

令和 2 年 4 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14713

研究課題名(和文) ヒト造血幹細胞の多分化能を操るエンハンサー制御機構解明

研究課題名(英文) Enhancer regulation governing multipotency of human hematopoietic progenitor cells

研究代表者

木谷 瑤子(北川瑤子)(Kidani, Yohko)

京都大学・iPS細胞研究所・特別研究員(PD)

研究者番号：20811409

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)：本研究では、ヒト造血幹細胞の分化過程における転写エピゲノム制御解明を目的とする。臍帯血由来造血幹細胞をリファレンスとし、ESおよびiPS細胞を用いたin vitro血球分化システムを活用することで、分化初期からの継時的な変化を捉えた。血球分化過程の網羅的な転写エピゲノム制御解析により血球分化に関わる制御因子候補を挙げ、CRISPR-Cas9によるゲノム編集により機能検証を行った。その結果、転写因子Xが血球分化に必須であることが明らかになった。Xは血球分化の前提条件である血管内皮の動脈内皮化に関与することが示唆され、血球分化メカニズムの新たな理解が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト造血幹細胞は様々な免疫細胞に分化する能力を持つため、造血不全や血液腫瘍などの疾患において重要な移植ターゲットである。しかし、慢性的なドナー不足が問題であり、ヒト人工多能性幹(iPS)細胞を用いて人工的に造血幹細胞を作製する手法確立が求められている。近年遺伝子発現解析を中心に、造血幹細胞分化に関わる転写因子が同定されてきているが、未だ分化制御の全貌は明らかでない。本研究では、特にエンハンサー制御に注目することで、血球分化に必要な新規制御因子を同定した。この因子およびその下流分子を操作することで、効率よく血球分化を誘導する手法確立が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the transcriptional and epigenetic regulation governing human hematopoietic progenitor cell differentiation. With cord blood-derived hematopoietic stem cells as a reference, we utilized embryonic stem cell- or induced pluripotent stem cell-derived hematopoietic cell differentiation system in vitro in order to capture spatiotemporal regulation of cell differentiation from the beginning. By comprehensively analyzing molecular changes during hematopoietic cell differentiation, we picked up candidate regulators in silico and tested their functionality by genome editing. As a result, we found a novel regulator which was essential for hematopoietic cell differentiation. It appeared to control arterialization of endothelial cells, which recently was found to be a prerequisite for hematopoiesis. Thus, our results provide a novel insight of hematopoietic cell differentiation.

研究分野：細胞分化

キーワード：血球分化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞分化の引き金となる分子メカニズムを解明することは、生命の起源を理解する上で重要な課題である。すべての体細胞は同じ遺伝子配列を持つが、細胞特異的な転写因子の発現と、転写因子結合領域のクロマチン構造 (エピゲノム) によって様々な特徴を持つ細胞が生まれる。しかし、細胞分化時にこのような細胞特異的な分子制御がどのように誘導されるかは明らかでない。

本研究で対象とするヒト造血幹細胞は様々な血球細胞への多分化能を持ち、血球システムの恒常性を保つ。その機能から造血幹細胞の骨髄移植は様々な血球・免疫疾患の効果的な治療法である一方、ドナー不足が慢性的な問題であり、造血幹細胞分化の分子制御を理解することは、再生医療での応用を見据えた研究としても重要な課題である。しかし、ヒト造血幹細胞を数多く採取することの難しさや胎児期造血過程をヒト生体内で解析することの倫理的な問題から、詳細な分子制御については不明な点が多い。我々の研究室では、ヒト iPS 細胞より血球前駆細胞を誘導する独自の方法を開発しており、このようなシステムを活用することで新たな転写・エピゲノム制御解明を目指す。

2. 研究の目的

造血幹細胞は様々な免疫細胞への分化能を持つため、造血幹細胞移植は造血不全や血液腫瘍の治療法として有用である。しかし、慢性的なドナー不足が問題であり、HLA が一致したヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞を用いて人工的に造血幹細胞を作製する手法確立が求められている。近年遺伝子発現解析を中心に、造血幹細胞分化に関わる転写因子が同定されてきているが、未だ分化制御の全貌は明らかでない。本研究では、特にエンハンサー制御に注目し、ヒト造血幹細胞分化における分化メカニズム解明を目的とする。臍帯血由来造血幹細胞をリファレンスに用い、iPS 細胞由来血球分化システムを活用することで、分化初期から継時的かつ網羅的な転写エピゲノム変化を解析し、インフォマティクスにより推測した制御因子の機能検証を行う。新規制御因子を同定することで、血球分化に関わる新たなメカニズム解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 血球分化過程の網羅的な転写エピゲノム制御解析および臍帯血由来造血幹細胞との比較

まず、臍帯血由来造血幹細胞および ES/iPS 細胞から誘導した血球前駆細胞の RNA-seq やエンハンサー活性を示す H3K27ac ChIP-seq を行い、グローバルに比較する。両者の相違点を把握した上で、ES/iPS 細胞を用いた分化システムにおいて、血球分化過程の転写エピゲノム変化を継時的に解析する。

(2) In silico 解析による候補制御因子同定およびゲノム編集による機能解析

(1) で得たデータを解析し、血球特異的な遺伝子発現やエンハンサーランドスケープが獲得されるタイミングを明らかにする。いずれか早い方が獲得されるタイミングにおいて高発現している転写因子や、エンハンサーのモチーフ検索により、制御因子候補を同定する。これらについて、ES/iPS 細胞で CRISPR/Cas9 によるゲノム編集でノックアウト株を作製し、血球分化への影響を調べる。

(3) 制御因子を中心とした血球分化の新規メカニズム解明

血球分化に障害を及ぼす制御因子ノックアウト株を用いて、該当制御因子がどのように血球分化に貢献するかを明らかにすることで、血球分化の新規メカニズム解明に繋げる。

4. 研究成果

まず、iPS 細胞由来血球前駆細胞と臍帯血由来造血幹細胞の転写・エンハンサープロファイリングにより、両者には顕著な違いがあるものの、iPS 細胞から血球前駆細胞までの分化トラジェクトリーを辿ると、その延長線上に臍帯血由来造血幹細胞が存在することが明らかになった。さらに、公開されているヒト胎児における血球発生時の遺伝子発現データと比較したところ、iPS 細胞由来血球前駆細胞は造血が起こる AGM 領域内の血球前駆細胞に類似しており、臍帯血由来造血幹細胞に見られる遺伝子発現パターンは、AGM から胎児肝臓へ移動した細胞で獲得されていた。したがって、iPS 細胞を用いた造血システムでは、胎児肝臓で起こる教育に相当するプロセスが含まれていないが、造血過程については生体内を十分再現できていると考えられた。

次に、造血幹細胞の分化能を操る転写・エピゲノム制御を解明するため、血球前駆細胞分化に至るまでの分子制御に注目した。上記の結果に加え、iPS 細胞由来血球前駆細胞でも造血幹細胞の多分化能を示すエンハンサー活性が認められたため、iPS 細胞由来システムを用いて血球前駆細胞分化に必要な転写エピゲノム制御を検討した。iPS 細胞から継時的にエンハンサー活性を追跡したところ、血球分化前の hemogenic endothelium (血球分化能を持つ血管内皮細胞) ですでに血球細胞特異的エンハンサーの一部が活性化されていることが明らかになった。

これらのエンハンサーの制御因子を同定するため、Crispr/Cas9 システムによる因子欠損株を複製し、血球分化能やエンハンサー制御への影響を検証した。既知の血球分化関連因子に加え、hemogenic endothelium ステージで発現が上昇する因子や、エンハンサーの転写因子モチーフ検索で挙げた因子を対象とした。分化能検証には、FACS による血球前駆細胞の割合と造血コロニーアッセイによる多分化能の評価を行なった。その結果、血球細胞特異的な一部のエンハンサーを制御し、血球分化自体に必要な新規因子を同定した。

因子 X は ES/iPS 細胞や中胚葉、血管内皮細胞の分化・維持には影響を与えず、血管内皮細胞から血球細胞が分化する EHT (endothelial-to-hematopoietic transition) に必要であることが明らかになった。これまでの我々の解析から EHT では分化 10 日目の血球分化能を持つ血管内皮細胞 (hemogenic endothelium) で血球特異的トランスクリプトームの獲得が確認できているが (図 1)、X 欠損血管内皮細胞では血球特異的トランスクリプトーム誘導に顕著な障害が認められた (図 2)。特に、血球分化のマスター転写因子である RUNX1 の発現が低く、因子 X は RUNX1 発現誘導の前提条件であると示唆された。

次に、さらに分化を遡り因子 X の機能を調べた。野生型では分化 7 日目の hemogenic endothelium から一部の血球特異的エンハンサーの活性化が認められたが、X 欠損細胞では活性が低かった。また、このステージでは血管内皮細胞の動脈内皮化が起こるが、複数の動脈内皮関連遺伝子の発現が X 欠損により減少した。

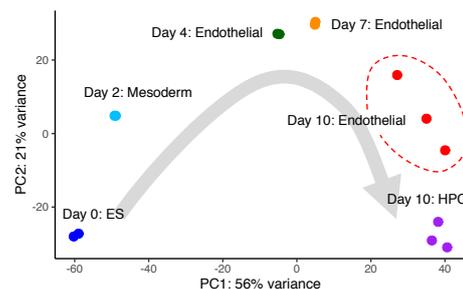


図1: ES細胞由来血球分化過程のトランスクリプトーム解析

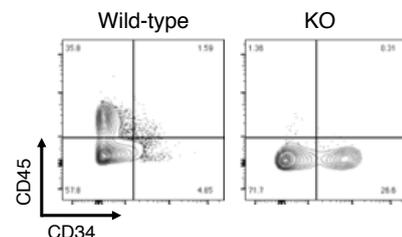


図2: 因子Xのノックアウトでは血球 (CD45+) の分化が完全に阻害される

動脈内皮化が血球分化の前提条件であることは今年度報告された知見であり、因子 X 同定は血球分化誘導メカニズム解明において重要な鍵となると期待される。

上記の結果により、本研究では血球分化に必須な新規因子を同定し、この因子依存的な血管内皮動脈化および血球特異的エンハンサー活性化が血球特異的転写制御を誘導することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 北川瑶子
2. 発表標題 Epigenetic regulation driving hematopoiesis
3. 学会等名 CiRA 2019 International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北川瑶子
2. 発表標題 血球分化を誘導するエピゲノム制御解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019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