

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591029

研究課題名（和文） DNAメチル化が支配する造血幹細胞の自己複製能

研究課題名（英文） DNA methylation regulates self-renewal potential in hematopoietic stem cells

研究代表者

依馬 秀夫 (EMA HIDEO)

慶應義塾大学・医学部・特任准教授

研究者番号：50344445

研究成果の概要（和文）：本研究では幹細胞発生における DNA のメチル化の役割を明らかにするため、DNA メチル化酵素である Dnmt3a または Dnmt3b 欠損マウスより胎仔肝を分離後、造血幹細胞を解析し、Dnmt3b が造血幹細胞における自己複製能獲得と維持に必須であることを見出した。Dnmt3a または Dnmt3b 欠損造血幹細胞の多分化能には問題なかった。再構築能と自己複製能については Dnmt3a 欠損造血幹細胞では異常なかったが、Dnmt3b 欠損造血幹細胞では障害されていた。造血幹細胞の自己複製には適切な遺伝子発現とゲノムの安定化が必要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：To study a role of DNA methylation in stem cell development, we examined hematopoietic stem cells (HSCs) in livers from fetal mice deficient in *de novo* DNA methyltransferase 3a (Dnmt3a) or Dnmt3b. We showed that Dnmt3b but not Dnmt3a is essential for establishment and maintenance of self-renewal potential in developing HSCs. *In vitro* colony assays and *in vivo* transplantation assays revealed that multilineage differentiation potential was maintained in Dnmt3a- or Dnmt3b-deficient HSCs. However, repopulating and self-renewal potentials were severely impaired in Dnmt3b- but not Dnmt3a-deficient HSCs. Gene expression analysis detected mis-expression of germline-specific genes in Dnmt3b-deficient HSCs. Histone γ H2AX foci analysis detected genomic DNA damage accumulated in Dnmt3b-deficient HSCs, suggesting that Dnmt3b-deficient HSCs are more susceptible to DNA damage than are wild-type HSCs. DNA damage likely led to up-regulated *p21^{Cip1}* expression and to increased apoptosis among Dnmt3b-deficient HSCs. These data suggest that appropriate regulation of gene expression and of genomic integrity is necessary for developing HSCs to have self-renewal potential.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：造血幹細胞、発生

1. 研究開始当初の背景

DNA のメチル化は代表的エピゲノム制御のひとつであり、遺伝子発現制御やゲノム安定化において重要な役割を果たす。申請者らは以前 *de novo* DNA メチル化酵素である *Dnmt3a* と *Dnmt3b* のいずれも造血幹細胞の分化には必須ではないが、どちらか一方が自己複製の維持に必須であることを報告した。しかし、これらの酵素の造血幹細胞発生における役割はわかっていなかった。

2. 研究の目的

造血幹細胞発生における DNA メチル化制御の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

Dnmt3a 欠損マウスおよび *Dnmt3b* 欠損マウスの胎仔肝臓内の造血幹細胞機能を移植実験を用いて定量的に測定した。

網羅的遺伝子発現解析によって、*Dnmt3a* 欠損造血幹細胞または *Dnmt3b* 欠損造血幹細胞において異常発現した遺伝子を検出した。

γ H2AX フォーカス形成によって造血幹細胞における DNA 損傷の有無を解析した。

4. 研究成果

(1) *Dnmt3a* 欠損の胎仔肝臓の大きさは正常であったが、*Dnmt3b* 欠損の胎仔肝臓は野生型に比較して小さく、造血幹細胞を含む CD48-Kit+Sca-1+Lin- 分画も減少していた (図 1)。

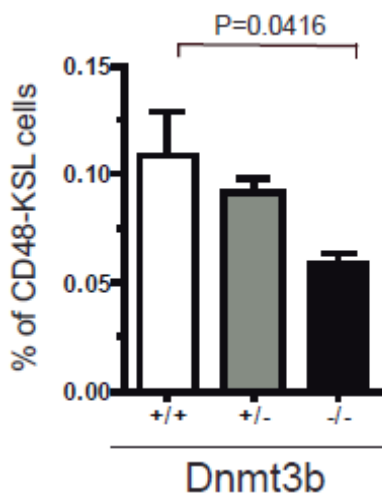


図 1 胎仔肝臓内の造血幹細胞集団

(2) 胎仔肝臓を用いたコロニーアッセイの結果、*Dnmt3a* 欠損マウスは正常であったが、

Dnmt3b 欠損マウスではコロニー形成細胞数の減少が見られた。しかし、形成されたコロニーには顆粒球、マクロファージ、赤芽球、巨核球が観察され、骨髄球系分化能に異常はないと考えた (図 2)。

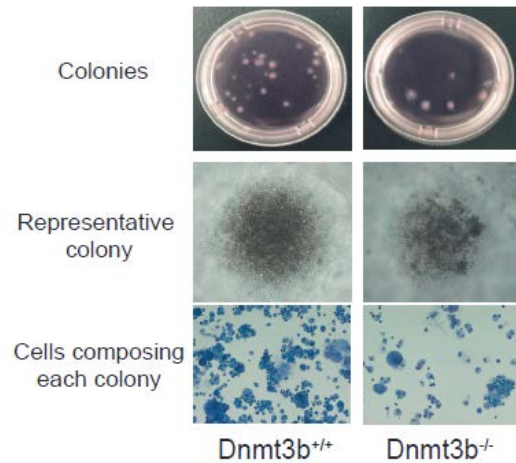


図 2 胎仔肝細胞によって形成された血液コロニー

(3) 成体マウスの骨髄細胞 (2×10^5 個) を競合細胞として、13.5 日目の胎仔肝臓 1 個分を致死量の放射線照射後のマウスに移植した。その結果、*Dnmt3a* 欠損胎仔肝臓由来の再構築は一次移植、二次移植ともに問題なく起きた (図 3 A)。このことより、*Dnmt3a* 欠損造血幹細胞の機能に異常なしと判定した。

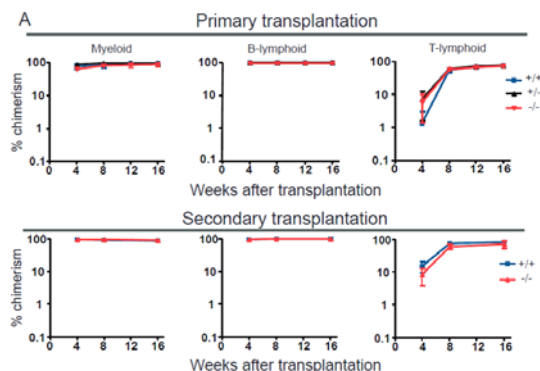


図 3 A *Dnmt3a* 造血幹細胞による長期再構築

一方、*Dnmt3b* 欠損胎仔肝臓の移植後には、一時的に顆粒球、B 細胞、T 細胞が出現したが、一次移植、二次移植を通して極めて低い

キメリズムを示した (図 3 B)。以上より、Dnmt3a 欠損造血幹細胞の分化能には問題はないが、再構築能ならびに自己複製能が障害されていると判定した。

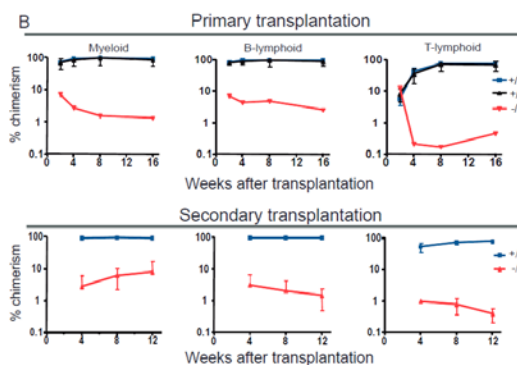


図 3 B Dnmt3B 欠損造血幹細胞による長期再構築

(4) 造血幹細胞を用いた発現解析より、Dnmt3b 欠損による p21^{Cip1} の発現増加が検出され、アポトーシス亢進との関連が示唆された。一方、Dnmt3b 欠損造血幹細胞において生殖関連遺伝子の発現上昇が観察された。

(5) Dnmt3b 欠損造血幹細胞において γ H2AX フォーカス形成の増加が観察され、DNA 損傷の蓄積が示唆された。DNA メチル化がゲノム安定化に必要なとの報告があり、ゲノム安定化と自己複製能の関連が興味深い。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Ena, H., and Suda, T. Two anatomically distinct niches regulate stem cell activity. *Blood* **120**, 2174-2181, doi:10.1182/blood-2012-04-424507 (2012). 査読有
- ② Suzuki, N., Yamazaki, S., Ena, H., Yamaguchi, T., Nakauchi, H., and Takaki, S. Homeostasis of hematopoietic stem cells regulated by the myeloproliferative disease associated-gene product Lnk/Sh2b3 via Bcl-xL. *Exp Hematol* **40**, 166-174 e163,

doi:10.1016/j.exphem.2011.11.003

(2012). 査読有

- ③ Yamazaki, S., Ena, H., Karlsson, G., Yamaguchi, T., Miyoshi, H., Shioda, S., Taketo, M. M., Karlsson, S., Iwama, A., and Nakauchi, H. Nonmyelinating schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell* **147**, 1146-1158, doi:10.1016/j.cell.2011.09.053 (2011). 査読有
 - ④ Morita, Y., Iseki, A., Okamura, S., Suzuki, S., Nakauchi, H., and Ena, H. Functional characterization of hematopoietic stem cells in the spleen. *Exp Hematol* **39**, 351-359 e353, doi:10.1016/j.exphem.2010.12.008 (2011). 査読有
 - ⑤ Morita, Y., Ena, H., and Nakauchi, H. Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment. *J Exp Med* **207**, 1173-1182 (2010). <http://jem.rupress.org/> 査読有
 - ⑥ Mashima, R., Honda, K., Yang, Y., Morita, Y., Inoue, A., Arimura, S., Nishina, H., Ena, H., Nakauchi, H., Seed, B., Oda, H., and Yamanashi, Y. Mice lacking Dok-1, Dok-2, and Dok-3 succumb to aggressive histiocytic sarcoma. *Lab Invest* **90**, 1357-1364 (2010). <http://www.nature.com/labinvest/index.html> 査読有
- [学会発表] (計 3 件)
- ① Yamamoto M, Morita Y, Ena H, Ooehara J, Hamanaka S, Onodera M, Nakauchi H:

Megakaryocyte Lineage Commitment in Hematopoietic Stem Cells, ASH annual meeting, San Diego, USA 2011.12.13

- ② Emma H: Dnmt3b but not Dnmt3a is essential for establishment of self-renewal potential in developing hematopoietic stem cells, USA-Japan Cancer Research Workshop, Hayama, 2011.2.25
- ③ 依馬秀夫、大津真、中内啓光 「造血幹細胞とiPS細胞」、第31回 日本炎症・再生医学会、東京、2010.8.5

[図書] (計1件)

依馬秀夫 造血幹細胞 再生医学叢書

1 「**幹細胞**」(山中伸弥・中内啓光編)、70-88

(朝倉書店、2012)

[その他]

ホームページ等

<http://www.celldiff.med.keio.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

依馬 秀夫 (EMA HIDEO)

慶應義塾大学・医学部・特任准教授

研究者番号：50344445

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし