

テロメア結合因子による造血幹細胞の自己複製制御機構の解明

細川健太郎

九州大学大学院医学研究院 幹細胞再生修復医学分野

【研究の背景】

脊椎動物のテロメアの安定性を維持することは細胞の生存に関わる重大な問題であるが、一方で代謝の恒常性に対しても影響を与えることが明らかになってきている¹⁾。これまでに我々はテロメア結合因子 Shelterin のひとつ Pot1a の機能について解析を進め、Pot1a が造血幹細胞(HSC)におけるテロメア DNA の損傷応答の抑制と、エネルギー代謝調節に関与することを見出した²⁾。また近年、核-ミトコンドリア間のクロストークを制御する分子が明らかになってきているが、このような二重標的分子は、結合パートナーの発現状況や酸化ストレス等に応答して核およびミトコンドリアゲノムの安定性の維持に関与することが知られる。Shelterin 因子 Tin2 はテロメアの保護に加え、ミトコンドリアの代謝調節にも関与し、核移行パートナーの Tpp1-Pot1a によって細胞内局在が制御される³⁾。

【目 的】

Shelterin 因子の細胞内局在変化が HSC の自己複製能に与える影響はまだ明らかになっていない。そこで本研究では、テロメア結合因子が代謝を調節しながら、どのように造血幹細胞の自己複製能を制御するかを明らかにすることを目的とした。本研究では、とくに Pot1 の核移行パートナーである Tin2 に焦点を当て研究を進行した。

【方 法】

1.造血幹細胞における Tin2 の局在の解析

造血幹細胞における Tin2 の局在の変化を明らかにするため、静止期造血幹細胞または体外培養した造血幹細胞を採取し、免疫染色法にて Tin2 の局在を解析した。

また、Q-PCR にてそれぞれの遺伝子発現解析を行い、各 Shelterin 因子の発現を比較した。

2.ミトコンドリアに局在する Tin2 が造血幹細胞の自己複製能に与える影響の解析

造血幹細胞に対し、Tpp1 結合部位に変異を導入した Tin2 変異体を遺伝子導入し、FACS にてミトコンドリア膜電位と活性酸素種(ROS)産生量を比較した。また、この細胞を骨髄移植し、骨髄再構築能に与える影響について解析した。

3.Pot1-Tpp1-Tin2 の発現バランスの調整による自己複製能の維持に与える影響の検討

Tpp1 を遺伝子導入した造血幹細胞における Tin2 の局在を解析するため、1.と同様に免疫染色法を用いてイメージングによる局在解析を行った。さらに、この細胞に細胞膜透過型 Pot1a タンパク質を導入し、1 週間培養後の造血幹細胞数と全体数に占める幹細胞数の割合を算出し、幹細胞における増殖と自己複製について比較を行った。

【結 果】

1.造血幹細胞における Tin2 の局在の解析

採取した静止期造血幹細胞と培養してから採取した造血幹細胞の Tin2 の局在に関して解析したところ、静止期造血幹細胞では核内に集積していたのに対し、培養して増殖中のものではミトコンドリアへ多く移行することが分かった。また各

Shelterin 因子の発現に関して解析したところ、増殖中の造血幹細胞では Pot1a、Tpp1 の発現が低下するのに対し、Tin2 の発現はむしろ上昇することが分かった。

2.ミトコンドリアに局在する Tin2 が造血幹細胞の自己複製能に与える影響の解析

Tin2 がミトコンドリアへ移行した場合、造血幹細胞にどのような影響を与えるのかを明らかにするため、核内には移行せず、ミトコンドリアにのみ局在する Tin2 の変異体を造血幹細胞に遺伝子導入した。すると対照群と比較して造血幹細胞のミトコンドリアを介したエネルギー代謝は活性化していることが考えられた。さらにこの細胞を移植して骨髄再構築能を解析したところ、対照群と比較して著しく低下することが明らかになった。

3.Pot1-Tpp1-Tin2 の発現バランスの調整による自己複製能の維持に与える影響の検討

Tpp1 を遺伝子導入した造血幹細胞における Tin2 の局在を解析したところ、Tpp1 導入群では Tin2 のミトコンドリアへの移行が抑制されていることが分かった。さらにこの細胞を体外培養し、造血幹細胞の増殖について検討したところ、対照群と比較して増殖速度は低く抑えられていたが、一方で造血幹細胞の割合はむしろ向上していることが分かった。また、この細胞に対し外因性に Pot1a タンパク質を導入すると、この傾向はさらに強まることが明らかになった。

【考 察】

本研究の結果から、以下のことが考えられた。

- ① 造血幹細胞における Pot1-Tpp1-Tin2 の発現バランスは、Tin2 の局在に影響し、増殖時には Tin2 がミトコンドリアに局在することが分かった。
- ② 造血幹細胞における Tin2 の局在がミトコンドリアに局在し続けることは、エネルギーとともに ROS の産生を惹起し、自己複製能の維持を阻害することにつながる。
- ③ 造血幹細胞における Tin2 の局在制御方法として、外因性 Tpp1 および Pot1 の導入によってミトコンドリアへの移行を抑制することで、低速度の自己複製型の分裂を促進できることが示唆された。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

これまでの造血幹細胞の体外培養ではあまり注目されてこなかった、テロメア結合因子によるエネルギー代謝調節を外因性に調整することが可能となれば、DNA 損傷の元となる ROS の産生を抑えつつ、さらに DNA 損傷応答も Shelterin 因子によって保護し、健全な高品質の造血幹細胞の増幅に寄与できると考えられる。得られた知見と技術は、抗がん治療における造血幹細胞治療での応用に活かせるものと確信している。

一方で正常造血幹細胞で得られた知見をもとに、白血病幹細胞における Tin2 を基軸とした代謝調節との比較を行うことで、正常には無い白血病特異的な増殖機構の解明を進めることができると考えられる。

【参考・引用文献】

- 1) Sahin E, Colla S, Liesa M, Moslehi J, Müller FL, Guo M, Cooper M, Kotton D, Fabian AJ, Walkey C, Maser RS, Tonon G, Foerster F, Xiong R, Wang YA, Shukla SA, Jaskelioff M, Martin ES, Heffernan TP, Protopopov A, Ivanova E, Mahoney JE, Kost-Alimova M, Perry SR, Bronson R, Liao R, Mulligan R, Shirihai OS, Chin L, DePinho RA. Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature*. 470(7334):359-65. 2011.
- 2) 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. *Nat Commun*. 6;8(1):804, 2017.
- 3) Chen LY, Zhang Y, Zhang Q, Li H, Luo Z, Fang H, Kim SH, Qin L, Yotnda P, Xu J, Tu BP, Bai Y, Songyang Z. Mitochondrial localization of telomeric protein TIN2 links telomere regulation to metabolic control. *Mol Cell*. 2012 Sep 28;47(6):839-50.