

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02952

研究課題名(和文) ストレス造血における幹細胞エピゲノム制御と細胞運命決定機構の解析

研究課題名(英文) Epigenetic regulation and cell fate determination of hematopoietic stem cell in stress conditions

研究代表者

指田 吾郎 (Sashida, Goro)

熊本大学・国際先端医学研究機構・特別招聘教授

研究者番号：70349447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：組織幹細胞は、発生や成体組織の恒常性を維持する自己複製能と多分化能を有する細胞であり、ストレスによって生じる臓器障害を修復する不可欠な細胞である。本研究では、定常状態とストレス状態における幹細胞の自己複製と分化、幹細胞の対称と非対称性分裂、造血組織の維持と再生の分子基盤を理解するために、クロマチン制御因子であるHMGA2によるストレス造血における幹細胞制御機構を解析した。ストレス状況下の造血幹細胞で特異的に作用するTNF $\alpha$ -CK2-HMGA2経路による造血制御の分子基盤がわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血は、造血幹細胞と骨髄ニッチや骨髄細胞が、老化を含めた様々な状況に応じて相互に関連することで精密に維持されている。ただし、定常状態とストレス状態に応じて、造血幹細胞が自己複製と分化を使い分ける制御機構は、骨髄・組織レベルはもとより、幹細胞レベルですら明白ではない。本研究によって、幹細胞研究の積年の課題である「幹細胞の運命制御」の解明に貢献できた。また、将来、ストレス暴露後の造血障害を速やかに再生するための標的因子や新規治療開発への貢献も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Tissue stem cells are self-renewing and multipotent cells that maintain developmental and adult tissue homeostasis and are essential cells that repair stress-induced organ damage. To understand the molecular basis of stem cell self-renewal and differentiation, symmetric and asymmetric division of stem cells, and maintenance and regeneration of hematopoietic tissues under steady-state and stress conditions, we analyzed the stem cell regulatory mechanisms in stress hematopoiesis by HMGA2 chromatin modifier. We found the molecular basis of hematopoietic regulation by the TNF $\alpha$ -CK2-HMGA2 pathway, which specifically acts in hematopoietic stem cell under stress conditions.

研究分野：血液内科学

キーワード：HMGA2 クロマチン TNF $\alpha$  5-FU RFX5 CK2

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

組織幹細胞は、発生や成体組織の恒常性を維持する自己複製能と多分化能を有する細胞であり、ストレスによって生じる臓器障害を修復する不可欠な細胞である。造血幹細胞は、幹細胞の微小環境(ニッチ)や骨髄組織とも関連しストレスに対して行動する。ストレスとは、細胞外因性因子と内因性因子によるシグナル伝達・エピゲノム・転写制御機構を介した一細胞から組織個体レベルに至る恒常性破綻であり、老化に伴う臓器障害や疾患を発症させる。ただし、高齢者によくみられる造血機能低下や白血病化におけるストレスの役割は十分には解明されていない。とくに、造血幹細胞が定常・ストレス状態に対応して、どのように自己複製と分化の細胞運命を決定して造血を維持・回復するのかが明白でない。こうした幹細胞・造血への疑問に答えるために、申請者は、クロマチン伸展と DNA 結合能を持ち、転写因子の DNA 結合を制御できる HMGA2 (High-mobility group AT-hook 2) に着目した。本研究では、定常状態・ストレス状態における幹細胞の自己複製と分化、幹細胞の対称と非対称性分裂、造血組織の維持と再生の分子基盤を理解するために、HMGA2 のストレス造血における幹細胞制御機構を解析した。

### 2. 研究の目的

クロマチン・転写制御因子の HMGA2 は、胎児造血幹細胞では、Lin28-Let7 miRNA-Hmga2 経路により発現レベルが高く維持されている。一方、成体造血幹細胞では、Hmga2 は発現しているが、その発現レベルは Lin28 低発現とポリコーム抑制性複合体 2 によって抑制される。代表者は、ポリコーム抑制性複合体 2/Ezh2 欠損マウスを用いた骨髄増殖性腫瘍モデルの病態解析から、HMGA2 をがん原遺伝子としても同定した (Sashida G, et al. J Exp Med 2016)。そこで、Hmga2 コンディショナルノックアウトマウス(cKO)に加えて、幹細胞特異的に Hmga2 発現を誘導できるコンディショナルノックインマウス(KI)を作製した。定常状態では、Hmga2 cKO マウス、Hmga2 KI マウスは有意な造血表現型を示さないが、5-FU 抗癌剤投与後の Hmga2 KI 幹細胞は自己複製の亢進と速やかな造血回復をもたらした。こうした準備のもと、HMGA2 によるクロマチン動態制御と標的遺伝子を含めた転写因子ネットワーク制御の分子基盤を解析して、幹細胞の運命決定機構を解明する本研究を実施した。

### 3. 研究の方法

本研究では、申請者が作製した Rosa26 loxP-Stop-loxP Hmga2-IRES-EGFP KI マウスと Hmga2flox/flox KO マウスを、造血幹細胞特異的に Cre を誘導できる enhancer of Runx1 Cre-ERT2 マウスとそれぞれ交配した。始めに、胎児から成体造血へと発生段階ごとの Hmga2 による定常状態における幹細胞制御の分子基盤を解析した。さらに、ファミリー遺伝子 Hmga1/Hmga1b による幹細胞での機能的重複を検証するために、Hmga1 と Hmga1b に対して受精卵と CRISPR/Cas9 を用いた KO マウスを作製した。並行して、同様の幹細胞機能・エピゲノム解析を実施した。一方、5-FU 抗癌剤投与後早期に、成体造血幹細胞は Hmga2 と Hmga1 発現レベルを一時的に上昇させる。実際、Hmga2 KI マウスにおいて、5-FU 投与後の Hmga2 高発現幹細胞は自己複製が亢

進して幹細胞数を増やし、速やかな造血と骨髄組織の回復をもたらした。反対に、Hmga2 cKO マウスは、5-FU 投与後に、軽度だが、遷延する造血回復を認めた。こうしたストレス状況に応じた幹細胞・造血機能を理解するために、定常状態の幹細胞と比較して、ストレス前後の改変マウス幹細胞の遺伝子発現解析とエピゲノム解析を実施した。こうして同定した Hmga2 結合領域や標的遺伝子の役割を CRISPR/Cas7 法にて遺伝学的に検証した。以上、ストレス状況において、幹細胞の運命と分裂様式を決定する Hmga2 によるクロマチン動態制御と、Hmga2 標的遺伝子を含めた転写因子ネットワーク制御の分子基盤を解析した。

#### 4. 研究成果

始めに、胎児から成体造血へと発生段階依存的な Hmga2 による造血幹細胞機能とその分子基盤を解析した。代表者が作製した Rosa26 loxP-Stop-loxP Hmga2-IRES-EGFP KI マウスと造血幹細胞特異的に Cre を誘導できる enhancer of Runx1 Cre-ERT2 (熊本大学・大里元美博士分与) マウスを交配した。成体幹細胞において、胎児幹細胞と同レベルの Hmga2 高発現が得られる誘導モデルを用いて、定常状態における胎児・成体造血表現型と幹細胞機能の解析を実施した。Hmga2 KI マウスでは FACS による造血幹細胞数に有意な変化は認めず、腫瘍化もしなかった (Sun Y, et al. International Journal of Hematology 2022)。一方、幹細胞にストレスがかかる限界希釈幹細胞移植実験および競合的骨髄移植実験において、機能的な幹細胞の軽度な増加と自己複製能の有意な亢進を認めた。

次に、定常状態とは異なり、環境因子・ストレス暴露後の造血再生を担う造血幹細胞のエピゲノム・転写制御機構を理解するために、Hmga2 cKO マウスと Hmga2 KI マウスを用いて、定常状態の成体造血幹細胞と比較して、ストレス造血時の幹細胞の表現型、機能解析を実施した。実際、5-FU 投与後早期に、野生型成体幹細胞 (また、Hmga2 KI 細胞も) タンパクレベルでの Hmga2 発現を有意に上昇させたが、既報のような、RNA スプライシングの変化は伴わなかった。Let7 miRNA ではなく、翻訳後の発現と機能亢進機構が示唆された。ただし、プロテアソーム系の関与は否定的であった。タンパクレベルでの Hmga2 発現制御機構の解析が求められる。

5-FU 投与後の Hmga2 KI 高発現幹細胞は、細胞周期が回転して、未分化を維持したまま細胞分裂の亢進が長く続くことで、造血幹細胞数の著しい増加を認めた。また、血小板数を中心とした速やかな造血の回復が観察された。ストレス前後の幹細胞のオミックス解析を実施すると、Hmga2 は、そのクロマチン結合領域を大きく変えるとともに、クロマチン伸展領域と標的遺伝子の発現レベルを制御していた。さらに、5-FU 投与以外のストレス因子として、5-FU 投与後の骨髄液においても上昇する炎症性サイトカインの TNF-a にも着目した。Hmga2 cKO マウスと Hmga2 KI マウスの幹細胞に対して、TNF-a を培養系、生体系で投与すると、5-FU 投与後と同様に、ストレス耐性の表現型と遺伝子発現やクロマチン構造制御の変動が確認できた。Hmga2 のストレス下における幹細胞制御機能の普遍性が確認された。

その分子基盤として、TNF-a 投与後に、Hmga2 が CK2 によって直接リン酸化されることを見出した。Hmga2 タンパクの C 末端領域がリン酸化されることで、Hmga2 のクロマチン結合領域が変わるだけでなく、標的遺伝子のなかでも、RFX5 転写因子の標的遺伝子を含めた炎症関連遺

伝子の発現を抑制することを確認した。一方で、この C 末端領域のリン酸化は、自己複製を亢進する標的遺伝子の発現制御には必要ではなく、クロマチン領域や領域特異的な複合体の機能に依存すると考えられた。以上、炎症ストレス下で作用する TNF $\alpha$ -CK2-クロマチン制御因子 HMGA2 による造血制御の分子基盤がわかった (Kubota S, et al. EMBO J 2024)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sun Yuqi, Kubota Sho, Iimori Mihoko, Hamashima Ai, Murakami Haruka, Bai Jie, Morii Mariko, Yokomizo-Nakano Takako, Osato Motomi, Araki Kimi, Sashida Goro	4. 巻 115
2. 論文標題 The acidic domain of Hmga2 and the domain's linker region are critical for driving self-renewal of hematopoietic stem cell	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 553 ~ 562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-021-03274-9	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
1. 著者名 Sorin Supannika, Kubota Sho, Hamidi Sofiane, Yokomizo Nakano Takako, Vaeteewoottacharn Kulthida, Wongkham Sopit, Waraasawapati Sakda, Pairojkul Chawalit, Bai Jie, Morii Mariko, Sheng Guojun, Sawanyawisuth Kanlayanee, Sashida Goro	4. 巻 36
2. 論文標題 HMGN3 represses transcription of epithelial regulators to promote migration of cholangiocarcinoma in a SNAI2 dependent manner	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e22345
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202200386R	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
1. 著者名 Yokomizo-Nakano Takako, Hamashima Ai, Kubota Sho, Bai Jie, Sorin Supannika, Sun Yuqi, Kikuchi Kenta, Iimori Mihoko, Morii Mariko, Kanai Akinori, Iwama Atsushi, Huang Gang, Kurotaki Daisuke, Takizawa Hitoshi, Matsui Hirotaka, Sashida Goro	4. 巻 220
2. 論文標題 Exposure to microbial products followed by loss of Tet2 promotes myelodysplastic syndrome via remodeling HSCs	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 e20220962
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20220962	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
1. 著者名 Yokomizo-Nakano Takako, Sashida Goro	4. 巻 97
2. 論文標題 Two faces of RUNX3 in myeloid transformation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Hematology	6. 最初と最後の頁 14 ~ 20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exphem.2021.02.005	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 -

1. 著者名 Abdallah Mohamed Gaber, Niibori-Nambu Akiko, Morii Mariko, Yokomizo Takako, Yokomizo Tomomasa, at al.	4. 巻 35
2. 論文標題 RUNX1-ETO (RUNX1-RUNX1T1) induces myeloid leukemia in mice in an age-dependent manner	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 2983 ~ 2988
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-021-01268-4	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

1. 著者名 Sun Yuqi, Kubota Sho, Iimori Mihoko, Hamashima Ai, Murakami Haruka, Bai Jie, Morii Mariko, Yokomizo-Nakano Takako, Osato Motomi, Araki Kimi, Sashida Goro	4. 巻 115
2. 論文標題 The acidic domain of Hmga2 and the domain's linker region are critical for driving self-renewal of hematopoietic stem cell	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 553 ~ 562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-021-03274-9	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

1. 著者名 Morii Mariko, Kubota Sho, Iimori Mihoko, Yokomizo-Nakano Takako, Hamashima Ai, Bai Jie, Nishimura Akiho, Tasaki Masayoshi, Ando Yukio, Araki Kimi, Sashida Goro	4. 巻 38
2. 論文標題 TIF1 activates leukemic transcriptional program in HSCs and promotes BCR::ABL1-induced myeloid leukemia	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 1275 ~ 1286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-024-02276-w	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 -

1. 著者名 Kubota Sho, Sun Yuqi, Morii Mariko, Bai Jie, Ideue Takako, Hirayama Mayumi, Sorin Supannika, Eerdunduleng, Yokomizo-Nakano Takako, Osato Motomi, Hamashima Ai, Iimori Mihoko, Araki Kimi, Umemoto Terumasa, Sashida Goro	4. 巻 99
2. 論文標題 Chromatin modifier Hmga2 promotes adult hematopoietic stem cell function and blood regeneration in stress conditions	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 9999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s44318-024-00122-4	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Sho Kubota, Goro Sashida
2. 発表標題 Hmga2 activates Igf2bp2 but also represses expression of inflammatory response genes in stress hematopoiesis
3. 学会等名 51st ISEH Annual Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sho Kubota, Yuqi Sun, Jie Bai, Takako Yokomizo-Nakano, Mariko Morii, Takako Ideue, Motomi Osato, Terumasa Umemoto, Kimi Araki, Goro Sashida
2. 発表標題 HMGA2 maintains hematopoietic stem cell via pleiotropic regulation of the transcription in stress conditions
3. 学会等名 63rd ASH Annual Meeting and Exposition (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			
米国	テキサス大学サンアントニオ健康科学センター			
タイ	コンケン大学			
シンガポール	シンガポール国立大学			