

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 7 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09899

研究課題名(和文) エピゲノム情報を基にしたヒト造血幹細胞の自己複製機構の解明を目指した研究

研究課題名(英文) Study for self-renewal in human hematopoietic stem cells by genome wide epigenetic analysis

研究代表者

高山 直也 (Takayama, Naoya)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：10584229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：長期骨髄再構築能を持つ造血幹細胞(HSC)と自己複製能を消失した直後の短期造血幹細胞の違いは、遺伝子発現解析の結果明確な差異は見られず、静止期の幹細胞には遺伝子発現解析では捉えられない重要な生命原理が存在するという仮説に至った。本研究では、ATAC-seq法の詳細な解析から、HSCと、短期造血幹細胞を含むその他の前駆細胞を区別するActive HSPC signature(オープンクロマチンサイト)を得た。このサイトにはCTCFの結合領域が濃縮されており、HiC法との解析から、CTCFを介したゲノムの3次元構造の変化により、LT-HSCの静止期からの離脱が制御されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高い自己複製能を持つ造血幹細胞は、造血幹細胞移植など再生医療へ広く応用可能であるが、深刻なドナー不足は解決の目処がたっていない。その解決策として、HSC固有の能力である自己複製機構を正しく理解し、自己複製能を維持したまま増幅できる培養系の確立が必要である。本研究では、最新の血液細胞識別法を用いてヒト臍帯血由来血液細胞を高純化し、最新のエピゲノム解析を駆使することで、造血幹細胞の自己複製能に直結する静止期離脱機構にCTCFを介したゲノムの3次元構造の変化が必須であることを世界に先駆けて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Human Long Term-hematopoietic stem cells (LT-HSC) is required for life-long blood production. Though both LT-HSC and the Short Term (ST)-HSC that lie immediately downstream are capable of multilineage repopulation, only LT-HSC possess sufficient capacity for self-renewal. As few transcriptional changes underlie this transition, we used ATAC-seq on human stem/progenitor subsets (HSPC) to uncover unique chromatin accessibility signatures (Act/HSPC signature), which discriminate LT-HSC and other progenitors. The Act/HSPC signature contains CTCF binding sites mediating chromatin interactions, engaged in ST-HSC but not LT-HSC, enclosing multiple stemness pathway genes active in LT-HSC and repressed in ST-HSC. CTCF silencing derepressed stemness genes and inhibited the transition from quiescent LT-HSC to activated ST-HSC. Hence, 3D chromatin mediator, CTCF, endow a new gatekeeper function that governs the disparate stemness pathways linked to quiescence and self-renewal in HSC.

研究分野：幹細胞

キーワード：ヒト造血幹細胞 クロマチン CTCF

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞 (hematopoietic stem cell:HSC) 移植は実用化されている再生医療の成功例であるが、深刻なドナー不足は解決の目処がたっていない。その解決策として、HSC 固有の能力である自己複製機構を正しく理解し、自己複製能を維持したまま増幅できる培養系の確立が必要である。

HSC の自己複製機構の先行研究では、遺伝子発現プロファイル解析に基づく解析データが蓄積されたが依然未解明な点も多く、長期間の安定した維持・増幅培養系の確立には至っていない。HSC と自己複製能を消失した多能性造血前駆細胞 (MultiPotent Progenitor:MPP) の違いは、申請者らが最近その詳細な差異を明らかにしており(Notta, Science 2011)、HSC のみが自己複製能を保持可能であることを担保した実験モデルとして非常に有用である。

HSC から MPP、さらに様々な終末分化細胞までの分化下流の細胞同士を比較することで、自己複製能および各種細胞系譜への分化制御のメカニズムを知る手がかりを得ることが可能である。興味深いことに、臍帯血由来のヒト HSC(Lin-/CD34+/CD38-/CD45RA-/CD90+/CD49f+) と MPP(Lin-/CD34+/CD38-/CD45RA-/CD90-/CD49f-)の遺伝子発現解析では、明確な遺伝子発現の違いは得られなかった。一方、細胞周期に着目すると HSC や MPP の 90%以上は静止期の細胞であり、細胞の性質を規定する重要な遺伝子が、定常状態では全て発現しているとは限らないと推察できる。以上の知見から、これらの細胞は何らかの刺激に対応して速やかに発現する準備段階であると考えられ、静止期の幹細胞には遺伝子発現解析では捉えられない重要な生命原理が存在するという仮説に至った。エピゲノム解析は、活性化のみならず準備段階であるゲノム領域を捉えることが可能であるため、本仮説の検証に最適である。

以上の仮説のもと、本提案前に、以下の予備実験の結果を得ていた。

臍帯血由来の高純化細胞集団の ATAC-seq を実行し、各細胞系譜特徴的なクロマチンオープン領域 (chromatin accessibility signatures) での既知因子 (CEBP; Granulocyte/Monocyte, B cell; OCT, Progenitors; HOX など) を確認し実験の信頼性を保障した。本条件下において 10 数個のモチーフが HSC と MPP 以下の分化下流細胞を差別化する因子として同定された。このうち、CTCF の結合シーケンスが、Act-HPSC signature(造血幹細胞では開いておらず、MPP 以降の早期前駆細胞で開いているクロマチン領域)に多数存在することを同定した。

CTCF は HSC から、早期の MPP への移行に重要な因子であることが予想されたため、Sh RNA 法を用いて抑制したところ、コントロールと比較して、CTCF-knockdown (KD) では、すべての分化細胞の産生が減少すること、造血幹細胞 (HSC) の G0 期が増加することを証明した。興味深いことに、より分化段階が進んだ(多能性造血前駆細胞; MPP や CD34+/CD38+)造血前駆細胞段階で CTCF の発現抑制を行っても、細胞周期にはほとんど影響が見られず、CTCF の役割は、造血幹細胞が G0 静止期から脱出する過程で重要なゲートキーパー因子であることが明らかになった。以上から、クロマチンオープン状態から推察できる遺伝子発現状態/準備状態の違いから抽出した遺伝子により、自己複製能を制御する新たな因子を同定した。

2. 研究の目的

これらの予備データから、HSCの静止期からの脱出および分化開始にCTCFが必須の遺伝子であることが明らかになった。CTCFはCohesin因子と協調し、クロマチンの3次元構造を形成し、EnhancerとPromoterの距離を変化させることで、ゲノムワイドに遺伝子発現を調節する重要な因子である。しかし、造血系におけるCTCFの役割は詳細に解析されておらず、また、今回申請者が捉えた、幹細胞の静止期からの脱出機構に関与するという事実は知られていない。

そこで本研究では、以下の点を明らかにし、造血幹細胞の自己複製機構を人為的に制御する‘作用点’の候補を見出し、将来的な造血幹細胞の体外増幅の可能性を検証する。

- (1) CTCFによる幹細胞特異的な静止期脱出制御機構の解明
- (2) 造血幹細胞の静止期離脱におけるCTCFと協調する因子の同定

3. 研究の方法

CTCFによるChIP、および、Chromatin conformation capture法、CTCF抑制後のRNA sequenceによる遺伝子発現解析により、CTCFのターゲット因子を同定する。

CTCFによるChIPデータから、CTCFのco-factorを同定する。

CTCF以外に同定されている、候補モチーフのシーケンス情報をもとに、候補転写因子のChIP解析を行い、各細胞集団特異的に結合し、性質を決定する因子を同定することで同定された候補遺伝子の改変実験により、他の自己複製因子の同定を目指す。

4. 研究成果

申請者らが開発してきた最新の高純化法 (Notta et. al., Science) により、造血幹細胞を含むヒト血液細胞集団を純化し行なった上記ATAC sequence解析の結果、

I) 従来の報告では同定されていないヒトHSCとMPPを識別するクロマチンサイトとして、Active HSPC (ActHSPC) signatureとLT-HSPC signatureを同定した。これらは互いに逆相関したパターンをとり、ActHSPC signatureは、HSCで閉じているが、MPP以降の前駆細胞で開くサイトであり、LT-HSPC signatureはHSCで最も開いており、徐々に閉じていくサイトであった。

II) 追加で検証した造血幹・前駆細胞のsingle cell ATAC sequenceの結果、ActHSPC signatureのシグナル増加とCTCF結合サイトの増加がシングルセルレベルで徐々に移行していくことが確認された。

III) OCI-AML2 (AML cell line)を用いたHiCおよびCTCF ChIPから、ActHSPCサイトのCTCFが結合するクロマチンループが、従来造血幹細胞との関連を示されてきた細胞周期、ストレス応答、代謝など幹細胞制御に重要なパスウェイを制御することでHSCの分化が開始されるという新規機序を解明した(投稿中)。

IV) CTCF抑制後のRNA sequence解析から、CTCFの標的因子の一つとして、Factor Xに着目した。この遺伝子は臍帯血由来造血幹細胞で最も高発現しており、多能性前駆細胞が

ら下流の前駆細胞へと分化する過程で、減少していく、造血幹細胞において CTCF をロックダウンすると、遺伝子 X の発現が上昇する、遺伝子 X をロックダウンすると、これまでの in vitro の検証では有意に造血幹細胞分画は減少する。

以上の結果から、CTCF の標的として幹細胞制御への関与が強く疑われ、次年度からの新規基盤研究の基礎データを得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高山 直也
2. 発表標題 A new role for CTCF as a gatekeeper of stemness in human hematopoietic stem cells
3. 学会等名 日本血液学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高山 直也
2. 発表標題 A new role for CTCF as a gatekeeper of stemness in human hematopoietic stem cells
3. 学会等名 JSHIH2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高山 直也
2. 発表標題 Chromatin transitions define a functional role for CFTC in regulating human hematopoietic stem cell function
3. 学会等名 2018年度 日本血液学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	江藤 浩之 (Eto Koji) (50286986)	京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	小原 収 (Ohara Osamu) (20370926)	公益財団法人かずさDNA研究所・技術開発研究部・副所長 (82508)	
連携研究者	遠藤 高帆 (Endo Takaho) (40384862)	国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・上級研究員 (82401)	