

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08355

研究課題名(和文) 老化に伴う造血幹細胞のリンパ球産生機能低下を制御する方法の開発

研究課題名(英文) Innovation of new methods rejuvenating lymphopoietic activity in aged hematopoietic stem cells

研究代表者

横田 貴史 (Yokota, Takafumi)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：60403200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞におけるクロマチン構造調節蛋白Special AT-rich sequence binding protein 1 (SATB1)の役割を解析した。SATB1の片アリルに蛍光色素tomato遺伝子を導入したマウス作製し、生体内のSATB1の発現を正確にモニタリングできる実験系を確立した。このマウスにおいて造血幹細胞分画をSATB1の発現量に基づいて細分化し、単細胞の移植実験を行った結果、SATB1を高発現する造血幹細胞の方が、リンパ球系細胞の産生能力のみならず長期造血再構築能力も高いことが分かった。さらに老齢SATB1-tomatoレポーターマウスの解析では腫瘍発生を観察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らはリンパ球造血の老化とSATB1の発現低下が密接に関係していることを見出し、「免疫老化」のメカニズムとその予防の観点から研究を行ってきた。本研究では、SATB1の生体での機能を解析する上で、信頼性の高い研究材料としてSATB1-tdTomatoレポーターマウスを作製し、造血幹細胞の機能がSATB1によって制御されていることを示した。さらに予想外の知見として、SATB1の半欠損が加齢に伴って悪性腫瘍を誘発することを見出した。この結果は、高齢者の悪性腫瘍にSATB1の異常が関連している可能性を示唆しており、今後従来とは異なる角度から、悪性腫瘍の発症予防研究につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：We previously identified special AT-rich sequence binding protein 1 (SATB1), a global chromatin organizer, as a lymphoid-inducing molecule in hematopoietic stem cells (HSCs). In this study, we generated SATB1 reporter mice in which SATB1 expression can be precisely monitored in vivo, and examined the early differentiation of HSCs. HSC-enriched fraction consisted of diverse HSCs in terms of SATB1 expression levels. Then, HSCs from SATB1/Tomato-knockin reporter mice were classified based on SATB1/Tomato intensity and were sorted for functional assessments. With single HSC transplantation, we revealed that high self-renewing capability as well as stronger differentiation potential toward the lymphocytic lineage was associated with high SATB1 levels. Furthermore, we observed high susceptibility to malignant tumors in SATB1 reporter mice, in which SATB1 gene was heterozygously deleted.

研究分野：血液内科学

キーワード：造血幹細胞 老化 リンパ球分化 クロマチン構造制御タンパク

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、造血幹細胞の生理的特質とリンパ球系初期分化の分子制御機構に焦点を当て、約20年間継続的な研究を行ってきた。SATB1はTリンパ球の分化と機能において重要な役割を持つ分子として報告されていたが、申請者らは独自に開発した細胞分離方法を用いて解析を行い、骨髄中の造血幹細胞や未分化リンパ球前駆細胞においてもSATB1が発現していることを見出した。SATB1の発現量はリンパ球系への初期分化に伴って増加し、機能的に造血幹細胞の運命決定に強く関与していた。さらに老化による造血幹細胞の機能低下にSATB1の発現低下が関与しており、外来的なSATB1の発現誘導によって造血幹細胞のリンパ球産生能力を増幅できることを見出した。老化に伴う免疫機能低下の原因として、造血幹細胞の質的変化の影響が近年世界的に注目されている。申請者らは独自の知見をもとに、SATB1の機能と発現調節機構の解析を通じて、造血幹細胞の老化を制御する方法の開発に繋げるという着想に至った。

2. 研究の目的

造血幹細胞がリンパ球へと分化する過程を人為的に調節するには、転写因子群の精巧なネットワークに加え、それを裏打ちするエピゲノム調節機構を捉えることが重要である。これまでの研究で申請者らは、造血幹細胞のエピゲノム調節機構においてSATB1が重要な役割を果たしていることを明らかにした。今回の申請研究では、造血幹細胞におけるSATB1の発現制御メカニズムを明らかにし、生活習慣・ストレスなどの外来刺激や、個体の老化がSATB1の発現にどのような影響を与えるかを解析する。さらにSATB1の発現回復によって、老化で低下した造血幹細胞のリンパ球産生能力を人為的に賦活する方法を開発し、感染症や悪性腫瘍に対するワクチン接種の有効性の向上を目指した。

3. 研究の方法

(1) SATB1発現レベルをモニターできるレポーターマウスの作製と解析

SATB1欠損マウスの解析から、SATB1の両アレルの欠損は致死的であるが、片アレルの欠損は、少なくとも生後1年は造血・免疫系に重篤な問題を生じず、通常に繁殖することがわかった。そこで、SATB1の片アレルに蛍光色素の遺伝子を導入し、生体においてSATB1の発現をモニタリングできるマウスを作製する。このマウスの造血幹細胞分画をSATB1の発現量に基づいて細分化し、分化・増殖能力の違いを培養や移植実験で評価するとともに、遺伝子発現の変化を若年マウスと老年マウスで比較検討する。

(2) ビオチン化SATB1を発現するトランスジェニックマウスの作製と解析

SATB1蛋白のN末端にビオチン化領域とFlagタグ領域を付加したターゲティングベクターを作製し、ノックインマウスを作製する。このマウスの骨髄から造血幹細胞やリンパ球前駆細胞を分離し、アビジンとビオチンの特異的結合を応用した免疫沈降とchip-sequence assayを行い、細胞内でSATB1が直接制御している遺伝子群を同定する。この実験系では、アビジンとビオチンの強い結合に加え、抗Flag抗体を用いた沈降を追加できるので、非特異的な沈降をできる限り排除した精度の高いchip-sequenceが可能となる。さらにアビジンとビオチンの結合と抗Flag抗体による沈降を応用して、造血幹細胞やリンパ球前駆細胞の核内でSATB1と相補的に機能している蛋白も解析可能である。SATB1の標的遺伝子および共役蛋白が、造血幹細胞からリンパ球系への初期分化に伴ってどのように変化していくかを解析し、さらに若年マウスと老年マウスから得られるデータの比較を行って、SATB1の加齢に伴う機能変化を明らかにする。

(3) 老化に伴う造血幹細胞の質的変化を予防あるいは回復させる方法の開発

作製したSATB1レポーターマウスを長期間飼育・観察し、老化に伴う造血の変化を解析する。さらに老化によってSATB1の発現が低下した造血幹細胞に、外来刺激によってSATB1の発現を回復させ、リンパ球産生能力を回復させる方法を探索する。それらの分子を投与することにより、高齢マウスの造血幹細胞のSATB1発現量と分化・増殖能力が回復するかどうかを検討する。

4. 研究成果

(1) 造血幹細胞の初期分化に伴うSATB1発現量の変化の可視化

SATB1の片アレルに蛍光色素 *td-tomato* の遺伝子を導入した。骨髄細胞を採取して解析を行なった結果、造血幹細胞からリンパ球系への初期分化過程におけるSATB1の発現変化を正確にモニターできることが確認できた(図1)。

(2) 造血幹細胞分画のSATB1発現の評価

マウス骨髄において造血幹細胞が高純度で濃縮されているLineage marker陰性、ckit強陽性、Sca1強陽性、CD150陽性、CD48陰性、Flt3陰性について、作製したSATB1-tdTomatoレポーターマウスを用いて、SATB1の発現量を解析した。その結果、造血幹細胞集団はSATB1の発現に関し

て多様な細胞から構成されることが明らかとなった(図2)。

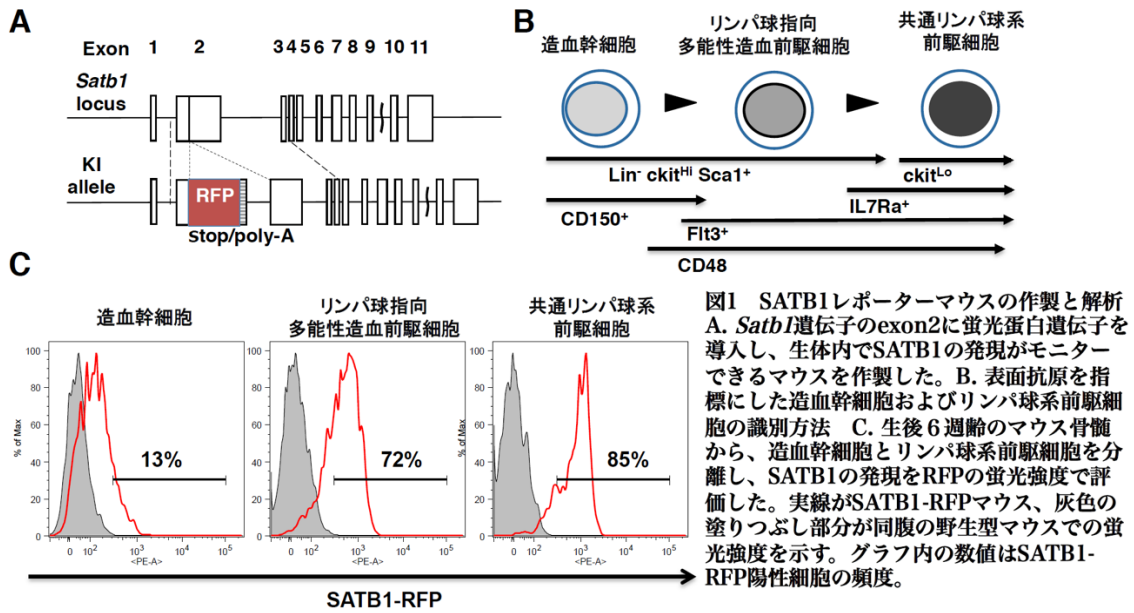


図1 SATB1レポーターマウスの作製と解析
 A. *Satb1*遺伝子のexon2に蛍光蛋白遺伝子を導入し、生体内でSATB1の発現がモニターできるマウスを作製した。B. 表面抗原を指標にした造血幹細胞およびリンパ球系前駆細胞の識別方法 C. 生後6週齢のマウス骨髄から、造血幹細胞とリンパ球系前駆細胞を分離し、SATB1の発現をRFPの蛍光強度で評価した。実線がSATB1-RFPマウス、灰色の塗りつぶし部分が同腹の野生型マウスでの蛍光強度を示す。グラフ内の数値はSATB1-RFP陽性細胞の頻度。

(3) SATB1 発現量と造血幹細胞の機能の関係性の評価

高純度の造血幹細胞分画を SATB1 の発現量に基づいて細分化し、単細胞レベルでの移植実験を行った。4ヶ月後に骨髄中で生着・増殖した造血幹細胞を解析した結果、SATB1 を高発現する造血幹細胞の方が、リンパ球系細胞の産生能力のみならず長期造血再構築能力も高いことが分かった(図2、図3)。

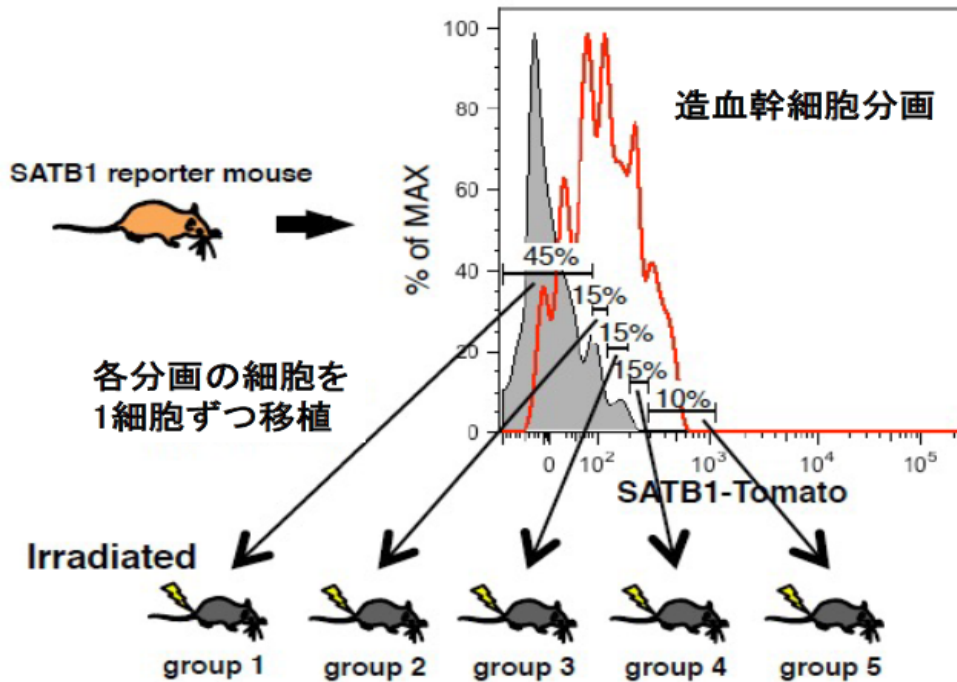


図2 SATB1-tdTomatoレポーターマウスを用いた造血幹細胞分画の解析と移植実験
 造血幹細胞分画はSATB1陰性から陽性まで、多様な細胞で構成されていた。SATB1の発現量に基づいて5つの分画に分け、単一細胞の移植実験を行なった。

さらに SATB1 の発現量の多い造血幹細胞は、発現量の低い造血幹細胞に比べ、より多様性に富んだ造血幹細胞集団を生み出すことが明らかとなった。

移植後4ヶ月の造血幹細胞分画

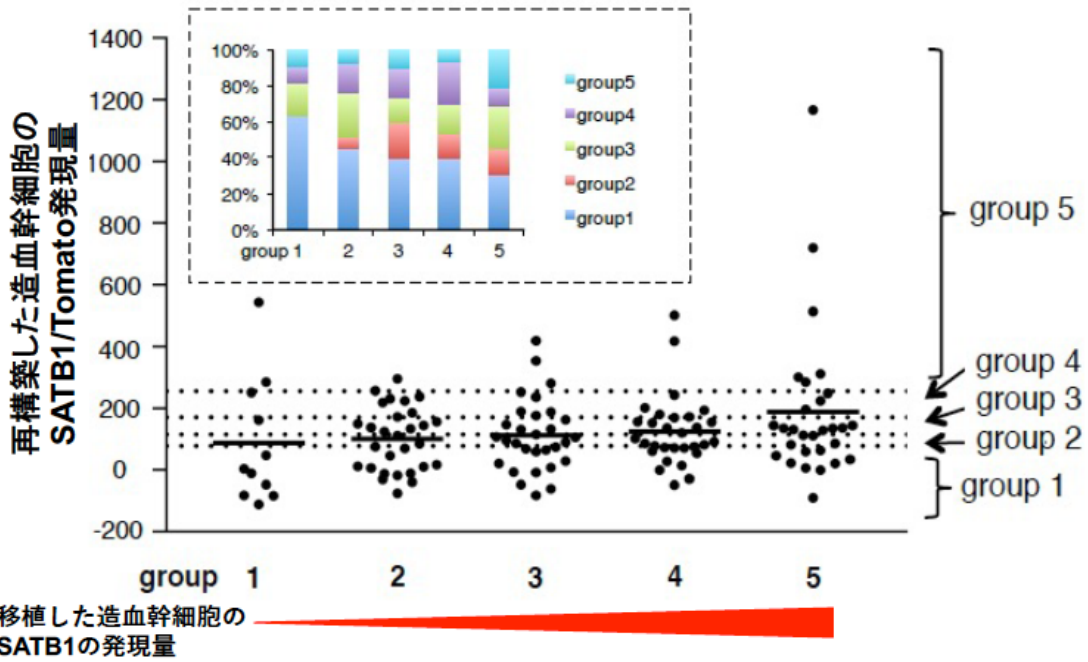


図3 SATB1の発現量で分画化した造血幹細胞の単一細胞移植実験結果
移植後4ヶ月目に骨髄内で再構築してきた造血幹細胞の個数と、それぞれの細胞の SATB1-tdTomatoの発現量を示す。

(4) SATB1 半欠損が老化に及ぼす影響

SATB1-tdTomato レポーターマウスを用いて、老化に伴う造血幹細胞の機能の変化の解析を計画した。予想していなかった結果であるが、このレポーターマウスは同腹の野生型マウスと比較して寿命が短く (図4)、生後1年半を過ぎると効率的に腫瘍を発生することが明らかとなった。

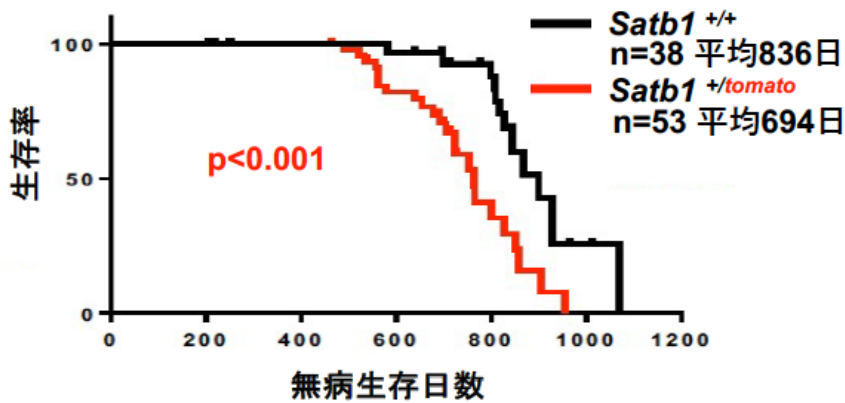


図4 SATB1-tdTomatoマウスの生存率

SATB1-tdTomatoマウスはSATB1遺伝子を半欠損している。
このマウスは生後1年半を過ぎると効率的に悪性腫瘍を形成した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yasuhiro Shingai, Takafumi Yokota, Daisuke Okuzaki, Takao Sudo, Tomohiko Ishibashi, Yukiko Doi, Tomoaki Ueda, Takayuki Ozawa, Ritsuko Nakai, Akira Tanimura, Michiko Ichii, Hirohiko Shibayama, Yuzuru Kanakura, Naoki Hosen	4. 巻 in press
2. 論文標題 Autonomous TGF signaling induces phenotypic variation in human acute myeloid leukemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cells	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/stem.3348	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sudo Takao, Motomura Yasutaka, Okuzaki Daisuke, Hasegawa Tetsuo, Yokota Takafumi, Kikuta Junichi, Ao Tomoka, Mizuno Hiroki, Matsui Takahiro, Motooka Daisuke, Yoshizawa Ryosuke, Nagasawa Takashi, Kanakura Yuzuru, Moro Kazuyo, Ishii Masaru	4. 巻 218
2. 論文標題 Group 2 innate lymphoid cells support hematopoietic recovery under stress conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 e20200817
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1084/jem.20200817	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ueda Tomoaki, Yokota Takafumi, Okuzaki Daisuke, Uno Yoshihiro, Mashimo Tomoji, Kubota Yoshiaki, Sudo Takao, Ishibashi Tomohiko, Shingai Yasuhiro, Doi Yukiko, Ozawa Takayuki, Nakai Ritsuko, Tanimura Akira, Ichii Michiko, Ezoe Sachiko, Shibayama Hirohiko, Oritani Kenji, Kanakura Yuzuru	4. 巻 13
2. 論文標題 Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule Contributes to the Development of Definitive Hematopoiesis in the Fetal Liver	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 992 ~ 1005
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2019.11.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yokota Takafumi	4. 巻 8
2. 論文標題 “Hierarchy” and “Holacracy”; A Paradigm of the Hematopoietic System	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1138 ~ 1138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells8101138	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yukiko Doi, Takafumi Yokota, Yusuke Satoh, Daisuke Okuzaki, Masahiro Tokunaga, Tomohiko Ishibashi, Takao Sudo, Tomoaki Ueda, Yasuhiro Shingai, Michiko Ichii, Akira Tanimura, Sachiko Ezoe, Hirohiko Shibayama, Terumi Kohwi-Shigematsu, Junji Takeda, Kenji Oritani, Yuzuru Kanakura	4. 巻 23
2. 論文標題 Variable SATB1 levels regulate hematopoietic stem cell heterogeneity with distinct lineage fate	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 3223-3235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.05.042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 横田貴史
2. 発表標題 リンパ球の初期分化
3. 学会等名 日本血液学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yasuhiro Shingai, Takafumi Yokota, Daisuke Okuzaki, Takao Sudo, Tomohiko Ishibashi, Yukiko Doi, Tomoaki Ueda, Takayuki Ozawa, Ritsuko Nakai, Akira Tanimura, Michiko Ichii, Hirohiko Shibayama, Yuzuru Kanakura, Naoki Hosen
2. 発表標題 Autonomous TGF signaling promotes phenotypic variations of human AML cells
3. 学会等名 日本血液学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小澤孝幸 横田貴史 新開泰宏 上田智朗 土居由貴子 柴山浩彦 保仙直毅
2. 発表標題 Special AT-Rich Sequence Binding Protein 1 Is Involved in Function of B Cell 's Antigen Presentation
3. 学会等名 日本血液学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小澤孝幸 横田貴史 新開泰宏 上田智朗 土居由貴子 柴山浩彦 金倉讓
2. 発表標題 Special AT-Rich Sequence Binding Protein 1 Is Involved In the Formation of splenic B Cells
3. 学会等名 日本血液学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土居 由貴子, 横田 貴史, 佐藤 友亮, 石橋 知彦, 数藤 孝雄, 上田 智朗, 新開 泰宏, 小澤 孝幸, 一井 倫子, 谷村 朗, 江副 幸子, 柴山 浩彦, Terumi Kohwi-Shigematsu, 織谷 健司, 金倉 讓
2. 発表標題 クロマチン構造制御蛋白SATB1はリンパ球分化における造血幹細胞の機能的ゆらぎに關与する
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小澤 孝幸, 横田 貴史, 新開 泰宏, 上田 智朗, 土居 由貴子, 柴山 浩彦, 金倉 讓
2. 発表標題 B細胞免疫寛容におけるSATB1蛋白の機能的意義について
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomoaki Ueda, Takafumi Yokota, Yoshihiro Uno, Tomoji Mashimo, Takao Sudo, Tomohiko Ishibashi, Yukiko Doi, Yasuhiro Shingai, Akira Tanimura, Michiko Ichii, Sachiko Ezo, Hirohiko Shibayama, Kenji Oritani, Yuzuru Kanakura
2. 発表標題 ESAM on the Cells of Endothelial Lineage Plays an Important Role in the Development of Definitive Hematopoiesis
3. 学会等名 The American Society of Hematology 60th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasuhiro Shingai, Takafumi Yokota, Takayuki Ozawa, Tomoaki Ueda, Yukiko Doi, Tomohiko Ishibashi, Akira Tanimura, Michiko Ichii, Hirohiko Shibayama, Yuzuru Kanakura
2. 発表標題 Monitoring ESAM Expression Levels Reveals Autonomous Fluctuation of Leukemia Stem Cells By Autocrine/Paracrine Cytokine Signaling
3. 学会等名 The American Society of Hematology 60th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>大阪大学大学院医学系研究科・医学部ホームページ http://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2018/20180613_1 大阪大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学ホームページ https://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/blon/</p>
--

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
研究分担者	金倉 謙 (Kanakura Yuzuru) (20177489)	大阪大学・医学系研究科・教授 (14401)	
研究分担者	土居 由貴子 (Doi Yukiko) (60722288)	大阪大学・医学部附属病院・医員 (14401)	
研究分担者	上田 智朗 (Ueda Tomoaki) (60747517)	大阪大学・医学部附属病院・医員 (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	新開 泰宏 (Shingai Yasuhiro) (70791614)	大阪大学・医学部附属病院・医員 (14401)	
研究分担者	小澤 孝幸 (Ozawa Takayuki) (90815474)	大阪大学・医学部附属病院・医員 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関