection of telomeric DNA

研究代表者

新井 文用(Arai, Fumio)

九州大学・医学(系)研究科(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) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：老化に伴う造血幹細胞の機能低下には、DNA損傷の蓄積による分裂制御の異常が関連すると考えられる。我々はシェルタリン複合体分子Pot1aがDNA損傷を抑制して、造血幹細胞の自己複製分裂能の維持に働くことを明らかにした。さらに、Pot1aの導入により老化幹細胞の機能回復が見られた。加えて、Pot1aは、酸化リン酸化関連遺伝子およびmTORの発現抑制、活性酸素の産生抑制に働く、テロメア非依存的な機能を持つことを新たに見出した。これらの結果から、Pot1aはDNA損傷の抑制(テロメア依存的機能)と、テロメア非依存的機能によって造血幹細胞の機能維持、老化幹細胞の機能回復に働くことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hematopoietic stem cells (HSCs) maintain life-long hematopoiesis by their unique ability to both self-renew and differentiate along multiple lineages. The decision of stem cells to undergo self-renewal or differentiation occurs through asymmetric and symmetric cell divisions. However, age-related accumulation of intracellular stress such as DNA damages can negatively affect their divisions and thereby inhibit HSC function. Here, we found that Pot1a, a component of telomere-specific protein complex Shelterin, improved HSC activity during aging by protecting telomeres against DNA damage and preventing metabolic alterations and the production of reactive oxygen species. Transduction of Pot1a maintained the ability of HSCs to undergo the self-renewal division in culture. These data suggest that Pot1a supports HSC function via telomeric and novel non-telomeric roles and indicate that Pot1a is essential for the protection of HSC function and maintenance of healthy aging.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：造血幹細胞 Pot1a テロメア 非対称分裂

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞の機能は生涯にわたる造血システムの維持に重要であるが、加齢や細胞分裂の繰り返しによってDNA修復応答シグナル(DNA damage response: DDR)が蓄積し、自己複製能の低下と分化の障害が生じることが報告されている(Rossi et al. 2005; 2007)。特に、染色体末端のテロメア1本鎖DNA領域は、その構造からダメージを受けたDNAと誤って認識され、不要なDDRシグナルが働く可能性が高いことが知られている(de Lange 2009)。

我々は、加齢の進行に伴う造血幹細胞の自己複製能の低下と分化障害には、対称・非対称分裂の制御機構の異常が関連していると想定しているが、その詳細な制御機構は不明な点が多い。

幹細胞は分裂に際して、幹細胞を2個生み出す対称性自己複製分裂、幹細胞と前駆細胞を1個ずつ生み出す非対称分裂、さらに前駆細胞を2個生み出す対称性分化分裂を行う。すなわち、造血幹細胞プールの維持には、適切な細胞分裂制御が重要であると考えられる。

これまでに我々は、造血幹細胞の細胞分裂のシングルセル解析を行い、造血幹細胞の第1回目の細胞分裂により生じる1組の娘細胞ペア(paired daughter cell: PDC)のシングルセル遺伝子発現プロファイルを機械学習モデルsupport vector machine (SVM)で分析することで、娘細胞が幹細胞として維持されたのか、それとも前駆細胞に分化したのかを判定し、造血幹細胞の対称性自己複製分裂、非対称分裂、対称性分化分裂を鑑別する手法(PDC-SVM解析)を確立した。これまでに、幼若期(4週齢)および若年成体(8週齢)マウス造血幹細胞の分裂様式を解析し、4週齢の造血幹細胞は対称性自己複製分裂の頻度が高く、成体(8週齢)になるとその頻度が低下することを見出している。これは、マウスの成長に伴う造血幹細胞数の増加と相関するものと考えられた。しかしながら、老化に伴う造血幹細胞の分裂様式の変化のメカニズム、さらにはDNAダメージ制御との関連は不明であった。

一方我々は、テロメア保護に働くシェルタリン複合体分子の1つであるProtection of telomere 1a (Pot1a)が造血幹細胞に高発現すること、さらにその発現が加齢に伴い著しく低下することを明らかにしている。さらに、Pot1aは造血幹細胞のテロメアをDDRから保護し、自己複製能の維持に働くことを見出した。これらの知見から、幹細胞の老化に伴う自己複製能の維持にPot1aによるテロメアDDRの抑制が関わっていると考えられた。

2. 研究の目的

老化に伴う造血幹細胞の自己複製・分化の障害には、DNA損傷による造血幹細胞の対称・非対称分裂制御機構の異常が関連していると予想される。我々は、Pot1aが造血幹細胞のテロメアDDRの抑制と自己複製能の維持に働くことを見出しており、テロメアDDRシグナルか

らの保護が造血幹細胞の分裂制御機構の維持にも重要な働きをもつと考えられた。

そこで本研究では、以下の項目を目標として研究を行った。

(A) 老化に伴う造血幹細胞の対称・非対称分裂制御の変化を明らかにする。

(B) 造血幹細胞の分裂制御における、テロメアDNA領域の安定性維持の意義を明らかにする。そのため、Pot1aを導入してDDRを抑制することで、造血幹細胞の自己複製分裂の誘導、老化造血幹細胞の機能が回復するか明らかにする。

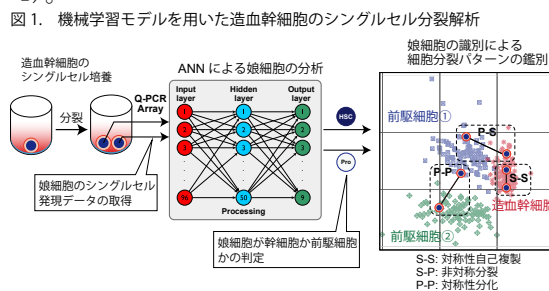
(C) Pot1aによる造血幹細胞の自己複製能の維持機構を明らかにする。

以上の研究により、造血幹細胞の老化に伴うDNA損傷からの保護と細胞分裂制御、さらに自己複製能の維持の関連を明らかにし、造血幹細胞の動態制御、老化抑制の技術基盤確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 老化造血幹細胞の細胞分裂解析

加齢に伴う造血幹細胞の細胞分裂パターンの変化を明らかにするため、4週齢(young: Y)、8週齢(adult: A)、1.5年齢(old: O)の造血幹細胞と前駆細胞の遺伝子発現プロファイルを機械学習モデル(人工神経回路網、Artificial Neural Network: ANN)に学習させて、細胞分裂後のPDCの分裂パターンの解析を行った(図1)。



(2) Pot1aによる造血幹細胞の細胞分裂制御

細胞膜透過性タグ(membrane translocation motif: MTM)を付与した可溶性Pot1aタンパク(MTM-Pot1a)を作製した。さらに、MTM-Pot1a存在下で造血幹細胞の培養を行い、PDCの分裂パターンをTie2(幹細胞マーカー)とCD48(前駆細胞マーカー)の免疫染色、およびコロニーアッセイにより解析した。

(3) Pot1aによる老化造血幹細胞の機能回復

若年(8週齢)と加齢(90週齢)造血幹細胞をMTM-Pot1a存在下で10日間培養し、培養後に造血幹細胞分画を分離して、DDRレベルを明らかにすると共に、骨髓移植実験による機能解析を行った。

(4) Pot1aによる造血幹細胞維持の分子機構の解明

造血幹細胞にPot1aの過剰発現あるいはMTM-Pot1aタンパクの導入を行い、遺伝子発現の変化を解析した。また、Pot1aをノックダウンした造血幹細胞についても同様遺伝子発現

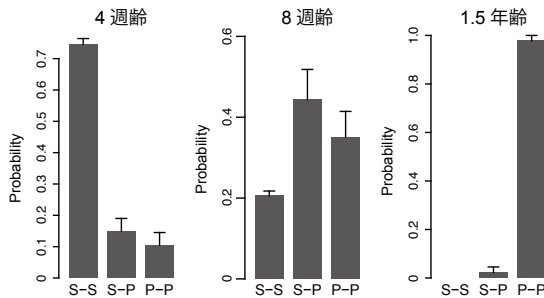
解析を行った。

4. 研究成果

(1) 老化造血幹細胞の細胞分裂解析

加齢に伴う造血幹細胞の細胞分裂パターンの変化をANNにより解析したところ、幼若造血幹細胞(4週齢)は対称性自己複製分裂の頻度が多いのに対し、若年造血幹細胞(8週齢)では、非対称分裂が増加した。さらに、加齢造血幹細胞(1.5年齢)では、ほぼ全ての幹細胞が対称性に分化することがわかった。これらの結果から、造血幹細胞は老化に伴い、自己複製分裂能が失われ、その結果として幹細胞が枯渇することが明らかとなった(図2)。

図2. 成長・老化に伴う造血幹細胞の分裂様式の変化



(2) Pot1aによる造血幹細胞の細胞分裂制御

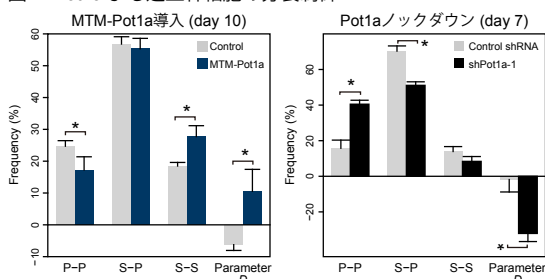
造血幹細胞にMTM-Pot1aを導入あるいはして8日間培養し、培養後に再度造血幹細胞を分離、培養(2日間)して、PDCのTie2とCD48の免疫染色結果から、以下の様に細胞分裂パターンを分類した(図3)。

図3. Tie2・CD48染色による細胞分裂解析

細胞の識別		細胞分裂パターン	
CD48-Tie2-	●	P-P	●●, ●○, ○●, ○○
CD48+Tie2-	○	S-P	●○, ○●, ○●, ●○
CD48+Tie2+	●○	S-S	●○, ○●
CD48-Tie2+	○●		

その結果、Pot1aを導入した造血幹細胞はコントロールと比較して、対称性分化分裂の頻度が低下し、対称性自己複製分裂の頻度が増加した。逆に、Pot1aをノックダウンして培養(7日間)した場合は対称性分化分裂の頻度が増加し、非対称分裂の頻度が低下することが明らかになった(図4)。

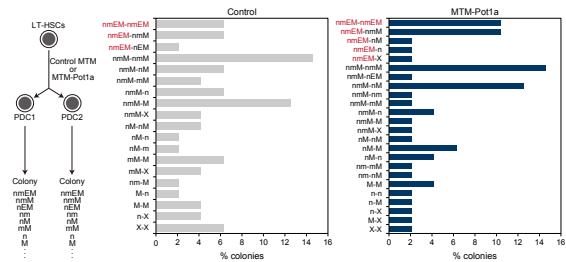
図4. Pot1aによる造血幹細胞の分裂制御



また、MTM-Pot1a存在下で造血幹細胞を2日間培養し、得られたPDCのコロニーアッセイを行い、得られたコロニーの性質をPDC間で比較

することにより細胞分裂パターンを解析した。その結果、MTM-Pot1aによってPDCの両方が多分化能を持つnmEMコロニー (n: 好中球, m: マクロファージ, E: 赤血球, M: 巨核球)となるペア(nmEM-nmEMペア)の頻度が増加することが分かった(図5)。

図5. 造血幹細胞の娘細胞ペアのコロニー形成比較

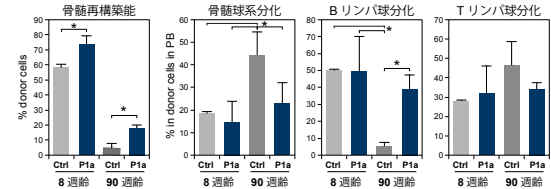


これらの結果から、Pot1aは造血幹細胞の自己複製分裂能(対称性自己複製分裂と非対称分裂)の維持に関与することが示唆された。

(3) Pot1aによる老化造血幹細胞の機能回復

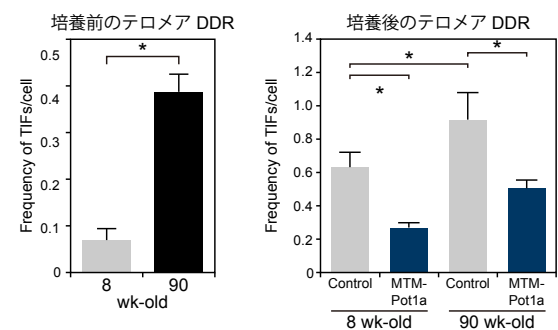
90週齢の老化マウス造血幹細胞にMTM-Pot1aを導入して培養し、骨髄移植を行ったところ、老化造血幹細胞の骨髄再構築能の改善が見られた。さらに、老化造血幹細胞のコントロール培養群では、ドナー細胞の骨髄球系細胞への分化の亢進と、Bリンパ球分化の低下が見られたのに対し、MTM-Pot1aを導入した老化造血幹細胞では、この分化異常が回復することがわかった(図6)。

図6. Pot1aによる造血幹細胞の自己複製の亢進と老化による分化異常の回復



次に、8週齢の成体マウスと90週齢老化マウスの造血幹細胞について、テロメアDDRのレベルを比較したところ、老化マウス造血幹細胞においてDDRが亢進していることが分かった。さらに、MTM-Pot1aの導入により若年および老化造血幹細胞のテロメアDDRが抑制されることが明らかになった。(図7)。

図7. Pot1aによるテロメアDDRの抑制

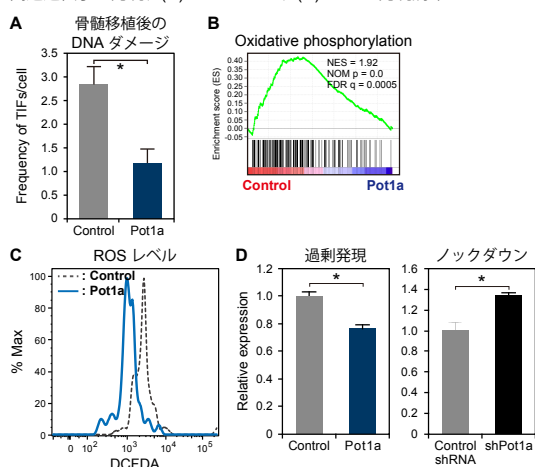


これらの結果から、Pot1aは老化造血幹細胞の機能回復に働くことが示唆された。

(4) Pot1aによる造血幹細胞維持の分子機構の解明：テロメア非依存的機能の同定

Pot1aはテロメア領域に特異的に結合し、DNAダメージの抑制、ループ構造の形成に働く (de Lange. *Genes Dev* 2005 ; Hockemeyer et al. *Cell* 2006; Wu et al. *Cell* 2006)。しかし最近、POT1がテロメア以外のDNAに結合することが報告され (Choi et al. *Biochimie* 2015)、転写調節としての機能をもつことが予想された。そこで、Pot1aを導入した造血幹細胞について、マイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現の変化を解析したところ、Pot1aの過剰発現により、酸化リン酸化に関連した遺伝子群の発現が抑制されることがわかった。さらに、Pot1aを過剰発現した造血幹細胞では、mTORの発現が抑制されたのに対し、Pot1aのノックダウンによりmTORの発現が亢進することを見出した。また、Pot1aを導入した若年および加齢造血幹細胞における活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) レベルを測定したところ、いずれの幹細胞分画においても、Pot1aの導入によってROSの産生が抑制された (図8)。

図8. Pot1aによる造血幹細胞の (A) DNA 損傷抑制、(B) 酸化リン酸化関連遺伝子の発現、(C) ROS レベル、(D) mTOR 発現調節



これらの結果は、近年新たに明らかになりつつあるシュルタリン複合体分子のテロメア非依存的機能であり、Pot1aはDNA損傷の抑制 (テロメア依存的機能) のみならず、ROS産生を抑制することにより (テロメア非依存的機能)、造血幹細胞の維持に働くことが示唆された。

本研究によって、Pot1aが造血幹細胞の、①自己複製分裂能の維持、②DNAダメージの抑制、③ROS産生の抑制、に働くことが明らかとなったが、各機能の相互関連性の解明には至っていない。今後は、DNAダメージの抑制およびROS産生の抑制がどのような分子機構により、自己複製分裂を制御するのか明らかにする。

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)

① Koide S, Oshima M, Takubo K, Yamazaki S, Nitta E, Saraya A, Aoyama K, Kato Y, Miyagi S, Nakajima-Takagi Y, Chiba T, Matsui H, Arai F, Suzuki Y, Kimura H, Nakauchi H, Suda T, Shinkai Y, Iwama A. Setdb1 maintains hematopoietic stem and progenitor cells by restricting the ectopic activation of nonhematopoietic genes. *Blood*. 128 (5): 638-649, 2016. DOI: 10.1182/blood-2016-01-694810
査読有

② Ito K, Turcotte R, Cui J, Zimmerman SE, Pinho S, Mizoguchi T, Arai F, Runnels JM, Alt C, Teruya-Feldstein J, Mar JC, Singh R, Suda T, Lin CP, Frenette PS, Ito K. Self-renewal of a purified Tie2+ hematopoietic stem cell population relies on mitochondrial clearance. *Science*. 354 (6316): 1156-1160, 2016. DOI: 10.1126/science.aaf5530
査読有

③ 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): 479-490, 2015. DOI: 10.1002/stem.1855
査読有

[学会発表] (計9件)

① 新井文用. 造血幹細胞の自己複製・分化制御. 第78回日本血液学会. 2016年10月13日～10月15日. 横浜

② Arai F. Function of Pot1 in the maintenance of hematopoietic stem cell activity under stress. 5th International Conference on Tissue Engineering & Regenerative Medicine. September 12-14, 2016. Berlin, Germany.

③ 新井文用. シングルセル解析の最先端. 第17回日本検査血液学会. 2016年8月6日～8月7日. 福岡

④ Arai F. Pot1 maintains hematopoietic stem cell activity under stress. Japan Society for the Promotion of Science and National University of Singapore joint symposium. January 14th-15th, 2016. Singapore.

⑤ Arai F. Introduction of hematopoietic stem cell niche. ISEH (international society for experimental hematology), 44th Annual Scientific Meeting. September 17th-19th, 2015. Kyoto, Japan.

⑥ Arai F. Potla regulates self-renewal activity of hematopoietic stem cells. 4th International Conference on Tissue Engineering & Regenerative Medicine. July 27-29, 2015. Rome, Italy.

⑦ 新井文用. Protection of telomeres 1による造血幹細胞の自己複製の制御. 第14回日本再生医療学会. 2015年3月21日. 横浜

⑧ Arai F. Role of Pot1 in the regulation of hematopoietic stem cell activity. 2015 US-Japan Meeting on Malignant Hematopoiesis and Stem Cells. March 16th-17th, 2015. Waikoloa, HI, USA.

⑨ Arai F. Pot1 regulates the self-renewal activity of hematopoietic stem cells. 4th World Congress on Cell Science & Stem Cell Research, June 24-26, 2014. Valencia, Spain.

[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]

ホームページ

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

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし

(4) 研究協力者

Ben D. MacArthur

英国、サウサンプトン大学