

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08728

研究課題名(和文) ストレス造血におけるエピジェネティック制御機構の解明

研究課題名(英文) Epigenetic Regulation Mechanisms in Stress Hematopoiesis

研究代表者

中島 やえ子 (Nakajima-Takagi, Yaeko)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：50749497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ポリコム群抑制複合体(PCR)1は、H2AK119のモノユビキチン化を介して幹細胞分化を制御する。本研究では、Non-canonical PCRであるPCR1.1が、造血幹・前駆細胞でのC/EBPa依存的な骨髓球分化と、GMPにおけるHOXA9-カテニンによるself-renewingネットワークを抑制することにより定常時における造血細胞分化バランスを保つ一方で、緊急時にはその機能が一過性に阻害されることでGMPクラスター形成が亢進し緊急時骨髓造血が促進されることを明らかにした。つまりPCR1.1は緊急時造血の重要な制御因子であり、その制御不全が骨髓球の形質転換につながることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりPCR1.1は、定常時と緊急時の造血を調整し、骨髓細胞の悪性を防ぐという重要な役割を担っていることが明らかとなった。このPCR1.1の新規機能の発見は、骨髓球系疾患の治療戦略として、PCR1.1を標的とすること、つまりPCR1.1の一時的な機能阻害を行うことで、緊急時造血を一過性に誘導し、骨髓球系細胞の供給力を高めるとともに、骨髓細胞の悪性化リスクを回避することができる新規のアプローチとしての応用の可能性を示すものである。

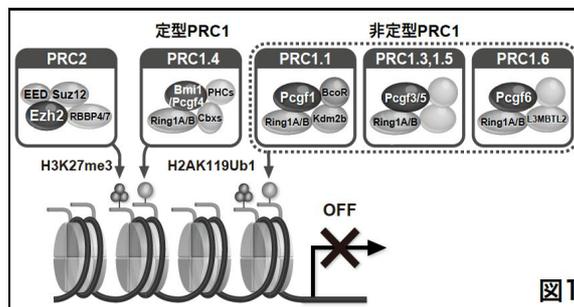
研究成果の概要(英文)：Polycomb group repressive complex (PCR) 1 regulates stem cell differentiation by mono-ubiquitination of H2AK119. In this study, we show that PCR1.1, a non-canonical PCR, maintains the balance of hematopoietic cell differentiation at steady state by suppressing C/EBPa-dependent myeloid differentiation in HSPCs and the HOXA9- β -catenin self-renewing network in GMPs. On the other hand, transient inhibition of the HOXA9- β -catenin self-renewal network in the GMPs enhances GMP cluster formation and promotes emergency myelopoiesis. Our results define PCR1.1 as a novel critical regulator of emergency myelopoiesis, dysregulation of which leads to myeloid transformation.

研究分野：幹細胞分化

キーワード：PCR1 PCGF1 Emergency myelopoiesis GMP

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞 (HSC: Hematopoietic stem cell) は自己複製能と多分化能を有し全ての血液細胞を供給し続ける。その機能維持にはエピジェネティックな制御機構、なかでもポリコーム群 (PcG: Polycomb-Group) 因子によるヒストン修飾制御が重要である。PcG 因子は核内で複合体を形成し、その複合体は PCGF ファミリー (PCGF1-6) を含む PRC (Polycomb repressive complex) 1 (定型・非定型 PRC1, H2AK119ub1 修飾を担う) と EZH1/2 を含む PRC2 (H3K27me3 修飾を担う) の 2 つに大別され、遺伝子発現を抑制的に制御する (図 1)。PRC1 はどの PCGF ファミリー分子を含むかによってその構成が異なり (Gao *et al.*, *Mol Cell*, 2012) その役割も異なると予想される。BMI1/PCGF4 を含む定型 PRC1 (PRC1.4) に関しては *Ink4a/Arf* を抑制することで HSC の自己複製能の維持に関わること (Iwama *et al.*, *Immunity*, 2004) また B 細胞分化の制御遺伝子である *Pax5* や *Ebf1* を抑制することで多分化能を維持すること (Oguro *et al.*, *Cell Stem Cell*, 2010) を所属研究室で報告してきた。申請者らは造血細胞特異的 *Pcgfl* 欠損マウス (*Pcgfl* cKO) を用いた解析から、非定型 PRC1 の一つである PRC1.1 は HSC の自己複製能の維持には必須でないものの、骨髄球分化を抑制的に制御し、HSC の多様な分化を担保することを明らかにしつつある。つまり PRC1.4 (定型 PRC1) と PRC1.1 (非定型 PRC1) は異なる分化制御を行いながら協調的に HSC の分化多様性の維持に寄与するものと考えられる。



一方で、造血細胞は様々なストレス刺激に応答してその分化様式を変化させ、各種の侵襲に対応する(ストレス造血)。例えば、細菌による感染、炎症にさらされると、造血は細菌の貪食・除去をおこなう好中球やマクロファージなどの骨髄球の産生を活性化させる (緊急時骨髄球増多反応, Emergency myelopoiesis)。このような一時的な分化バランスの変化は多能性前駆細胞 (MPP: Multipotent progenitor) の質的变化によるものと報告されている (Pietras EM *et al.*, *Cell Stem Cell*, 2015)。すなわち定常状態においては赤血球/巨核球系 (MPP2)、骨髄球系 (MPP3)、リンパ球系 (MPP4) の各 MPP 分画から多様な分化細胞が供給されるが、骨髄球増多反応時には MPP 分画の遺伝子発現のリプログラムが起こり、MPP 全体がより骨髄球分化へと偏る。しかしながらこの MPP の分化指向性の変化の機序は未だ明らかにされていない。*Pcgfl* cKO では骨髄球分化の抑制が解除され、造血分化は骨髄球に偏る。HSC、MPP1-4 の遺伝子発現の主成分解析では、MPP 分画において遺伝子発現プロファイルが骨髄球前駆細胞 (PreGM: Pre-granulocyte/macrophage progenitor, GMP: Granulocyte/macrophage progenitor) 様にリプログラムされていた。この状況は骨髄球増多反応時の変化と類似し、PRC1.1 が定常状態から炎症ストレスによる骨髄球増多反応への切り替えを制御するエピジェネティック因子である可能性を強く示唆する。

2. 研究の目的

申請者らは、これまで機能が不明であった非定型 PRC1 の一つである PRC1.1 の構成因子である PCGF1, BCOR, KDM2B の解析を行ってきた。この過程で、PRC1.1 が骨髄球分化を抑制的に制御し、その欠損により造血幹・前駆細胞の分化が骨髄球分化に著しく偏ることを見出した。一方で、*Pcgfl* 欠損マウスの解析から、感染や炎症ストレスによって誘導される緊急時骨髄球増多反応や細胞死制御においても PRC1.1 が重要な機能を有する知見を得た。そこで本研究においては、定常造血から骨髄球増多反応への造血細胞分化の切り替えと、感染や炎症時における造血細胞死誘導に PCGF1 がどのような生理的役割を果たすのかを明らかにし、ストレス造血を制御するエピジェネティック機構を理解する。

3. 研究の方法

A) 5-FU 投与による緊急時骨髄球増多反応誘導時における PRC1.1 の役割

緊急時骨髄球増多反応時における PRC1.1 の役割を明らかにするために、造血細胞特異的 *Pcgfl* 遺伝子欠損マウス (*Pcgfl* cKO) を用いた緊急時骨髄球増多反応誘導実験を行った。緊急時骨髄球増多反応は 5-FU を腹腔内に投与することにより誘導し、骨髄細胞や末梢血細胞の FCM 解析を行うことにより骨髄球分化の様子をモニターした。

また、PRC1.1 が担うヒストン修飾である H2AK119ub1 の変化を骨髄の GMP 分画で ChIP 解析により明らかにした。

B) GMP 分画の自己複製ネットワーク (self-renewal network) における PRC1.1 の機能

緊急時骨髄球増多反応においては GMP 分画における HOXA9 および β カテニンによる自己複

製ネットワークが寄与することが報告されている (Herault *et al.*, Nature, 2017)。すなわち、緊急時骨髄球増多反応では GMP の自己複製ネットワークが活性化することで GMP クラスターが形成され、骨髄球の産生に貢献する。そこで、GMP 分画における PRC1.1 の機能を明らかにするために *Pcgfl* cKO の HSC や GMP 分画を単離し、培養実験を行った。また、GMP 分画のβカテニンシグナルの活性化の有無を検討した。

C) 骨髄球系腫瘍における PRC1.1 の役割

骨髄球系腫瘍においては GMP 分画の自己複製ネットワークが持続的に活性化し、GMP クラスターが形成されていることが報告されている (Herault *et al.*, Nature, 2017)。そこで骨髄球系腫瘍における PRC1.1 の寄与を明らかにするために *Pcgfl* cKO の長期観察をおこなった。

4. 研究成果

A) 5-FU 投与による緊急時骨髄球増多反応誘導時における PRC1.1 の役割

Control マウスと *Pcgfl* cKO を用いて 5-FU の腹腔内投与を行い、投与後の末梢血、骨髄細胞を用いた FCM 解析を行った。*Pcgfl* cKO においては、定常状態で全骨髄細胞数は変化しないものの GMP と Mac1 陽性ミエロイド細胞数が増加していることがわかった(0日目、図2)。5-FU 投与を行うと Control では一過性に GMP が増加し(14日目)骨髄の再構築に貢献する。GMP の増加は一時的であり、やがて定常の細胞数に戻る(21日目以降)。一方で *Pcgfl* cKO では少なくとも28日目まで GMP は増加し続け、定常状態に戻ることはなかった。しかしながら末梢血で分化した骨髄球が増加することはなく、GMP の自己複製ネットワークが持続的に活性化している可能性が考えられた。

GMP の自己複製ネットワークにおいては *HOXA9* が活性化されている。また *Hoxa9* は PRC1.1 の代表的な標的遺伝子である。そこで、5-FU 投与時の *Hoxa9* 遺伝子座の H2AK119ub1 修飾を ChIP-qPCR 解析により調べた。その結果、5-FU 投与により一過性に H2AK119ub1 修飾が減弱していることが明らかになった。

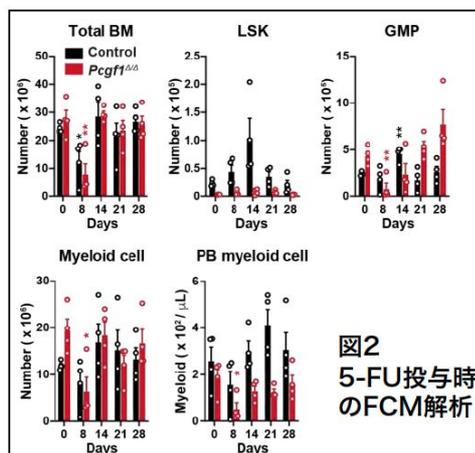


図2 5-FU投与時のFCM解析

B) GMP 分画の自己複製ネットワーク (self-renewal network) における PRC1.1 の機能

次に、Control マウスもしくは *Pcgfl* cKO から GMP を単離し培養実験を行った。その結果、Control GMP に比較して *Pcgfl* KO GMP は持続的に増殖した。続いて HSC を単離し、骨髄球分化条件で分化培養実験を行った。*Pcgfl* KO HSC は GMP 同様、より強い増殖活性を示した。Control HSC は一過性に GMP に分化し、その後 GMP は消失、分化したミエロイド細胞が出現し、やがて増殖能の低下が見られた。興味深いことに、*Pcgfl* KO HSC では GMP が長期に維持されながら分化したミエロイド細胞を産生し、増殖能を維持した(図3)。さらに、これらの培養によって産生された *Pcgfl* KO GMP ではβカテニンシグナルが活性化していた。

また、野生型 LSK に *Hoxa9* を過剰発現し、同様の培養を行ったところ、過剰発現細胞は長期に GMP を維持しながら高い増殖能を示した。さらに、培養によって出現した GMP においては *Pcgfl* KO 同様、βカテニンシグナルの活性化が確認された。

以上のことから、PRC1.1 は H2AK119ub1 修飾を介した *Hoxa9* を抑制的に制御することで、GMP における自己複製ネットワークを抑制していることが明らかになった。緊急時骨髄球増多反応時には H2AK119ub1 修飾の低下による *Hoxa9* の活性化、それに続くβカテニンシグナルの活性化が起こることで GMP の自己複製ネットワークが働き、骨髄球の産生につながることを考えられた(図4)。

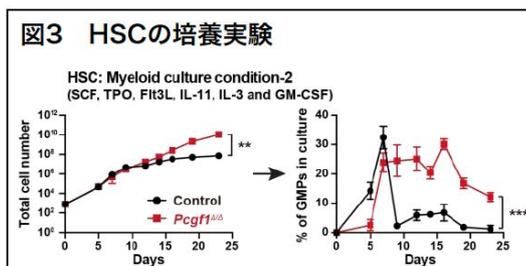
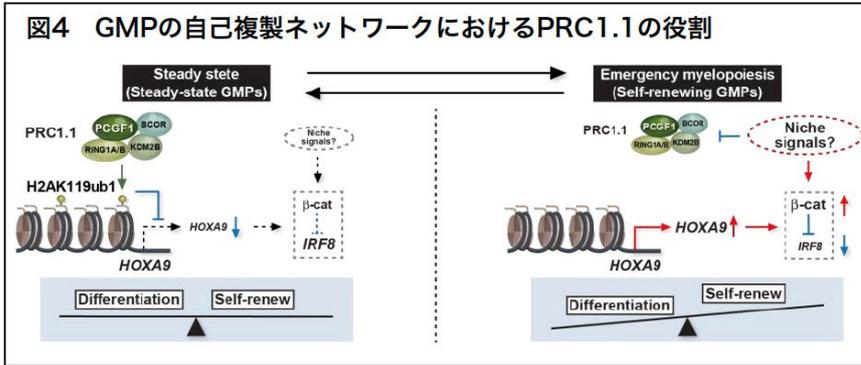


図3 HSCの培養実験



C) 骨髄球系腫瘍における PRC1.1 の役割

Pcgl1 cKO を長期観察すると約 25% が骨髄増殖性疾患の病態を示した。つまり、恒常的な GMP 自己複製ネットワークの活性化は骨髄細胞の腫瘍化をもたらすことが明らかになった。

本研究では緊急時骨髄球増多反応における PRC1.1 の役割を明らかにし、その機能破綻は骨髄球系腫瘍の発症につながることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yaeko Nakajima-Takagi, Motohiko Oshima, Junichiro Takano, Shuhei Koide, Naoki Itokawa, Shun Uemura, Masayuki Yamashita, Shohei Andoh, Kazumasa Aoyama, Yusuke Isshiki, Daisuke Shinoda, Atsunori Saraya, Fumio Arai, Kiyoshi Yamaguchi, Yoichi Furukawa, Haruhiko Koseki, Tomokatsu Ikawa, and Atsushi Iwama	4. 巻 -
2. 論文標題 Polycomb repressive complex 1.1 coordinates homeostatic and emergency myelopoiesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yaeko Nakajima-Takagi, Shun Uemura1, Motohiko Oshima, Shuhei Koide, Shohei Andoh, Masayuki Yamashita, Atsushi Iwama.
2. 発表標題 Polycomb repressive complex (PRC) 1.1 regulates emergency myelopoiesis and inflammatory cell death
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------