

造血器腫瘍微小環境の変容に対するテロメア保護因子の機能解明

九州大学大学院医学研究院

細川 健太郎

## 1. 研究の背景と目的

造血幹細胞 (HSC) は骨髄ニッチに局在し、周囲のニッチ細胞との相互作用により未分化性を維持するとともに、外部からの種々のストレスから保護されている。近年、正常 HSC のみならず白血病幹細胞 (LSC) の維持にもニッチの支持が必要であることが報告されている (Maher et al., 2014; Yokoyama et al., 2016; Kumar et al., 2017)。染色体末端テロメア DNA は細胞分裂や酸化ストレスにより損傷を受けやすく、シェルタリン複合体が末端構造の形成および DNA 損傷応答の抑制を介してその安定性を維持することが知られている。申請者はシェルタリン複合体の構成タンパク質の一つである POT1 が HSC の機能維持に重要であることを報告した (Hosokawa K et al., Nat Commun. 2017)。さらに、LepR 陽性細胞特異的 Pot1a 欠損マウスを用いて骨髄ニッチ細胞における Pot1a 欠損の影響を代謝・細胞周期・造血支持能の観点から解析した結果、Pot1a が MSC の生存および造血支持に重要であることが示唆された (論文投稿中)。一方、本欠損マウスおよび対照マウスを用いて AML モデルを作製したところ、欠損群において発症が 1 週間遅延し、生存期間が 20~30 日延長することを見出した。そこで本研究では、AML 病態下における Pot1 欠損 MSC のトランスクリプトームを解析し、腫瘍微小環境の質的変化の要因を明らかにすることを第一の目的とする。さらに、MSC による AML 支持機構のうち Pot1 が制御する分子・経路を同定することにより、AML の発症・再発抑制に貢献し得る因子および介入点を特定し、新規治療法の開発につなげることを目指す。

## 2. 方法

### ① AML 環境下における MSC 集団の変化の解析

AML 細胞移植後 4 週時点における MSC 集団 (CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>Ter119<sup>-</sup>CD51<sup>+</sup>CD140a<sup>+</sup>Lepr<sup>+</sup>) の割合および絶対数をフローサイトメトリーにより解析した。

### ② 定常時および AML 環境下における MSC のトランスクリプトーム解析

定常状態の Pot1a 欠損マウス (Lepr-Cre(+); Pot1a<sup>fl/fl</sup>; NK 群) および対照マウス (Lepr-Cre(-); Pot1a<sup>fl/fl</sup>; NC 群) 由来 MSC、ならびに AML 細胞移植後 4 週の Pot1a 欠損マウス (AK 群) および対照マウス (AC 群) 由来 MSC をそれぞれ回収し、ライブラリ作製後に RNA-seq 解析を行った。4 群のうち NC-NK、AC-AK、NC-AC の比較を実施して Interaction DEGs を抽出した。続いて、AML 環境による遺伝子発現変化と Pot1a 欠損による発現変化の寄与割合をもとに四象限プロットを作成し、AML 環境下において Pot1a 欠損により発現が低下する遺伝子群および発現が上昇する遺伝子群を同定した。

## 3. 結果

### (1) 表現型

Pot1a 欠損により AML 進展が遅延し、末梢血・骨髄・脾臓における腫瘍細胞負荷の上昇が抑制された。また、腫瘍環境下では MSC の割合および増殖が低下しており、Pot1a 欠損 MSC が AML 刺激下において増殖・維持されにくい状態 (細胞数の減少) にあることが示唆された。

### (2) 代謝

AML-WT MSC (AC) では carnitine shuttle→β 酸化→TCA→OXPHOS の経路および ROS 関連遺伝子群の発現が相対的に高く、腫瘍環境下においてミトコンドリア酸化 (燃焼型) 代謝へと偏移していることが示唆された。一方、AML-KO MSC (AK) では糖代謝およびペルオキシソーム関連遺伝子群に大きな変動は認められず、発現低下の中心は脂肪酸をミトコンドリアへ輸送して酸化する経路 (CPT 系・膜輸送・呼吸鎖連動) に集中していた。具体的には、律速酵素である Cpt1a およびミトコンドリア内膜輸送体 Slc25a20、ならびに β 酸化のスパイラルを担う Hadhb/Acaa2 の発現が低下しており、脂肪酸輸送から燃焼に至る経路にボトルネックが生じていることが示唆された。加えて、Cd36 および Fabp4 の発現低下は脂肪酸の細胞内取り込みおよび輸送の減弱を反映しており、燃焼基質の

供給制限が重なっている可能性がある。

### (3) 膜脂質代謝への偏移

AK 群では Srebf2 (SREBP2) およびその代表的ターゲットである Insig1、Ldlr、Sqle、Dhcr24 の発現が上昇しており、コレステロール恒常性(合成および取り込み)プログラムの相対的な亢進が認められた。この所見は、ミトコンドリア燃焼型代謝の維持が困難となった MSC が、膜恒常性やストレス適応の観点から脂質恒常性維持側へ偏移することを示唆するものであり、AML 環境下での MSC の代謝状態が「燃焼型から膜脂質・恒常性型へ」移行することを支持する。

### (4) 免疫調節

AK 群では I134 の発現が低下しており、CSF1R リガンドとしての単球・マクロファージ系の維持、ならびに免疫抑制的/修復型(M2 様)マクロファージ誘導に対する MSC の支持機能が減弱する可能性が示された。さらに、AC 群で発現低下していた Cxcl9 および Cxcl10 が AK 群で回復傾向を示しており、腫瘍環境下において T 細胞応答(免疫活性化側)が部分的に回復するシナリオが考えられる。これらの所見は、Pot1a 欠損によって反応性ニッチの免疫抑制成分が減弱する可能性を示唆する。

### (5) アデノシン軸

免疫抑制性代謝として重要なアデノシン産生経路において、Nt5e (CD73) の発現は上昇する一方、細胞外 ATP の分解を担う Entpd1 (CD39) の発現は低下しており、細胞外 ATP→ADP/AMP への変換の開始段階が律速となる可能性が示唆された。ただし、Enpp1 (CD203a) の発現上昇が認められ、ATP/ADP から AMP を生成するバイパス経路が補完的に機能し得る。したがって、AK 群におけるアデノシン産生能は単純な低下ではなく、産生経路の再配分(CD39 依存経路の低下と ENPP1 依存の迂回経路への偏移)として捉えることが妥当である。

### (6) 支持因子

AML 環境下で誘導される血管活性化・炎症性ニッチ因子である Angpt2 および Vegfd、ならびに AML 支持に関与し得る Il6 の発現が AK 群において抑制された。これらの所見は、腫瘍環境下において MSC が担う血管新生・接着・炎症性の反応性ニッチ形成が減弱し、結果として AML 細胞のミトコンドリア代謝(OXPHOS)および増殖・生存への支援が低下する可能性を示す。

## 4. 考察

AML 病態下で Pot1a 欠損された MSC は、(i) 量的には増殖能力が対照群と比較して低下しており、MSC 数が減少し、(ii) 質的には脂肪酸をミトコンドリアへ運び燃焼する経路の維持が困難となる。その結果、MSC は代謝的に燃焼型プログラムを保持せず、膜恒常性・ストレス適応に関わるコレステロール恒常性へ相対的に偏る。こうした代謝状態の変化に伴い、免疫調節(I134 低下、Cxcl9/10 の回復、アデノシン経路の低下)および血管/炎症性ニッチ因子の産生が弱まり、総合的に MSC の AML 支持能が低下することで、AML 進展が遅延するモデルが想定される。

## 5. 今後の展望

本研究により、AML 病態下において Pot1a 欠損 MSC が量的・質的の両面で AML 支持能を低下させることが示された。今後は、トランスクリプトーム解析から抽出された候補分子(Cpt1a、I134、Angpt2、Entpd1 等)について個別の機能解析を進め、AML 支持能低下に直接寄与する分子経路を同定する。また、scRNA-seq を用いた腫瘍微小環境の網羅的解析により、Pot1a 欠損 MSC が骨髄内免疫細胞組成および細胞間シグナルネットワークに与える影響を細胞レベルで解明する。これらの基礎的知見をもとに、MSC 指向性デリバリー系を活用し、AML マウスモデルにおける Pot1a を標的とした核酸医薬戦略の確立を目指す。一過性かつ可逆的な Pot1a 発現抑制は、投与

タイミング・期間・用量の精密な制御を可能とし、正常 MSC への恒久的影響を最小化しつつ抗 AML 効果を発揮できる点で、臨床応用への合理的な橋渡しアプローチとなり得る。最終的には、ヒト AML 患者由来骨髄間質細胞における本研究で同定した分子経路の臨床的妥当性を検証し、骨髄ニッチを標的とした新規 AML 治療法の開発に貢献することを目指す。