

令和元年6月14日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2014～2018

課題番号：26115002

研究課題名(和文) ステムセルエイジングのエピジェネティクスとストレスシグナル

研究課題名(英文) Epigenetics and stress signals in stem cell aging

研究代表者

岩間 厚志(Iwama, Atsushi)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：70244126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 147,300,000円

研究成果の概要(和文)：加齢マウス造血幹細胞の解析から、造血幹細胞においてポリコーム複合体2 (PRC2) 標的遺伝子の発現が有意に亢進すること、プロモーターにおけるPRC2ヒストン修飾H3K27me3が加齢に伴い低下することが明らかとなり、加齢ストレスの関与が示唆された。またPRC2機能低下造血幹細胞の解析から、PRC2の機能低下が高齢者造血幹細胞腫瘍発症の誘因となること、これらの腫瘍に頻度の高い遺伝子変異の造腫瘍性を著明に増強することを確認した。これらの知見は、幹細胞の加齢変化におけるポリコーム機能の低下が変異を獲得した加齢造血幹細胞がクローン拡大する際のエピゲノム要因となっている可能性を示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

われわれのデータは、幹細胞の加齢変化におけるポリコーム機能の低下がdriver変異を獲得した加齢造血幹細胞がクローン拡大する際のエピゲノム要因となっている可能性を示唆しており、造血幹細胞腫瘍発症におけるステムセルエイジングの意義を支持するものである。このような知見は、加齢に伴う個体の老化と疾患が、幹細胞レベルの加齢変化の影響を大きく受けることを示しており、老化を理解する上で新しい観点を提示するものである。

研究成果の概要(英文)：We analyzed mouse hematopoietic stem cells (HSCs) and found that polycomb repressive complex 2 (PRC2) target genes marked with H3K27me3 moderately reduce H3K27me3 levels at their promoters in aged HSCs, resulting in the activation of PRC2 target gene signature in aged HSCs. Several aging stresses such as infection and myeloablative stresses attenuated the function of PRC2 like aging. In addition, PRC2 insufficiency in mice accelerated the development of age-related myeloid malignancies, such as myelodysplastic syndrome, in concert with driver mutations. These data suggest that a decline in PRC2 activity is associated with HSC aging and age-related clonal HSC disorders. Age-related decline in PRC2 activity could be one of the epigenomic determinants that facilitate expansion of HSC clones with founding driver.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：ステムセルエイジング 造血幹細胞 老化

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

幹細胞の長い寿命は、幹細胞の数的・質的劣化を防ぐ多様な安全装置によって支えられている。しかしながら、その寿命を担保するエピジェネティック制御機構の詳細は明らかではない。細胞老化誘導に関わる主な経路が p53 と Rb を中心とした癌抑制経路であり、Rb の重要な制御因子である p16^{Ink4a} は幹細胞において加齢とともに発現が上昇し、幹細胞の枯渇・機能低下の一因とされている。p16^{Ink4a} は p19^{Arf} とともに癌抑制遺伝子座 *Cdkn2a* (*Ink4a/Arf*) にコードされており、この遺伝子座の発現抑制をエピジェネティックに維持するのがポリコーム群複合体である。ポリコーム群複合体は、3 種類の複合体 (Polycomb repressive complex [PRC] 1、PRC1.1 および PRC2) に大別され、幹細胞の自己複製制御分子として機能する。研究代表者らは、ポリコーム群複合体が、*Ink4a/Arf* などの発現抑制を介して造血幹細胞の自己複製能 (Immunity, 2004; *J Exp Med* 2006) および分化能 (*Cell Stem Cell* 2010) を維持し、幹細胞の劣化を防ぐこと、また、ポリコーム群遺伝子 *Bmi1* の強制発現が造血幹細胞活性を増強し、連続移植などの老化ストレスに対して耐性を付与すること (*Plos One* 2012) を明らかにしてきた。したがって、加齢に伴うポリコーム群複合体の機能の変化を他のエピゲノム修飾との関連において検証することは、造血幹細胞のエージングを理解する上で極めて重要である。さらに申請者らは、造血幹細胞老化のブレーキとして機能するポリコーム群複合体の機能低下が、骨髄増殖性腫瘍 (*J Exp Med* 2012) や骨髄異形成症候群 (*J Exp Med* 2013; *Nat Commun* 2014) などの高齢者に好発する造血幹細胞疾患の温床となることを見出した。この知見は、造血幹細胞腫瘍におけるポリコーム群遺伝子の機能喪失型変異の同定と符合する知見であり、ステムセルエージングにおけるエピゲノム異常と疾患の緊密なつながりを示すものである。

2. 研究の目的

幹細胞の加齢変化は、臓器機能低下の原因になるとともに加齢関連疾患の誘因となる。本研究においては、加齢に伴う造血幹細胞のエピジェネティック変化を、ポリコーム群ヒストン修飾複合体の機能変化を中心に検証する。加齢に伴うポリコーム活性のゲノムワイドな変化と幹細胞機能・骨髄ニッチ機能をリンクさせながら検証し、ポリコーム群遺伝子改変マウスの解析とあわせて、ステムセルエージングにおけるエピゲノム変化の意義を明らかにする。また、加齢に伴い増加する造血器腫瘍に頻度の高いポリコーム群遺伝子の機能喪失型変異の検証を通して、ステムセルエージングと疾患の関連を分子レベルで明らかにする。

3. 研究の方法

加齢マウス由来ならびに連続移植により老化ストレスを過剰に負荷した造血幹細胞のエピゲノム変化を、ポリコームヒストン修飾を中心に、他のヒストン修飾 (H3K9me3 など) や DNA メチル化とともに検討する。また、ポリコーム群遺伝子を造血幹細胞や骨髄ニッチ細胞で操作することにより、造血幹細胞の加齢変化の予防、あるいは加齢造血幹細胞の若返りの可能性を検証するとともに、ステムセルエージングにおける骨髄ニッチの関与を検討する。さらに、この過程に伴うエピゲノム変化を解析し、ステムセルエージングのエピゲノムの実態を包括的に理解する。加えて、加齢に伴い造血幹細胞から腫瘍が発症する過程のエピゲノム変化を、ポリコーム群複合体の機能異常に焦点を当てて比較検討することにより、造血幹細胞のエージングと疾患の関連をエピゲノムの観点から検証する。

- 1) 造血幹細胞の加齢に伴うエピゲノム変化の解析
- 2) ポリコーム機能低下による造血幹細胞のエピゲノム変化とストレスシグナルの検証
- 3) 幹細胞特異的な老化ストレス反応機構の解明
- 4) エピゲノム操作による造血幹細胞の若返りとニッチ機能の解析
- 5) 造血幹細胞腫瘍の発症におけるステムセルエージングの関与とエピゲノム異常の解明

4. 研究成果

1) 造血幹細胞の加齢に伴うエピゲノム変化とストレスシグナルの検証
若年齢 (10 週) と加齢 (20 ヶ月) マウスの造血幹細胞 (HSC) と多能性前駆細胞 (MPP1-MPP4) の RNA シークエンスと、造血幹・前駆細胞の PRC2 ポリコーム修飾 H3K27me3 の ChIP シークエンスデータから、遺伝子発現プロファイルの加齢変化が明らかに示された。その要因の一つとして、HSC において H3K27me3 で発現が抑制される PRC2 標的遺伝子の発現が、有意に亢進することが確認された。グローバルな H3K27me3 の変化は軽微であるが、プロモーターにおける変化が加齢に伴い進行するものと考えられる。加齢に伴う様々なストレスがこのエピジェネティックリプログラミングに関わるものと考えられ、その同定を進めつつある。

さらに、オープンクロマチン領域解析 (Assay for Transposase-Accessible Chromatin Sequencing : ATAC-seq) を行った結果、加齢造血幹細胞においては、造血幹細胞特異的な転写因子群 (HoxA9, ERG など) の結合配列を有するクロマチン領域が閉鎖傾向にあること、酸化・親電子性ストレスで活性化する転写因子 NRF2 の結合配列を有するクロマチン領域が開放状態にあり、NRF2 の標的遺伝子の発現も上昇傾向にあることを見出した。これらの知見は、加齢に伴い幹細胞性が低下するとともに、より酸化・親電子性ストレスに曝露されていることを示しており、加齢造血幹細胞の機能低下の一因と考えられる。

また、加齢造血幹細胞 (Aged) を、骨髄ニッチを障害することなく前処置なしで若齢マウスに移植したところ、若齢骨髄ニッチに生着した加齢造血幹細胞 (Aged/Y) の遺伝子発現プロファイルが、大幅に若齢造血幹細胞 (Young) 様に回復することを見出した。この知見は、加齢造血幹細胞の遺伝子発現変化が加齢に伴うニッチ変化に強く依存することを示している。

2) エピゲノム操作による造血幹細胞とニッチ機能の解析

Vav-1-Cre;Rosa26Stop^{FL}Bmi1 を用いて、造血幹細胞に PRC1 構成因子 *Bmi1* を強制発現させたマウスの加齢を解析した。*Bmi1* の強制発現により、加齢に伴う造血幹細胞の分化異常に変化は認められないが、自己複製活性は若齢時と同等に維持されることを確認した。また、連続移植による数的・機能的劣化が抑制され、連続移植後に野生型で認められるポリコム標的遺伝子群の活性化が、有意に抑制されることが確認された。これは、上述の加齢に伴う PRC2 機能低下を PRC1 が補完するものと考えられ、幹細胞の加齢変化におけるポリコム機能の重要性を支持する。

ポリコム群複合体は骨髄ニッチ細胞においても重要な機能を有する。*Lepr-Cre:Bmi1^{fl/fl}* マウスにおいて骨髄血管周囲ストローマ細胞特異的に *Bmi1* を欠損させたところ、生後 4 か月で右図のような高度の脂肪化と造血幹細胞の減少が観察された。これはニッチ細胞の脂肪分化が促進された状態であり、ヒトの加齢に伴う骨髄変化に極めて類似した変化である。重要なことに、このマウスの造血幹細胞の遺伝子発現パターンは著明な加齢変化とともに PRC2 標的遺伝子の活性化を示した。このマウスをヒト加齢骨髄モデルとして、骨髄ニッチの加齢変化が幹細胞に及ぼす影響の解析を進めている。

3) 造血幹細胞腫瘍の発症におけるステムセルエイジングの関与とエピゲノム異常の解明

高齢者に好発する造血幹細胞腫瘍 (骨髄異形成症候群や骨髄線維症) には、PRC2 構成遺伝子 (*EZH2* 等) の機能喪失型変異や *EZH2* の発現低下が高率に認められ、PRC2 機能低下の関与が想定されていた。*Ezh2* 欠損造血幹細胞の解析から、PRC2 の機能低下が高齢者造血幹細胞腫瘍発症の誘因となること (*Blood* 2015)、さらに、これらの腫瘍に頻度の高い遺伝子変異 (*RUNX1* 変異や *JAK2V617F*) の造腫瘍性を著明に増強することを明らかにした (*Nat Commun* 2014; *J Exp Med* 2016)。これらの知見は、1)-2)の項目の解析から示された幹細胞の加齢変化におけるポリコム機能の低下が driver 変異を獲得した加齢造血幹細胞がクローン拡大する際のエピゲノム要因となっている可能性を示唆しており、造血幹細胞腫瘍発症におけるステムセルエイジングの意義を支持するものである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 60 件)

- Miyagi S, Sroczynska P, Kato Y, Nakajima-Takagi Y, Oshima M, Rizq O, Takayama N, Saraya A, Mizuno S, Sugiyama F, Takahashi S, Matsuzaki Y, Christensen J, Helin K, and *Iwama A. The chromatin binding protein Phf6 restricts the self-renewal of hematopoietic stem cells. *Blood* Mar 27. pii: blood.2019000468.
- Aoyama K, Oshima M, Koide S, Suzuki E, Mochizuki-Kashio M, Kato Y, Tara S, Shinoda D, Hiura N, Nakajima-Takagi Y, Sashida G, and Iwama A. Ezh1 targets bivalent developmental regulator genes to maintain self-renewing stem cells in *Ezh2*-insufficient myelodysplastic syndrome. *iScience* 9:161-174, 2018.
- Tara S, Isshiki Y, Nakajima-Takagi Y, Oshima M, Aoyama K, Tanaka T, Shinoda D, Koide S, Saraya A, Miyagi S, Manabe I, Matsui H, Koseki H, Bardwell VJ, *Iwama A. *Bcor* insufficiency promotes initiation and progression of myelodysplastic syndrome. *Blood* 132(23):2470-2483, 2018.
- Wang C, Oshima M, Sato D, Matsui H, Kubota S, Aoyama K, Nakajima-Takagi Y, Koide S, Matsubayashi J, Mochizuki-Kashio M, Nakano-Yokomizo T, Bai J, Nagao T, Kanai A, *Iwama A, and *Sashida G. Ezh2 loss promotes transformation of early T cell precursors by propagating pathogenic DNA hyper-methylation at T-cell developmental regulator genes. *J Clin Invest* 128(9):3872-3886, 2018.
- Si S, Nakajima-Takagi Y, Iga, T, Tsuji M, Hou L, Oshima M, Koide S, Saraya A, Yamazaki S, Takubo K, Kubota Y, *Minamino T, and Iwama A. Hematopoietic insults damage bone marrow niche by activating p53 in vascular endothelial cells. *Exp Hematol* 63:41-51, 2018.
- Tanaka T, Nakajima-Takagi Y, Aoyama K, Tara S, Oshima M, Saraya A, Koide S, Si S, Manabe I, Sanada M, Nakayama M, Masuko M, Sone H, Koseki H and *Iwama A. Internal deletion of BCOR reveals a tumor suppressor function for BCOR in T lymphocyte malignancies. *J Exp Med* 210(10):2901-2913, 2017.
- Rizq O, Mimura N, Oshima M, Saraya A, Koide S, Kato Y, Aoyama K, Nakajima-Takagi Y, Wang C, Chiba T, Ma A, Jin J, Iseki T, Nakaseko C, *Iwama A. Dual inhibition of EZH2 and EZH1 sensitizes PRC2-dependent tumors to proteasome inhibition. *Clin Cancer Res* 23(16):4817-4830, 2017.
- Iwama A. Polycomb repressive complexes in hematological malignancies. (Review) *Blood* 130(1): 23-29, 2017.
- Hasegawa N, Oshima M, Sashida G, Matsui H, Koide S, Saraya A, Wang C, Muto T, Takane K, Kaneda A, Shimoda K, Nakaseko C, Yokote K, *Iwama A. Impact of combinatorial dysfunctions of Tet2 and Ezh2 on the epigenome in the pathogenesis of myelodysplastic syndrome. *Leukemia*

- 31(4):861-871, 2017.
- Sashida G, Wang S, Tomioka T, Oshima M, Kazumasa Aoyama K, Kanai A, Mochizuki-Kashio M, Harada H, Shimoda K, *Iwama A. The loss of Ezh2 cooperates with an active JAK2 mutant in the pathogenesis of myelofibrosis and sensitizes tumor-initiating cells to bromodomain inhibition. **J Exp Med** 213(8):1459-1477, 2016.
- 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, and *Iwama A. Setdb1 maintains hematopoietic stem and progenitor cells by restricting the ectopic activation of non-hematopoietic genes. **Blood** 128(5):638-649, 2016.
- Oshima M, Hasegawa N, Mochizuki-Kashio M, Muto T, Miyagi S, Koide S, Yabata S, Wendt G, Saraya A, Wang C, Shimoda K, Suzuki Y, *Iwama A. Ezh2 regulates the Lin28/let-7 pathway to restrict activation of fetal gene signature in adult hematopoietic stem cells. **Exp Hematol** 44:282-296, 2016.
- Mochizuki-Kashio M, Aoyama K, Sashida G, Oshima M, Tomioka T, Muto T, Wang C, and *Iwama A. Ezh2 loss in hematopoietic stem cells predisposes mice to develop heterogeneous malignancies in an Ezh1-dependent manner. **Blood** 126:1172-1183, 2015
- Mishima Y, Wang C, Miyagi S, Saraya A, Hosokawa H, Mochizuki-Kashio M, Nakajima-Takagi Y, Koide S, Negishi M, Sashida G, Naito T, Ishikura T, Onodera A, Nakayama T, Tenen DG, Yamaguchi N, Koseki H, Taniuchi I, and *Iwama A. Histone acetylation mediated by Brd1/Brpf2 is crucial for *Cd8* gene activation during early thymocyte development. **Nat Commun** 5:5872, 2014.
- Sashida G, Harada H, Matsui H, Oshima M, Yui M, Harada Y, Tanaka S, Mochizuki-Kashio M, Wang C, Saraya A, Muto T, Inaba T, Koseki H, Huang G, Kitamura T, and *Iwama A. Ezh2 loss promotes development of myelodysplastic syndrome but attenuates its predisposition to leukemic transformation. **Nat Commun** 5:4177, 2014.

[学会発表] (計 多数 件)

1. Iwama A. "Deregulated polycomb functions in the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms" JSH/EHA joint session, The 9th JSH International Symposium. July 27-28, 2018 (Kyoto)
2. Iwama A. "PRC1.1, a variant polycomb repressive complex 1 in normal and malignant hematopoiesis. McCulloch & Till Lecture Award, The 47th Annual Scientific Meeting, International Society for Experimental Hematology, 23-26 August, 2018 (Los Angeles, CA, USA)
3. Iwama A. "Polycomb repressive complexes in hematological malignancies" 11th International Workshop on Molecular Aspects of Myeloid Stem Cell Development and Leukemia. May 2-5, 2016 (Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio, USA)
4. Iwama A. "Role of non-canonical polycomb repressive complex 1 in fate decision of hematopoietic stem cells. Annual Meeting of International Society of Stem Cell Research. June 22-25, 2016 (Moscone West, San Francisco, California, USA)
5. Iwama A. Epigenetic regulation of hematopoiesis and disease in Symposium "Hematopoiesis". KEYSTONE SYMPOSIA on Molecular and Cellular Biology (Keystone, USA) 2015.02.22-27

[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]

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/molmed/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：石川冬木

ローマ字氏名：Ishikawa, Fuyuki

所属研究機関名：京都大学

部局名：生命科学研究科

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：30184493

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。