

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20959

研究課題名(和文)造血幹細胞の加齢変化と造血器腫瘍発症のエピゲノム基盤の解明

研究課題名(英文)Epigenetic bases for HSCs aging and development of hematopoietic disorder

研究代表者

大島 基彦(Oshima, Motohiko)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：70506287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞の生理的加齢に伴う様々な変化について検証を行い、老齢造血幹・前駆細胞において、ポリコム群抑制性複合体2(PCR2)の標的遺伝子の発現が顕著に増加していることが確認された。更に加齢に伴いPCR2標的遺伝子のTSSにおけるH3K27me3レベルが減少することが示された。また、老化ストレスの一つである感染性ストレスにより、老化細胞に近い遺伝子プロファイルを示すと共にH3K27me3レベルの減少が認められた。老齢造血幹細胞においてPCR2の機能低下を引き起こすEzh2のS21リン酸化が顕著に亢進していることが確認された。

研究成果の概要(英文)：We found that PCR2 target genes were de-repressed in aged hematopoietic stem cells (HSCs) compared with young HSCs. We performed ChIP-seq and found that H3k27me3 levels of PCR2 target genes around TSS were significantly decreased in aged HSCs. chronic inflammation stress, which is known to be one of aging stress, caused significantly decreased H3K27me3 levels and acquired aging gene expression profile. In aged HSCs, we found that Ezh2 S21 phosphorylation, which is related to dysfunction of PCR2 complex, was significantly increased.

研究分野：分子生物学

キーワード：老化造血幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

加齢に伴い造血幹細胞は、幹細胞活性の減弱や骨髄球系への分化の偏りなど様々な変化を示すとともに、骨髄球系腫瘍の温床となる。エピゲノムも様々な変化することが想定されているがその詳細は不明である。このような中、健康な成人においても遺伝子変異を伴ったクローナル造血が認められ、加齢に伴いその頻度が増加するとともに、造血器腫瘍の発症に密接に関与することが明らかにされた (Genovese et al., NEJM 371:2477, 2014)。驚くべきことに、このクローナル造血の原因となる遺伝子は DNMT3A, TET2, ASXL1 などのエピジェネティック制御遺伝子が多く、これらの遺伝子変異が加齢造血幹細胞のエピゲノム異常を増強し、クローンの増殖優位性を担保することでクローン拡大につながるものと考えられる。そこで本研究においては、まずマウス造血幹細胞の生理的加齢に伴うエピゲノム変化を詳細に検証する。さらに、高齢者におけるクローナル造血の原因遺伝子として頻度の高い TET2 (DNA 脱メチル化酵素) と、クローナル造血から高齢者に好発する MDS 発症に至る際の 2 次的変異として頻度の高いポリコム群遺伝子 EZH2 (ヒストン修飾 H3K27me3 を触媒し転写を抑制する) の機能異常に伴うエピゲノム変化を、申請者がこれまでに報告した MDS マウスモデル (J Exp Med 2013) を用いて検証し、MDS 発症における、(1)加齢に伴う造血幹細胞の生理的変化と、(2)エピジェネティック遺伝子変異に伴う造血幹細胞のエピゲノム変化の関与ならびに関連について理解する。さらに、Tet2 および Ezh2 の機能異常の誘導時期を若齢と老齢マウス間で比較することにより、加齢造血幹細胞からクローン造血、さらには造血器腫瘍発症へと進展するエピゲノム基盤を明らかにし、造血器腫瘍における加齢と造血幹細胞のエピゲノム変化の病因論的意義を明らかにする。加齢とともに造血器腫瘍は増加するが、特に MDS はその頻度が上昇し、超高齢社会において罹患者が急増している。TET2 変異、EZH2 変異とともに高齢者の MDS に頻度が高いことから、TET2, EZH2 変異は若齢よりも加齢造血幹細胞においてより特異的に病因論的意義を有する事が想定されるが、加齢造血幹細胞のエピゲノム特性にどのように依存するのかは不明である。本研究においてはこの点に焦点を当て研究を行う。

### 2. 研究の目的

近年、遺伝子変異を伴った造血幹細胞によるクローナル造血の頻度が加齢とともに増加し、造血器腫瘍の発症に密接に関与することが明らかにされた。このクローナル造血の原因遺伝子はエピジェネティック制御遺伝子が多く、これらの遺伝子変異が加齢造血幹細胞のエピゲノム異常を増強し、クローンの増殖優位性を担保するものと考えられる。この

過程を理解するために、本研究においてはマウス造血幹細胞の生理的加齢に伴うエピゲノム変化を詳細に検証すると共に、骨髄異形成症候群 (MDS) の原因遺伝子である *Tet2* と *Ezh2* の遺伝子欠損の誘導時期を若齢と老齢マウス間で比較することで、加齢造血幹細胞からクローン造血、造血器腫瘍発症への進展に関わるエピゲノム基盤を明らかにし、造血器腫瘍における加齢と造血幹細胞のエピゲノム変化の病因論的意義を明らかにする。

### 3. 研究の方法

若齢、中間齢および老齢マウスの造血幹・前駆細胞を用いて、DNA メチル化解析 (eRRBS-seq, 5-hmC DIP-seq)、ヒストン修飾解析 (ChIP-seq) 及びトランスクリプトーム解析 (RNA-seq) を行い、加齢に伴う造血幹細胞のゲノムワイドなエピゲノム変化を理解する。次に、時期特異的、造血幹細胞特異的に *Tet2* および *Ezh2* 遺伝子を欠損するコンパウンドマウスを作製し、若齢 (10 週) と中間齢 (12 ヶ月) において遺伝子を欠損させ、MDS 発症に至る経過と、欠損年齢の違いによるエピゲノム変化について、若齢および加齢造血幹細胞との比較を行いながら検証し、生理的加齢に伴う造血幹細胞のエピゲノム変化の造血器腫瘍発症における病因論的意義を理解するとともに、造血器腫瘍の発症リスクの増大に関与するエピゲノム要因を同定する。

### 4. 研究成果

造血幹細胞の生理的加齢に伴う様々な変化について調べるため、若齢 (10 週) 及び老齢 (20-24 ヶ月) マウスから純化した造血幹・前駆細胞を用いて RNA-seq を行ったところ、老齢造血幹・前駆細胞において、*Ezh2*, *Ezh1* を構成因子として含むポリコム群抑制性複合体 2 (PRC2) の標的遺伝子の発現が顕著に増加していることが確認された (Figure 1)。

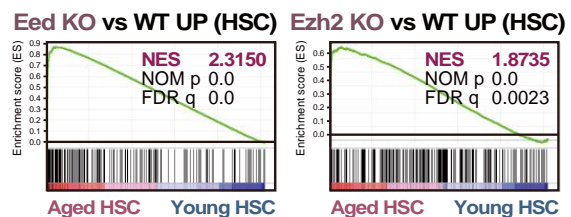


Figure 1

そこで、ChIP-seq により H3K27me3 の変化について検証したところ、PRC2 標的遺伝子の転写開始点における H3K27me3 レベルが、加齢に伴い減少していることが示されたことから、老化造血幹・前駆細胞では、PRC2 の機能が減弱することで H3K27me3 レベルが減少し、複数の遺伝子の転写抑制が解除されている事が明らかとなった (Figure 2)。

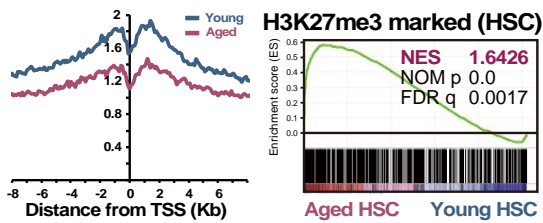


Figure 2

次に、加齢におけるどのようなシグナルが PRC2 の機能に影響を与えるかについて調べるため、老化ストレスの一つとして知られる感染性のストレスによる影響について検証を行った。1ヶ月間の LPS 投与により慢性的な感染ストレスを加え、1ヶ月後に解析を行った結果、遺伝子発現はコントロールと比べ老化細胞に近くなり、H3K27me3 レベルは減少することが示された。また、Akt を介した Ezh2 C 末端側 21 番目のセリン残基のリン酸化により、PRC2 の機能が減弱することが報告されているので (Figure 3A)、若齢、及び老齢の造血幹細胞を用いて免疫染色により Ezh2 S21 リン酸化を調べた所、老齢造血幹細胞において Ezh2 の S21 リン酸化が顕著に亢進していることが確認されたことから (Figure 3B)、老化造血幹細胞における PRC2 の機能減弱の分子機構に Ezh2 S21 リン酸化が関わることを示唆された。

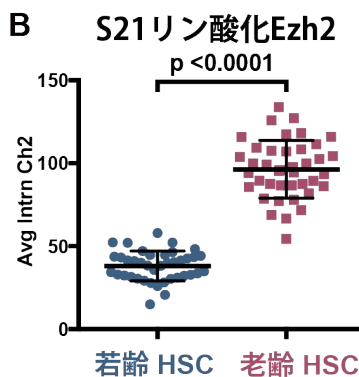
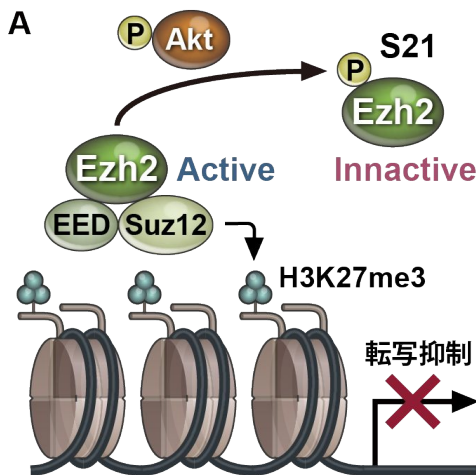


Figure 3

## 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 7件)

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, Iwama A. Internal deletion of BCOR reveals a tumor suppressor function for BCOR in T lymphocyte malignancies. *J Exp Med* 査読有 214(10):2901-2913. 2017 doi: 10.1084/jem.20170167.

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* 査読有 23(16):4817-4830. 2017 doi: 10.1158/1078-0432.

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* 査読有 31(4):861-871. 2017 (\*Co-first authors) doi: 10.1038/leu.2016.268.

Sashida G, Wang C, Tomioka T, Oshima M, Aoyama K, Kanai A, Mochizuki-Kashio M, Harada H, Shimoda K, Iwama A. The loss of Ezh2 drives the pathogenesis of myelofibrosis and sensitizes tumor-initiating cells to bromodomain inhibition. *J Exp Med* 査読有 213(8):1459-77. 2016 doi: 10.1084/jem.20151121.

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 non-hematopoietic genes. *Blood* 査読有 128(5):638-49. 2016 doi: 10.1182/blood-2016-01-694810.

Si S, Nakajima-Takagi Y, Aoyama K, Oshima M, Saraya A, Sugishita H, Nakayama M, Ishikura T, Koseki H, Iwama A. L

oss of Pcgf5 Affects Global H2A Monoubiquitination but Not the Function of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. **PLoS One** 査読有 11(5):e0154561 2016 doi: 10.1371/journal.pone.0154561.

**Oshima M**, Hasegawa N, Mochizuki-Kashio M, Muto T, Miyagi S, Koide S, Yabata S, George Wendt GR, 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** 査読有 44(4):282-296. 2016 doi: 10.1016/j.exphem.2015.12.009.

〔学会発表〕(計 4 件)

**Motohiko Oshima**, Kazumasa Aoyama, Changshan Wang, Shuhei Koide, Atsushi Iwama. Functional defect of Polycomb group complex during hematopoietic cell aging and myeloid malignancies. NGS 現場の会 第五回研究会 2017 年

**Motohiko Oshima**, Kazumasa Aoyama, Changshan Wang, Shuhei Koide, Atsushi Iwama. Functional defect of Polycomb group complex during hematopoietic stem cell aging and myeloid malignancies. 第 15 回 幹細胞シンポジウム 2017 年

**大島基彦**, 小出周平, 岩間厚志 造血幹細胞老化に関わるポリコム群複合体機能異常の解明 第 89 回日本生化学会 2016 年

**Motohiko Oshima**, Changshan Wang, Shuhei Koide, Atsushi Iwama. Profiling of transcriptional properties of aged hematopoietic stem and progenitor cells. 第 78 回 日本血液学会 2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

大島 基彦 (Oshima, Motohiko)  
千葉大学・大学院医学研究院・助教  
研究者番号 : 70506287

(2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号 :

(4) 研究協力者

なし ( )