

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461445

研究課題名(和文) Satb1レポーターマウスの作製とリンパ球初期分化の制御機構の解析

研究課題名(英文) Variable SATB1 levels regulate hematopoietic stem cell heterogeneity with distinct lineage fate

研究代表者

土居 由貴子 (DOI, Yukiko)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60722288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞は全ての血液細胞に分化する能力を有し、かつその性質において不均一な細胞集団であるが、その意味については明らかでない。我々は核内クロマチン構造調節蛋白SATB1に注目し、血液細胞限定的なSATB1欠損マウス、SATB1のレポーターマウスをそれぞれ作製し、SATB1が造血幹細胞の性質にどのように関わるのかを解析した。その結果、SATB1発現量の十分でない造血幹細胞は正常な機能を発揮できず、個々の造血幹細胞のSATB1発現量はリンパ球分化能力と密接に関連し自己複製により相互に入れ替わることが判明した。これによりSATB1発現量の違いが造血幹細胞の多様性の維持に関与していることが示された。

研究成果の概要(英文)：Hematopoietic stem cells (HSCs) comprise a heterogeneous population. However, the mechanisms involved in maintaining this heterogeneity remain unclear. Here, we show that SATB1, a genome organizer, is involved in regulating the heterogeneity of HSCs. In conditional SATB1-knockout mice, SATB1 was indispensable for self-renewal and lymphopoiesis of adult HSCs. HSCs from SATB1/Tomato-knock-in reporter mice were classified based on SATB1/Tomato intensity. Transplantation, transcriptional and cell culture studies revealed stronger differentiation towards the lymphocytic lineage with high SATB1 levels, whereas SATB1- HSCs followed the myeloid lineage. Importantly, the SATB1- and SATB1+ HSC population were interconvertible upon transplantation. These results suggest that SATB1 levels regulate the maintenance of HSC multipotency, variations in which contribute to HSC heterogeneity.

研究分野：血液内科学

キーワード：造血幹細胞 リンパ球初期分化 SATB1

1. 研究開始当初の背景

真核生物の体細胞核内に保存される遺伝子情報の発現が、組織・分化段階に応じて適切に制御されることは、個体の正常な維持に必須である。そのために、階層的な作用をする転写因子とは異なる次元で遺伝子発現を制御する epigenetics 機構が深く関与する。

SATB1 は、免疫グロブリン重鎖遺伝子のエンハンサー近傍に存在する AT-rich 配列に結合する蛋白として報告され、組織では特に胸腺において高発現している(Dickinson et al. Cell. 1992, Alvarez et al. Genes Dev. 2000)。核内においては、核マトリックスに親和性を持ち、核全体の ユークロマチンの部分に網目状に連なった構造体を形成する。そしてゲノム DNA 上の特定領域 (base unpairing region) と結合し、遠く離れた領域のクロマチンをループ状に束ね、その部分に HDAC や p300 といったクロマチン修飾蛋白や各種転写因子を引き寄せて、多数の遺伝子の空間的・時間的な発現調節を可能にしていると報告されている(Kohwi-Shigematsu et al. Semin Cancer Biol. 2013)。リンパ球分化においては、胸腺 T 細胞分化に SATB1 が必須であることがかねてより示されていたが、我々の研究グループは、SATB1 が骨髄中の造血幹細胞においても低レベルの発現をしており、系統分化に応じて発現量が変化することを見出した(Satoh & Yokota et al. Immunity 2013)。すなわち、SATB1 の mRNA 量は、造血幹細胞から骨髄球系への分化に伴い急激に減少するが、早期のリンパ球分化と併行して増加する。また、造血幹細胞に SATB1 を強制発現させるとリンパ球への分化が強く誘導され、老化によってリンパ球への分化能力を失った造血幹細胞においても、リンパ球産生を部分的に回復させることができた。このことから、SATB1 は、初期のリンパ球分化において重要な役割を担っていることが明らかとなっていた。

造血幹細胞はすべての血球系統に分化する能力を有し、細胞分裂の際に造血幹細胞自身の性質を受け継ぐ細胞と、いずれかの系統の前駆細胞とに分かれることで最初の分化運命が決定する(Suda et al. Proc Natl Acad Sci USA 1984)。静止状態から分裂状態への遷移はニッチと呼ばれる環境側からの調節を受ける。SATB1 ノックアウトマウスの造血幹細胞は、G0期からG1期、すなわち分裂状態に入りやすくなっており、野生型造血幹細胞のSATB1をノックダウンすると造血幹細胞ニッチの重要な構成要素であるNotchシグナル系分子(Hes1, Hes5, Dtx5, Hey1)の発現が低下する(Will et al. Nature Immunology 2013)。そのことから、SATB1は造血幹細胞において静止状態を維持する方向に働いていることが示唆されたが、一方で、造血幹細胞がリンパ球への分化能力を高めていく過程において発現量が急速に増加することからは、初期リンパ球分化におい

て、SATB1の制御する蛋白や遺伝子のprofileに動的な変化が起きることが予想された。

造血幹細胞は、免疫学的手法とFlow cytometry技術の発達により、生体の幹細胞分画としては最も高度な純化が可能であるが、一方で個々の細胞の不均一性が報告されている(Yamamoto et al. Cell 2013)。また、全ての血球細胞に分化する能力と自己を複製する能力という対立した性質を内包しているが、状況に応じて適切な方向性を選択する機構については明らかにされていない。その機構を力学的な観点から説明する理論として、幹細胞内部の遺伝子発現の「ゆらぎ」が関わることが提唱され、「ゆらぎ」の存在することが分化多能性と自己複製能力が並存するための必要条件であると報告されている(Furusawa et al. Science 2012)。例えば、ES細胞など単一のクローン性細胞集団においても、ある時間的一点における遺伝子発現量には個々に差異が存在し、個々の細胞の自己複製・分化の運命決定に影響を与える一方で、幹細胞集団全体としての性質を維持している(Nakai-Futatsuji & Niwa, Biol. Pharm. Bull. 2013)。そのため我々は、造血幹細胞からリンパ球系への初期分化を制御する分子機構を正確に知るためには、幹細胞内部の遺伝子発現状況を正確に捉える手法の確立が必要であると考えた。

これまで、胸腺細胞やがん細胞、種々の細胞株においてSATB1が共役する蛋白あるいは制御する遺伝子が同定されてきた(Reviewed by Kohwi-Shigematsu et al. Semin Cancer Biol. 2013)が、造血幹細胞においては、Notchの抑制分子であるNumbの発現に関与する(Will et al. Nature Immunology 2013)ことが示されていたものの、造血の初期段階における SATB1 の機能に関する情報は極めて限られており、さらなる検討が必要であった。初期リンパ球分化を促進するSATB1の造血幹細胞における挙動を明らかにすることにより、この分野の基礎的な研究の進展のみならず、造血器悪性腫瘍や自己免疫疾患の治療といった臨床応用の可能性を広げることにもなると考えられた。

2. 研究の目的

SATB1 発現レベルと造血幹細胞の分化決定時期との関係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 条件付き SATB1 欠損マウスの作製と解析

SATB1 ノックアウトマウスは、海外協力研究者である Kohwi-Shigematsu 博士により樹立・解析されているが、それにより生後間も無く死亡することが明らかとなっている。成獣マウスの解析を行うためには条件付きノックアウトマウスの作製が必要と考えられた。SATB1-flox マウスは、同博士により既に作製されている。このマウスを入手し、造血幹細胞の発生・維持に必須とされるアンギオポエ

チン受容体Tie2遺伝子のプロモーター制御下にCreリコンビナーゼを発現するマウスと交配して、血液細胞特異的SATB1欠損マウスを作製し解析する。

(2) SATB1 レポーターマウスの作製と解析

SATB1の、赤色蛍光蛋白Tomatoによるレポーターマウスを作製し、造血幹細胞から血液細胞への分化過程におけるSATB1の発現量をモニタリングできる実験系を樹立し解析する。

4. 研究成果

(1) 血液細胞特異的なSATB1欠損マウスの作製と解析

SATB1-flox マウスを Tie2 遺伝子発現下に Cre リコンビナーゼを発現するマウスと交配し、血液細胞特異的な SATB1 欠損マウスを作製した。その成獣骨髄の解析を行ったところ、wild type と比較して造血幹細胞数の減少を認め(図 1A)、さらにそれぞれから採取した造血幹細胞を致死量放射線照射後のマウスへ移植した際、SATB1 欠損造血幹細胞は造血再構築能力が低いことが分かった(図 1B)。また、それぞれをリンパ球誘導条件下で培養することにより、リンパ球産生能力も低いことが分かった(図 1C)。

これにより、SATB1 は造血幹細胞のリンパ球産生能力を含む機能を正常に保つために重要であると考えられた。

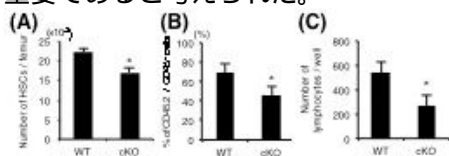


図1 血液細胞特異的なSATB1欠損マウス(cKO)の作製と解析 (A) wild type(WT)マウスとcKOマウス骨髄における造血幹細胞絶対数を示す。(B) 造血幹細胞移植: WTおよびcKOマウスから採取した造血幹細胞を致死量放射線照射後のマウスに移植し、4ヶ月後の骨髄キメラリズムを示す。(C) リンパ球分化能力の比較: WT, cKOマウスから100個ずつの造血幹細胞を採取し、リンパ球誘導条件下で培養した際に産生されたリンパ球数を示す。* p<0.05

(2) SATB1 レポーターマウスの樹立と解析

生体内での SATB1 の発現を生理的な条件下でモニタリングするため、遺伝子組み換え技術を用いて SATB1-Tomato レポーターマウスを作製した。その骨髄を解析することにより、造血幹細胞分画には SATB1-Tomato 強度の低いもの、高いものが混在していることが判明した(図 2A)。造血幹細胞分画を SATB1-Tomato 強度により陽性、陰性の 2 群に分け、各々をフローサイトメーターにより分取し、SATB1-Tomato 陽性造血幹細胞の遺伝子発現を、RNA-sequence により SATB1-Tomato 陰性造血幹細胞のそれと比較した。その結果、SATB1-Tomato 陽性造血幹細胞は陰性造血幹細胞に比べて全体的な遺伝子発現が活性化しており(図 2B)、個々の遺伝子発現量を real-time PCR 法により確認したところ、リンパ球系分化関連遺伝子の発現は全体に上昇していた(図 2C)。その一方、他系統への分化関連遺伝子の発現は低下していた(図 2D,E)。

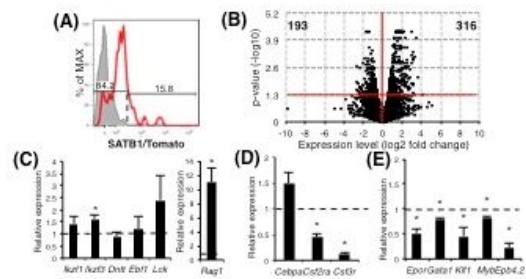


図2 SATB1レポーターマウスの樹立と解析 (A) 造血幹細胞分画におけるSATB1-Tomato発現量の解析: レポーターマウス(赤)およびWTマウス(影付き緑)の造血幹細胞をフローサイトメーターにより解析した結果を示す。(B) 遺伝子発現解析(RNA-sequence法): SATB1-Tomato陽性造血幹細胞の遺伝子発現量を、SATB1-Tomato陰性造血幹細胞の遺伝子発現量を標準として示す。個々の点は各々個別の遺伝子の発現量を表す。(C-E) 遺伝子発現解析(real-time PCR法): SATB1-Tomato陽性造血幹細胞の系統分化特異的遺伝子の発現量を、SATB1-Tomato陰性造血幹細胞を標準として示す。(C) リンパ球系関連遺伝子 (D) 骨髄球系関連遺伝子 (E) 赤血球系関連遺伝子 * p<0.05

(3) SATB1 強度の異なる造血幹細胞の機能解析(in vitro)

SATB1-Tomato 陽性、陰性造血幹細胞の血球分化誘導培養による系統別の分化能力の比較評価を、リンパ球分化に必須とされる SCF, FLT3 ligand, IL-7 などのサイトカインを添加した条件下での誘導培養により、分化コロニー形成能力をメチルセルロースコロニーアッセイ法により行った。その結果、SATB1-Tomato 陽性造血幹細胞は SATB1-Tomato 陰性造血幹細胞と比較して、高いリンパ球系分化能力を示し(図 3A)、逆に骨髄球系および赤血球系分化能力は低い(図 3B)ことがわかった。

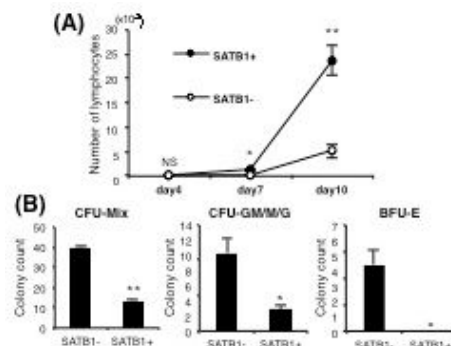


図3 SATB1強度の異なる造血幹細胞の機能解析(in vitro) (A) SATB1-Tomato陽性、陰性造血幹細胞を、リンパ球誘導条件下にMS5ストローマ細胞と共培養し、産生されたリンパ球数を比較した。(B) SATB1-Tomato陽性、陰性造血幹細胞の分化コロニー形成能力をメチルセルロースコロニーアッセイ法により評価した。* p<0.05, ** p<0.01

(4) SATB1 強度の異なる造血幹細胞の機能解析(in vivo)

SATB1-Tomato 陽性、陰性造血幹細胞を致死量の放射線を照射した他系統マウスへ移植し、造血再構築能力を評価した。その結果、造血幹細胞の SATB1-Tomato 陽性分画は、陰性分画に比べて高いリンパ球分化能力を有している一方、骨髄球系前駆細胞への分化能力は劣っていることが判明した(図 4A)。また、陽性・陰性分画は、移植マウスの骨髄内においていずれも4ヶ月以上の長期にわたり造血を再構築する能力を有し、かつ互いの分画をも再構築できることを見出した(図 4B)。

さらに、個々の造血幹細胞の性質の違いに近づけた検討を行うこととした。具体的には、SATB1 発現強度の異なる5グループを設定し、それぞれから10個ずつの造血幹細胞を採取し致死量の放射線を照射したマウスへ移植して4ヶ月後に解析した。その結果、予想通り SATB1 発現量が高くなるに従い高いリンパ球産生能力を示した(図4C)。さらに興味深いことに、最も SATB1 発現量の低いグループの造血幹細胞は、移植先のマウス骨髄内における造血再構築能力も低いという結果だった(図4D)。

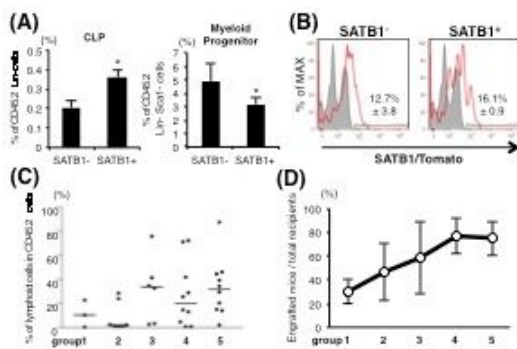


図4 SATB1強度の異なる造血幹細胞の機能解析(in vivo)
(A) SATB1-Tomato陽性・陰性造血幹細胞を致死量の放射線を照射した他系統マウスへ移植し、4ヶ月後の造血再構築能力を評価した。* p<0.05
(B) SATB1-Tomato陽性・陰性造血幹細胞から、移植マウスの骨髄において自己複製された造血幹細胞のSATB1-Tomato強度(赤)を示す。wild typeマウス造血幹細胞の自家蛍光を影付き線で示す。
(C) SATB1-Tomato発現強度の低い方から高い方へ、造血幹細胞をgroup1から5に分け、各々から10個ずつの造血幹細胞を移植して解析した。再構築された骨髄単核球におけるリンパ球の割合をグループごとに示す。
(D) (C)と同様に10個ずつの造血幹細胞を移植した際の生着率を示す。

(1)~(4)により、SATB1 発現量は造血幹細胞の系統分化能力の鋭敏な指標となり、造血幹細胞の機能的なゆらぎを、SATB1 発現量の観点から捉えることに成功した。また、造血幹細胞機能が正常に発露するためには、一定量以上の SATB1 発現が必要であることが明らかとなった。

(5) SATB1 が共役する核内蛋白の同定、及び SATB1 が制御する遺伝子 locus の同定

(1)~(4)の成果をさらに発展させるため、SATB1 蛋白をターゲットとした共免疫沈降及びクロマチン免疫沈降を試みたが、解析に必要な蛋白量を確保することが困難であった。造血幹・前駆細胞における SATB1 発現量がごく少ないのに対し、現在入手できる SATB1 特異的抗体の質が不十分であることが原因として考えられた。その解決策として免疫沈降の効率を向上させるため、内因性 SATB1 蛋白に2種類的人工タグを付加したマウスを作製した(図5A)。B6系統へのBack crossを進めるのと並行して、back cross 中間段階の個体から胸腺細胞を採取しての条件検討を行い、人工タグを標的として SATB1 蛋白を免疫沈降できることを確認した(図5B)。

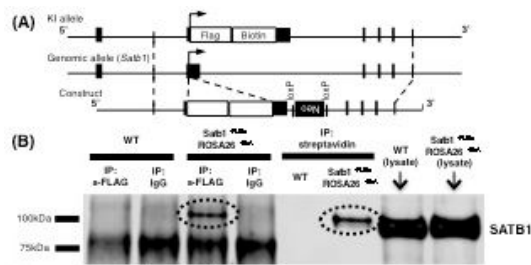


図5 SATB1-Tagマウスの作製
(A) ターゲティングベクターの設計図
(B) 胸腺細胞を用いた、タグ化SATB1蛋白のIP-Western blotting:
anti-Flag抗体およびstreptavidinによるSATB1の免疫沈降が可能である。

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 11 件)

1. Yokota T, Doi Y, Oritani K, Kanakura Y(他10名 2,7,13番目,最後) ESAM is a novel human hematopoietic stem cell marker associated with a subset of human leukemias. *Exp Hematol.* 44: 269-281(2016) 査読有
2. Yokota T, Oritani K, Kanakura Y (他7名 2,9番目,最後) Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule Expression in Hematopoietic Stem /Progenitor Cells Is Essential for Erythropoiesis Recovery after Bone Marrow Injury. *PLoS One.* 25; 11: e0154189 (2016) 査読有
3. Doi Y, Yokota T, Oritani K, Kanakura Y(他6名 1,2,9番目,最後) SATB1 Expression Marks Lymphoid – lineage - Biased Hematopoietic Stem Cells in Mouse Bone Marrow. *Blood* 126: 2356 (2015) 査読有
4. Yokota T, Doi Y, Oritani K, Kanakura Y(他9名 2,7,12番目,最後) ESAM Is a Novel Human Hematopoietic Stem Cell Marker Associated with a Subset of Human Leukemias. *Blood* 126: 1154 (2015) 査読有
5. Yokota T, Oritani K, Doi Y, Kanakura Y(他12名 1,2,5番目,最後) Estrogen-inducible sFRP5 inhibits early B-lymphopoiesis in vivo, but not during pregnancy. *Eur J Immunol.* 45: 1390-1401 (2015) 査読有
6. 数藤孝雄, 横田貴史, 金倉 謙. 「活性化造血幹細胞における血管内皮抗原ESAMの役割」*臨床血液* 56: 464-474(2015) 査読無
7. Yokota T, Kanakura Y. Role of tissue-specific AT-rich DNA sequence-binding proteins in lymphocyte differentiation. *Int J Hematol* 100: 238-245(2014) 査読有
8. Yokota T. molecular mechanisms of lymphocyte development: recent findings. *Int J Hematol* 100: 218-219 (2014) 査読有
9. Ichii M, Oritani K, Kanakura Y. Early B lymphocyte development: Similarities and differences in human and mouse. *World J Stem Cells* 6: 421-431(2014) 査読有

10. 横田貴史, 金倉 讓. 「リンパ球への分化と転写制御」臨床免疫・アレルギー科 62: 227-232 (2014) 査読無
11. Yokota T, Doi Y, Oritani K, Kanakura Y(他12名 2,5,15番目,最後) MS4A3 Marks Early Myeloid Differentiation in Human Hematopoiesis. Blood 124: 4319 (2014) 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

1. The 58th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition
Yukiko Doi, Takafumi Yokota, Yusuke Satoh, Tomoaki Ueda, Yasuhiro Shingai, Michiko Ichii, Akira Tanimura, Sachiko Ezoe, Hirohiko Shibayama, Kenji Oritani, Terumi Kohwi-Shigematsu, Yuzuru Kanakura
SATB1 Expression helps in identification of the lymphoid-lineage-biased trajectory of functionally fluctuating hematopoietic stem cells
2016. 12.3-12.6 (San Diego, USA)
2. 第78回日本血液学会学術集会 SETP4
土居由貴子, 横田貴史, 石橋知彦, 佐藤友亮, 一井倫子, 谷村 朗, 江副幸子, 柴山浩彦, 織谷健司, 金倉 讓
SATB1 expression marks lymphoid-lineage-biased hematopoietic stem cells in mouse bone marrow.
2016. 10.13-10.15 (横浜)
3. 第78回日本血液学会学術集会
土居由貴子, 横田貴史, 石橋知彦, 佐藤友亮, 一井倫子, 谷村 朗, 江副幸子, 柴山浩彦, 織谷健司, 金倉 讓
SATB1 expression marks lymphoid-lineage-biased hematopoietic stem cells in mouse bone marrow.
2016. 10.13-10.15 (横浜)
4. The 57th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition
Yukiko Doi, Takafumi Yokota, Tomohiko Ishibashi, Yusuke Satoh, Michiko Ichii, Akira Tanimura, Sachiko Ezoe, Hirohiko Shibayama, Kenji Oritani, Yuzuru Kanakura
SATB1 Expression marks lymphoid-lineage-biased hematopoietic stem cells in mouse bone marrow.
2015. 12.5-12.8 (Florida, USA)
5. 第76回日本血液学会学術集会
土居由貴子, 横田貴史, 谷村 朗, 齋藤則充, 一井倫子, 江副幸子, 柴山浩彦, 織谷健司, 金倉 讓
Functional analysis of a chromatin-remodeling protein in early lymphoid differentiation.
2014. 10.31-11.2 (大阪)

〔図書〕(計 1 件)

横田貴史. 中外医学社
「リンパ球の発生・分化と老化」
Annual Review血液2015 286頁(p10-26) 査読無

〔その他〕

大阪大学血液腫瘍内科学講座HP
<http://www.hematology.pro/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

土居 由貴子 (DOI, Yukiko)
大阪大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：60722288

(2)研究分担者

横田 貴史 (YOKOTA, Takafumi)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：60403200

織谷 健司 (ORITANI, Kenji)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：70324762

金倉 讓 (KANAKURA, Yuzuru)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20177489

(3)連携研究者

竹田 潤二 (TAKEDA, Junji)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50163407

(4)研究協力者

Terumi Kohwi-Shigematsu
Department of Orofacial Sciences,
University of California San Francisco,
San Francisco, CA, USA