

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301
研究種目：挑戦的研究（開拓）
研究期間：2018～2020
課題番号：18H05374・20K20382
研究課題名（和文）エピジェネティック機構による赤血球分化制御機構の解明と造血促進戦略への展開

研究課題名（英文）Elucidation of epigenetic regulation of erythropoiesis and translation to therapeutic strategy

研究代表者
五十嵐 和彦（IGARASHI, Kazuhiko）

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00250738
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、赤血球分化におけるS-adenosylmethionine (SAM)合成酵素MAT2の役割、そしてSAMの赤血球前駆細胞エピジェネティクス制御における役割の解明を目指した。赤血球分化進行とともに、MAT2A (MAT2触媒サブユニット) の発現が低下し、SAM濃度も低下することを見いだした。そして、このSAM低下がエピゲノム全体の変化を引き起こすことを証明した。Hela細胞などではSAM濃度低下はフィードバック制御によりMAT2A発現を上昇させるのに対して、赤血球ではこのフィードバック制御を動かさないことでSAM低下を分化シグナルとしていることが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
赤血球は酸素運搬を担う細胞であり、体を構成する約30兆個の細胞の実に8割を占める。その寿命は約4ヶ月であり、日々大量の赤血球が骨髄で作られ、この赤血球造血過程は鉄不足、遺伝的異常、感染症、加齢などによりしばしば障害され、貧血を引き起こす。貧血は世界で罹患者数が最も多い疾患の一つであるが、その根本的治療法の選択肢は十分とは言えない。本研究によりMAT2が貧血治療薬の標的となることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We aimed to understand the roles of MAT2, which synthesizes S-adenosylmethionine (SAM), in red blood cell (RBC) development including the effect of SAM in their epigenome. We found that the expression of MAT2A, the catalytic subunit of MAT2, is gradually decreased along RBC differentiation with concomitant decrease in SAM. The reduction of SAM led to global alterations in the epigenome of precursor cells (erythroid cells) including DNA methylation and histone methylation. As MAT2A expression is maintained by a feedback regulation involving SAM in other types of cells like Hela cells, our results suggest that erythroid cells lack the feedback regulation, enabling them to use the reduction of SAM as a signal to drive RBC differentiation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：造血幹細胞 老化 転写因子 遺伝子発現 骨髄異形成症候群

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまでに、細胞内活動での主なメチル基供与体であるSAMの合成量が、その合成酵素Mat2a mRNAのメチル化と分解というフィードバック制御を受けること(論文リバイス中)、またMat2a及びMat2bが転写因子のコファクターとして核に分布し、遺伝子発現抑制に関わること(Mol Cell 2011, J Biol Chem 2013)を報告してきた。しかし、SAMやMat2a及びMat2bの生体内での役割については未だ不明な点が多い。また、申請者らはこれまでに赤血球造血をはじめとした各種血液細胞の分化成熟での転写因子やエピジェネティック修飾に関する遺伝子発現制御ネットワークの研究を行い、DNAやヒストンのメチル化修飾変動が造血系の恒常性維持に重要である事を見出してきたが(Nature Rev Immunol 2017)、メチル化修飾変動に直接関与するSAMやMat2a及びMat2bの造血系での働きに関しては未解明の課題である。そこでこれら因子の重要性を明らかにする為マウスにMAT2阻害剤投与を行った所、大変驚くべきことに、SAM合成阻害が赤血球造血を著明に促進するという新規知見を得た。これは赤血球造血におけるSAMやMat2a及びMat2bの重要性を強く示唆していた。

2. 研究の目的

SAM(S-アデノシルメチオニン)は、核酸やタンパク質等のメチル化反応においてメチル基供与体として機能する。しかし、増殖・分化時のSAM量の変動には不明な点が多い。申請者は最近、マウスでSAM合成を阻害すると赤血球造血が著明に亢進することを見いだした。しかもこの応答は、赤血球造血を促進する作用をもつエリスロポエチンには依存しない。そこで、SAM合成阻害剤(SI:SAM synthesis inhibitor)がエリスロポエチン非依存性の赤血球造血を促進する機構の解明を、本研究の主目的とする。SI投与で赤血球造血が骨髄赤芽球から促進される過程で起こる事象を各種網羅解析により明らかにし、赤血球造血を促進する因子を明らかにする。また赤血球造血でのSAM及びSAM合成酵素methionine adenosyltransferase 2(Mat2a及びMat2bから成る)の機能の解明を副目的とする。本解析から赤血球造血をエリスロポエチン非依存性に促進する因子が明らかになれば、難治性貧血の新規治療標的となり得るため、本研究には莫大な社会的意義がある。

3. 研究の方法

(1) 赤芽球に対する網羅的エピジェネティック修飾変動解析; SI投与が骨髄赤芽球の細胞内SAM濃度を低下させるかを調べる。SAMはDNAやヒストンのメチル化に必要なメチル基の主な供与体であり、SAM濃度の低下するとすれば、エピジェネティック修飾変動(メチル化の低下)をもたらす、広範なトランスクリプトーム変動を惹起する可能性が高い。そこで、SI投与の有無による赤芽球エピジェネティック修飾変動をDNAのメチル化変動解析及びヒストンのメチル化変動解析により明らかにする。

DNAのメチル化変動解析; 赤芽球はその成熟に伴い、核のクロマチンが凝集して最終的に脱核するにも拘らず、DNAのメチル化は全体的に低下する事が近年報告された(Jeffrey et al., Science 2011)。赤芽球のDNAメチル化修飾に関する網羅的解析(WGBS; whole genome bisulfite sequencing)を行う。今後本データ解析をさらに進め、前述のトランスクリプトーム解析とも統合解析し、トランスクリプトーム発現変動に関与するDNAのメチル化変動領域をゲノム上で同定する。

ヒストンのメチル化変動解析; 広範なヒストンのメチル化修飾変動が赤芽球の成熟に重要であるとする既報 (Wong et al., Blood 2011) からは、SAM 合成阻害によるヒストンのメチル化修飾変動がトランスクリプトーム発現変動に関与する可能性もある。そこで、赤芽球のヒストンのメチル化状態を解析する。その後、遺伝子発現変動の大きいものから順に、具体的なゲノム上のヒストン修飾変動を確認する為、ChIP-seq (chromatin immunoprecipitation sequencing) を実施し、前述のトランスクリプトーム解析とも統合解析して赤血球造血促進に重要なヒストン修飾変動を同定する。

(2) 赤芽球に対する RNA メチローム解析; 近年、RNA の安定性には RNA 自体のメチル化修飾変動が重要な役割を有している事が明らかとなっており、SI 投与による広範なトランスクリプトーム変動には、RNA のメチル化修飾変動が関与している可能性が考えられる。そこで代表的な RNA のメチル化修飾であり、造血系細胞でも重要な役割を果たす事が近年報告された (Li et al., Nature 2017) メチル化アデニン (m6A) が変動した RNA を、抗 m6A 抗体による ChIP-seq 解析で明らかにする。前述のトランスクリプトーム解析と統合解析することで、RNA のメチル化変動によって RNA 量が変動する遺伝子を同定可能である。これまでに RNA のメチル化変動が赤血球造血を促進するという報告は、申請者の知る限りなく、新規性の高い知見となることが期待される。

(3) 赤芽球造血促進をもたらすタンパク質の同定; 最終的な細胞の表現型変化には何らかのタンパク質の発現変動が関与する可能性が高い。即ち、SI 投与により細胞内因子や細胞外シグナル伝達因子の発現が変動した結果、赤血球造血が促進された可能性がある。そこで、タンパク質レベルでの発現変動を明らかにするために以下の質量分析を行う。

細胞内因子の探索; 赤芽球で、トランスクリプトーム変動に基づいたタンパク質発現変動が赤血球造血促進に直接関与する可能性が高い。そこで、本分画に対する質量分析を行い、発現変動のあるタンパク質を同定する。

細胞外因子の探索; SI 投与による赤血球造血促進は細胞外シグナル伝達因子の発現変動による可能性も排除できない。そこで、骨髓抽出液の質量分析により、その様な因子候補を同定する。例えば、SI 投与により骨髓抽出液中で増加している因子が同定され、その因子による刺激の下流で変動する遺伝子発現が実際に前出のトランスクリプトーム解析により変動していた場合、その様な因子は赤血球造血促進に寄与する細胞外因子の候補となる。

(4) 赤血球造血促進に寄与する因子の決定; (1)-(3) の結果とトランスクリプトーム解析結果を統合解析し、SAM によって制御され、赤血球造血の促進に寄与する細胞内及び細胞外因子候補が抽出される。これらの候補因子が実際に赤血球造血を促進するか下記の方法で評価する。

細胞内因子の決定; 候補因子の阻害剤又は促進剤が既に存在する場合はマウスへの投与実験で赤血球造血促進能を評価する。その様な化合物が同定された場合にはそれ自体が新規の赤血球造血剤となる可能性が高い。条件を満たす化合物が存在しない場合には、個々の因子に対する *in vitro* 及び *in vivo* で発現促進又は抑制を行いその機能の評価する。*in vivo* 解析では遺伝子発現誘導が可能なシステムを用いて、野生型マウスより分取した造血幹細胞分画に目的遺伝子の発現又は抑制ベクターを導入した上で、移植実験系にて評価する。

細胞外因子の決定; 候補因子の阻害剤又は促進剤が既に存在する場合には上記と同様に、マウスに投与して評価する。条件を満たす化合物が存在しない場合には、リコンビナントタンパク質を作成し、マウスに投与して評価する。赤血球造血を促進する細胞外因子が同定された場合にはそれ自体が新たな治療薬となる可能性が高い。

(5) 赤血球造血過程での SAM, Mat2a 及び Mat2b の機能解析; 各造血細胞及び赤血球成熟段階に

おける SAM の重要性が申請者ら独自の知見より強く示唆されているものの、実際の役割についてはほとんど未解明であった。そこで副目的の達成の為に、各造血細胞及び赤血球成熟段階での SAM 量分布、及び MAT2a と MAT2b の発現量を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 赤芽球に対する網羅的エピジェネティック修飾変動解析

SAM 合成酵素阻害剤投与マウスおよび対照マウスより赤芽球をソートし、そのエピゲノム変動について、DNA のメチル化変動を WGBS (whole genome bisulfite sequence) で、ヒストンのメチル化変動をヒストン修飾抗体の ChIP-seq (chromatin immunoprecipitation sequence) で解析した。ゲノム全体としての DNA メチル化が低下する傾向を見いだした。またヒストンメチル化の中でも特定のメチル化が SAM 合成酵素阻害により選択的に低下することを見いだした。これらヒストンおよび DNA のメチル化が低下するゲノム領域を特定し、近傍遺伝子群の発現変化と関連することを見いだした。また近傍遺伝子機能のオントロジー解析により推定し、これらの変化が赤血球分化促進と矛盾しないことを確認した。興味深い変化については、個別遺伝子・ゲノム領域について検証実験を行った。得られた結果から、赤血球分化における重要なエピジェネティック修飾変化を同定できつつある。特にグロビンなど赤血球最終分化に重要な遺伝子について、発現が選択的に上昇することを見いだした。

(2) 赤芽球に対する RNA メチローム解析

成熟 RNA の安定性に関与するメチル化アデニン (m6A) の変動について、抗 m6A 抗体を用いた ChIP で検討したが、グロビン遺伝子 mRNA ではその発現上昇につながると思われる変化は検出できなかった。

(3) 赤芽球造血促進をもたらすタンパク質の同定

タンパク質レベルで赤血球造血をもたらす因子を同定することを目指して、骨髄および赤芽球のプロテオームを質量分析で測定し、その結果をトランスクリプトームの結果と統合解析を行い、転写後制御を受けると考えられる興味深い因子等を特定した。全体的な傾向としては、赤血球分化促進と矛盾しないタンパク質レベルでの変化を確認できた。しかし、赤血球分化を促進することが想定される細胞外因子の特定には至らなかった。細胞外変化というよりも、赤芽球内での変化が造血促進の原因となっていることが示唆された。

(4) 赤血球造血促進に寄与する因子の決定

以上の結果を踏まえて赤血球分化促進の原因となる遺伝子の特定を試みた。制御因子が変化するというモデルではなく、赤血球分化で発現が誘導される遺伝子群(グロビン遺伝子やヘム合成系酵素遺伝子など)の発現が上昇し、分化が促進するというモデルが考えられた。これは DNA メチル化やヒストンメチル化の変動とも矛盾しないモデルと考えられた。このモデルは、エリスロポエチン経路とは独立して分化を促進するものである。

(5) 赤血球造血過程での SAM, Mat2a 及び Mat2b の機能解析

Hela 細胞などいくつかの細胞では SAM 合成量の低下は、SAM 依存性 Mat2a mRNA メチル化低下を介して Mat2a mRNA 上昇、そして Mat2a タンパク質量上昇というフィードバック制御が生じ、SAM 量が一定の範囲に保たれることを見いだした。一方、赤芽球ではこの制御が作動せず、一旦 SAM が低下すると Mat2a 遺伝子のヒストンメチル化も低下してその発現が低下し、さらに SAM 合成量が低下するという負のスパイラルが存在することを見いだした。したがって、赤血球は SAM 量低下を分化進行のシグナルとして用いている可能性が示唆された。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Spencer A. Haws, Deyang Yu, Cunqi Ye, Coral K. Wille, Long C. Nguyen, Kimberly A. Krautkramer, Jay L. Tomasiwicz, Shany E. Yang, Blake R. Miller, Wallace H. Liu, Kazuhiko Igarashi, Rupa Sridharan, Benjamin P. Tu, Vincent L. Cryns, Dudley W. Lamming, John M. Denu	4. 巻 78
2. 論文標題 Methyl-Metabolite Depletion Elicits Adaptive Responses to Support Heterochromatin Stability and Epigenetic Persistence	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 210-223
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molcel.2020.03.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Alam M, Shima H, Matsumoto M, Matsuo Y, Sugiyama T, Inada T and Igarashi K
2. 発表標題 Roles of methionine adenosyltransferase-2a in mammalian translation control
3. 学会等名 14th Graduate Student Re-treat Conference
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 島弘季、穂積葵、Jelle Bonthuis、引地隼人、五十嵐和彦
2. 発表標題 MAT2A mRNA安定性に関わるタンパク質の解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 穂積葵、島弘季、斎藤維友、加藤恭丈、五十嵐和彦
2. 発表標題 MAT 複合体形成に欠損を示すMAT2A変異の酵母two-hybrid法によるスクリーニング
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 HEMOPOIESIS-ENHANCING AGENT	発明者 五十嵐和彦、加藤浩貴、石井悠翔、他	権利者 東北大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/007121	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 国際特許	発明者 五十嵐和彦、加藤浩貴、石井悠翔、グエン チ ロン、張替	権利者 東北大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/007121	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

東北大学大学院医学系研究科生物化学分野ホームページ http://www.biochem.med.tohoku.ac.jp
--

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	張替 秀郎 (HARIGAE Hideo) (50302146)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	

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		
米国	Massachusetts General Hospital		