

# POT1の増強による造血幹細胞の体外増幅法の開発

慶應義塾大学 医学部 発生・分化生物学

細川 健太郎

## 1. はじめに

**緒言：**幹細胞は多分化能および自己複製能を持つ細胞と定義され、個体や組織の発生・維持などに重要な役割を果たしていると考えられている。近年造血機能回復を目的とした造血幹細胞移植が行われ、幹細胞に対する需要は増加している。しかしながら限られた数の幹細胞を増幅するために体外培養を行うと、老化や細胞死が障壁となり徐々に自己複製能が失われてしまう。そのため、安定的に幹細胞の自己複製能を維持することは、造血幹細胞の増幅法開発の最も重要な解決課題のひとつと考えられる。

**目的：**テロメアの末端はシェルタリンと呼ばれるタンパク質複合体によってループ構造を安定化しているが、本研究ではその複合体メンバーの一つ、Pot1という分子に着目し、造血幹細胞におけるテロメアの安定性と自己複製能の維持について検討を行った。

**背景：**これまでに申請者は、①マウスにおけるPot1ホモログPot1aは造血幹細胞を含む分画のうち、自己複製を行う未分化な分画に多く発現すること、さらに加齢と共にその発現レベルは次第に低下していくことを見出している。また、mPot1aの過剰発現系の実験から、②高い血球コロニー形成能の維持や、③連続移植において高い骨髄再構築能を示すことを見出した。また、④mPot1aの発現を抑制すると自己複製能の維持が破綻することが分かった。

以上のことから申請者は、造血幹細胞におけるmPot1aの発現を調節することで、幹細胞の自己複製能を制御できるのではないかと仮説を立てた。

**序論：**生体組織を長期に亘って維持するためには、幹細胞を頂点としたシステム、特に幹細胞の自己複製能と多分化能の維持が不可欠である。近年、造血幹細胞増幅の研究領域では、自己複製に関連した分子を操作し、造血幹細胞の自己複製を促進する報告がされているが(Kros1 J et al., 2003; Suzuki T et al., 2006; Delaney C et al., 2010)、いずれも増殖時に起こるストレスには着目しておらず、これらの方法では、その影響を受けることが考えられる。細胞分裂の過程で起こり得るDNAダメージを検知/修復する機構に、Replication Protein A (RPA)-ATR経路が知られている。この機構は分裂時に露出する一本鎖テロメアDNAも認識し、細胞を老化や細胞死へと誘導するが、健全細胞においてはshelterin複合体の一つPot1によってATRの経路が競合阻害されている。Pot1は、一本鎖テロメアDNAに特異的に結合し、テロメアのループ形成および染色体の安定性に寄与している(Hockemeyer D et al., 2006)。

## 2. 方法

1) これまでに我々はmPot1aの導入が造血幹細胞の自己複製能の維持に有利であることを見出してきたが、そのメカニズムのひとつとしてテロメアにおけるDNAダメージとの関係を検討するために、造血幹細胞のテロメア領域におけるDNAダメージ応答の変化について解析した。まず、ウイルスベクターによってmPot1aを造血幹細胞に過剰発現し、これを致死量放射線照射したレシピエントマウスに骨髄移植する。4か月後、ドナー由来造血幹細胞を回収し、免疫染色法によりテロメア領域におけるDNAダメージ応答反応についてTelomere dysfunction- induced foci (TIFs)を指標に検討した。また、mPot1aを発現抑制した造血幹細胞について、1週間の体外培養後に同様の検討を行った。

2) 我々はこれまで知られていなかったmPot1aの造血幹細胞における機能について、レトロウイルスによる遺伝子導入法を用いて機能喪失・機能獲得の両面から解析を行い、幹細胞の生存および自己複製能の維持に必須であることや、外因性のmPot1aが幹細胞の増殖ストレスに対し抵抗性を与えることを明らかにした。しかしながら、レトロウイルスを用いた過剰発現系には、①導入効率の低さ②導入後の発現量を制御できない③事前にウイルス感染のための培養期間が

必要、といったいくつかの問題点が存在した。そこで我々は、mPot1aの導入法について従来法に代わり、膜透過性タンパク質の添加する方法に切り替えることで上記全ての問題点を解消することができた。Pot1分子に膜透過シグナル (MTS) を結合した膜透過性マウスPot1a (rmPot1a) またはヒトPOT1 (rhPOT1) の配列を含む発現ベクターを構築し、大腸菌にこれを導入・発現させたものを精製して以下の実験に用いた。

3) rmPot1aを培養中に添加し、培養後の未分化造血幹細胞 (Linage<sup>-</sup> /sca-1<sup>+</sup> /cKit<sup>+</sup> /CD41<sup>-</sup> /CD48<sup>-</sup> /CD150<sup>+</sup>) の数について、コントロール群との比較を行った。また、ここで得られた細胞群を致死量放射線照射したレシピエントマウスに骨髄移植し、骨髄再構築能について解析し、量的・質的な評価を行った。

4) 臍帯血由来ヒト造血幹細胞についても、Pot1の増強が同様の効果を持ち得るか否かを検討するため、rhPOT1を未分化ヒト造血幹細胞の培養下に添加し、培養後のコントロールとの数の比較を行った。また、得られた細胞群を用いて血球コロニー形成能の比較を行った。

### 3. 結果

#### 1) マウス造血幹細胞におけるテロメア領域のDNAダメージ応答

移植後4カ月のドナー由来造血幹細胞のテロメア領域DNAダメージ応答の量を比較すると、mPot1a導入群ではコントロール群と比較して約3分の1のレベルで抑制されていることが分かった。一方で発現抑制群ではコントロールと比較して有意にDNAダメージの量が増加していることが分かった。

#### 2) マウス未分化造血幹細胞のrmPot1a添加培養

未分化造血幹細胞の培養上清中にrmPot1aの添加を行い、培養後に増加した未分化造血幹細胞の総数をコントロール群と比較したところ、約3倍まで増加することが分かった。また、ここで得られた細胞群を用いて血球コロニー形成能を比較すると、未分化な血球コロニー (HPP-CFCs) の形成数が2.5倍増強することが分かった。

#### 3) rmPot1a添加で得られた未分化造血幹細胞の移植

rmPot1a添加で得られた造血幹細胞の*in vivo*における長期骨髄再構築能を評価するため、移植を行ったところ、末梢血のキメリズムはコントロールと比較して2.7倍の増加が見られた。また、移植後4カ月後の骨髄において、骨髄全体のキメリズムはコントロールの約4倍、未分化造血幹細胞分画のキメリズムでは約4.5倍の増加が見られた。また、このときの末梢血の各Linage (T cell, B cell, Myeloid系) への分化傾向にはcontrolと変化がなかった。

#### 4) ヒト臍帯血由来未分化造血幹細胞 (CD34<sup>+</sup> /CD38<sup>-</sup> /CD45RA<sup>-</sup> /CD90<sup>+</sup>) のrhPOT1添加培養

ヒト未分化造血幹細胞の培養上清中にrhPOT1の添加を行い、培養後に増加したヒト未分化造血幹細胞の総数をコントロール群と比較したところ、約2.3倍まで増加することが分かった。また、ここで得られた細胞群を用いて血球コロニー形成能を比較すると、未分化な血球コロニー (HPP-CFCs) の形成数が約2.4倍増強することが分かった。

### 4. 考察

造血幹細胞のテロメア領域におけるDNAダメージ応答は、mPot1aの増強によって有意に抑制され、逆に発現抑制すると短期間にDNAダメージが蓄積していくことが分かった。このことから、造血幹細胞におけるmPot1aの発現レベルがDNAダメージ応答の抑制を制御していることが示唆された。

マウス未分化造血幹細胞のrmPot1a添加培養の結果から、造血幹細胞の体外培養下においてrmPot1aを増強すると、造血幹細胞の総数は増加し、形成する未分化な血球コロニーの総数も増加することから、未分化な造血幹細胞がrmPot1a添加培養によって増幅された可能性が示唆された。この高いコロニー形成能を示した結果は、未分化造血幹細胞の総数が増加している結果を合わせて考察すると、少なくとも分裂速度の低下を誘導して未分化性を維持した結果ではないことが考えられる。また、rmPot1a添加培養で得られた造血幹細胞を移植し、長期骨髄再構築の機能の面でも増強されていることから、この培養系においては幹細胞の性質を維持しながら増幅されたことが考えられ、これは自己複製能が体外培養下でも維持されていた可能性を示唆するものである。

一方で、ヒト臍帯血由来未分化造血幹細胞においても、培養下にrhPOT1の添加を行うことで、その総数の増加および、高いコロニー形成能の維持が示されたことから、ヒト造血幹細胞においてもマウスと同様に、培養下での自己複製能が維持された可能性が考えられる。

以上より、造血幹細胞の体外培養時においてPot1の増強を行うことにより、テロメアにおけるDNAダメージ応答を抑制し、自己複製能を維持することができると考えられ、実際に体外培養によって幹細胞活性を有する未分化造血幹細胞を増幅することが可能となった。

今後この研究から、臨床応用可能なヒト造血幹細胞の体外増幅法の開発が期待される。

#### 5. 発表論文

Hosokawa K. et al., (in preparation)

#### 参考文献

- 1) Kros J. et al., Nat. Med. , 2003
- 2) Suzuki T et al., Stem Cells, 2006
- 3) Delaney C et al., Nat. Med., 2010
- 4) Hockemeyer D et al., Cell, 2006