

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2019～2023

課題番号：19H05746

研究課題名（和文）幹細胞の運命決定に関わるクロマチン複製機構の解明

研究課題名（英文）Characterization of chromatin replication associated with stem cell fate decision

研究代表者

岩間 厚志（Iwama, Atsushi）

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：70244126

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 129,400,000円

研究成果の概要（和文）：造血幹細胞の分裂により生じる2つの娘細胞のHi-CとRNA-seqデータを同一1細胞から同時取得する新技術を開発し、娘細胞ペアのHi-C/RNA-seqデータの取得に成功した。RNA-seq解析と染色体テリトリー配列の相関から、対称性分裂に加えて非対称性分裂や両娘細胞が分化する分裂様式が確認され、RNA-seqと高次クロマチン構造データのさらなる統合を進めることにより、造血幹細胞のクロマチン複製様式とその自己複製・分化の運命制御機構が明らかになるものと期待される。分担研究者の北村は、造血器腫瘍で認められるC末端欠失型ASXL1変異の機能解析を行い、造血腫瘍や動脈硬化に対する影響を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血幹細胞の分裂により生じる2つの娘細胞の解析において、Hi-CとRNA-seqデータを同一1細胞から同時取得が可能となった。RNA-seqと高次クロマチン構造データの統合を進めることにより、造血幹細胞のクロマチン複製様式とその自己複製・分化の運命制御機構が明らかになるものと期待される。また、骨髄系血液腫瘍において頻用されるDNAメチル化阻害剤の耐性に関わる分子として、ユビキチンE3リガーゼTOPORSを同定した。DNAメチル化阻害剤とTOPORSの機能抑制の併用が有望な新規治療戦略となりうることが示され、新規創薬につながるものが期待される。

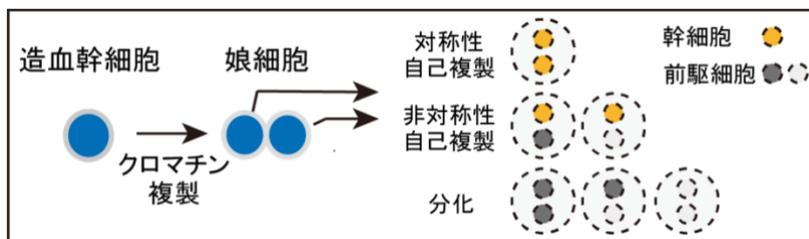
研究成果の概要（英文）：We succeeded to perform Hi-C and RNA-seq analysis using the same single cells. We applied this method to two daughter cells from hematopoietic cells. The obtained data suggested the combination of transcriptome and higher order chromatin structure data is powerful to define symmetric versus asymmetric stem cell division. Further analysis would clarify the epigenetic mechanism that determines the fate decision of hematopoietic stem cells: self-renewal versus differentiation.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：造血幹細胞 運命制御 自己複製 エピジェネティクス

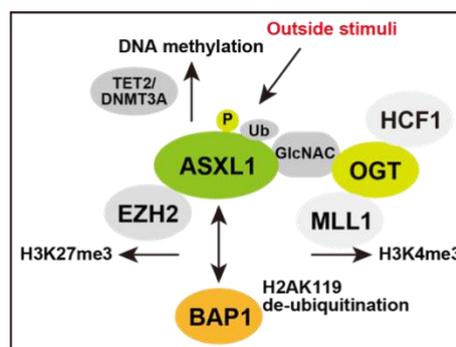
1. 研究開始当初の背景

一度決定された細胞形質が細胞分裂後も娘細胞に維持される「細胞記憶」を幹細胞に当てはめると、「細胞記憶」の維持が自己複製でありその破綻が分化といえる。この幹細胞の運命を決定するのが分裂時のクロマチン複製様式である(右図)。自己複製分裂においてはエピゲノム修飾も含めクロマチンは対称性に複製され、分化においては非対称性に複製されることが想定される。しかし、このようなクロマチンの複製様式の実態はいまだ確認されていない。



造血幹細胞はシングルセル解析が最も盛んに行われている幹細胞であり、その自己複製・分化の解析が、培養系やマウスを用いたシングルセル移植により詳細に行われてきた。また、純度の極めて高い造血幹細胞を用いて、遺伝子発現プロファイリングや非ゲノム情報解析がシングルセルレベルで可能になりつつある。研究代表者の岩間は、この造血幹細胞研究にいち早く非ゲノム情報解析を導入し、ヒストン修飾を介して遺伝子発現を抑制するポリコーム群複合体を中心に、造血幹細胞の自己複製と分化に関わる非ゲノム情報の制御機構を解析してきた。これまでに、ポリコーム群複合体が *Ink4a/Arf* や分化のマスター制御遺伝子の発現抑制を介して、造血幹細胞の自己複製能 (*Immunity* 2004; *J Exp Med* 2006) や分化能 (*Cell Stem Cell* 2010) を維持すること、ポリコーム群遺伝子 *Bmi1* の発現増強やクロマチン分子 PHF6 の欠損が造血幹細胞の自己複製活性を増強し、造血幹細胞にストレス耐性を付与すること (*Immunity* 2004; *Blood* 2019) を明らかにしてきた。さらに、岩間は領域代表として新学術領域研究「ステムセルエイジングから解明する疾患原理」(H26~H30)を立ち上げ幹細胞研究を推進してきた。特に、骨髄異形成症候群 (MDS) や骨髄増殖性腫瘍 (MPN) などの加齢造血幹細胞を母地とする骨髄系腫瘍の発症に、ポリコーム群複合体の機能低下が関わることを見出し、造血幹細胞の加齢に伴う非ゲノム情報の制御異常が造血幹細胞の自己複製・分化異常を介して形質転化を促進することを明らかにしてきた (*J Exp Med* 2013; *Nat Commun* 2014; *Blood* 2015; *J Exp Med* 2016; *J Exp Med* 2017; *Blood* 2018)。

一方で分担研究者の北村は、scaffold 分子としてエピジェネティック調節の中心的役割を果たす ASXL1 (右図) の解析を行い、ASXL1 変異体を発現するマウスの造血幹細胞に自己複製異常があることを明らかにした (*J Exp Med*, 2018)。ASXL1 は H2AK119Ub の脱ユビキチン化、H3K27me3、H3K4me3 修飾に関与するが、中でも H3K4me3 との相関は強く、ASXL1 変異マウスでは H3K4me3 修飾が抑制される。ASXL1 がヒストン修飾の複製を介してクロマチン複製さらには造血幹細胞の自己複製に関わる可能性がある。ASXL1 変異マウスはこの仮説を検証する有用なモデルである。



2. 研究の目的

本研究においては、造血幹細胞とその分裂によって生じる 2 つの娘細胞のシングルセル解析を行い、それらのクロマチン複製様式とシングルセル骨髄移植によって規定される造血幹細胞の生物学的な自己複製・分化との対応を検証することにより、クロマチン複製の生物学的意義を明らかにする。また、様々なクロマチン複製制御因子について、その造血幹細胞の運命決定における機能解析を通して、クロマチン複製制御の分子機構とその生物学的意義を体系的に理解する。これらの目的のために、以下の 3 つの研究項目を岩間と北村が連

携して解析を行う。

3. 研究の方法

【研究項目 1】 造血幹細胞の細胞運命を規定するクロマチン複製様式の同定 (岩間)

造血幹細胞とその分裂によって生じる2つの娘細胞のシングルセルを用いて、油谷・永野と共同で ATAC-Seq によるオープンクロマチン領域解析、シングルセル Hi-C 解析によるトポロジカル関連ドメイン (TAD) 解析、ならびにシングルセル RNA-seq を行い、造血幹細胞の分裂様式をクロマチン複製と遺伝子発現の観点から理解する。そのうえで、娘細胞のシングルセル骨髄移植によって規定される造血幹細胞の生物学的な自己複製・分化との対応を明らかにする。

【研究項目 2】 クロマチン複製制御因子の生物学的意義の検証 (岩間、北村)

本領域研究において同定されるクロマチン複製制御因子群について、その造血幹細胞の自己複製における機能を遺伝子破壊や過剰発現系を用いて検証し、クロマチン複製制御の分子メカニズムとその生物学的意義を体系的に理解する。

【研究項目 3】 非ゲノム情報調節因子 ASXL1 によるクロマチン複製制御機構の解明 (北村・岩間)

ASXL1 は EZH2、MLL、BAP1 など多くのエピジェネティック関連分子と結合し、H3K4me3、H3K27me3、H2AK119Ub1 などの修飾に関与する scaffold 分子として機能する。ASXL1 が、ヒストン修飾の複製を介してクロマチン複製を制御する可能性について、造血器腫瘍や健康高齢者のクローン性造血に頻度の高い ASXL1 変異体を発現するマウスを用いて検証する。

4. 研究成果

【研究項目 1】 造血幹細胞の細胞運命を規定するクロマチン複製様式の同定 (岩間)

(1) 領域設定期間内及び中間評価実施時までの目標と中間評価実施時までの進展

岩間は永野との共同研究で、造血幹細胞の細胞分裂により生み出される2つの娘細胞の細胞形質と高次クロ

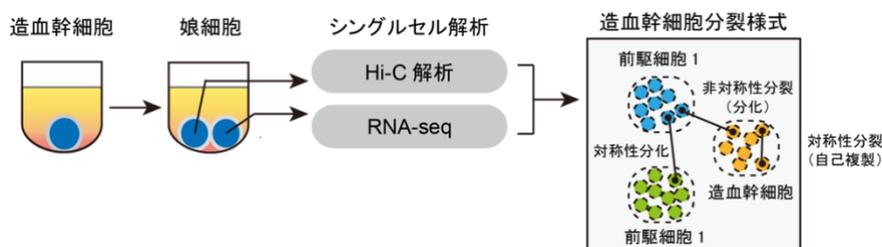


図 1. 造血幹細胞を用いた Paired daughter cell assay

マチン構造をペアとして1細胞解析することで、造血幹細胞の対称分裂と非対称分裂におけるクロマチン高次構造の継承の実態とその細胞形質変化への関わりを明らかにする (図1)。

永野は HCT116 細胞株の細胞周期変化を利用して、同一細胞から得た Hi-C データと RNA-seq データの整合性を確認した (図2)。

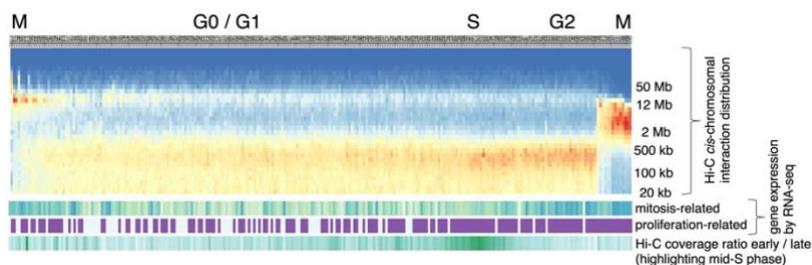


図 2. 同一細胞から得た Hi-C/RNA-seq データの整合性

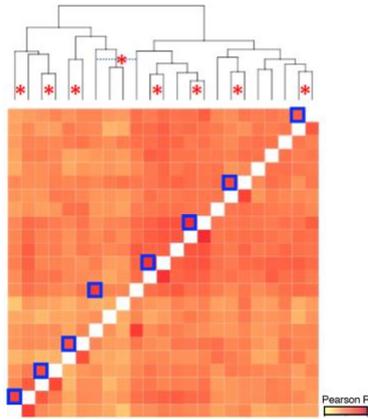


図3. 娘細胞ペアのクロマチン高次構造特性

この新技术を用い、造血幹細胞の娘細胞ペアの Hi-C データを比較したところ、同じ幹細胞から生み出されたペア（図3に太枠と*印でマーク）同士の染色体テリトリー配列の相関がそれ以外に比べ高い傾向にあることが分かった。Hi-C 解析とは別個に解析を進めている娘細胞ペアの1細胞 RNA-seq 解析では、UMAP 解析データ（図4）から、多くは娘細胞同士が似たプロファイルを示し対称性分裂が想定される中で、一部の娘細胞ペアの片方のみ異なるプロファイルを示すものが同定されており、非対称分裂がある一定頻度で起こっているものと考えられる。実際、RNA-seq 解析と染色体テリトリー配列の相関から、対称性分裂に加えて非対称性分裂や両娘細胞が分化する分裂様式が確認され、RNA-seq と高次クロマチン構造データのさらなる統合を進めることにより、造血幹細胞のクロマチン複製様式とその自己複製・分化の運命制御機構が明らかになるものと期待されるこのようなデータを高次クロマチン構造と統合することにより、造血幹細胞のクロマチン複製様式とその自己複製・分化の運命制御が明らかになることが期待される。

この新技术を用い、造血幹細胞の娘細胞ペアの Hi-C データを比較したところ、同じ幹細胞から生み出されたペア（図3に太枠と*印でマーク）同士の染色体テリトリー配列の相関がそれ以外に比べ高い傾向にあることが分かった。Hi-C 解析とは別個に解析を進めている娘細胞ペアの1細胞 RNA-seq 解析では、UMAP 解析データ（図4）から、多くは娘細胞同士が似たプロファイルを示し対称性分裂が想定される中で、一部の娘細胞ペアの片方のみ異なるプロファイルを示すものが同定されており、非対称分裂がある一定頻度で起こっているものと考えられる。実際、RNA-

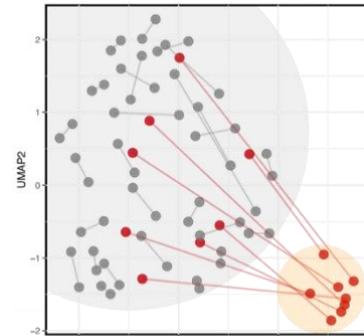


図4. 娘細胞ペアのトランスクリプトーム特性

【研究項目2】 クロマチン複製制御因子の生物学的意義の検証（岩間、北村）

このプロジェクトに関連して造血幹細胞のクロマチンアクセシビリティを網羅的にプロファイルして報告した (Nat Commun, 2022)。また、岩間は、CRISPR/Cas9 スクリーニングにより、骨髄系血液腫瘍において頻用される DNA メチル化阻害剤の耐性に関わる分子として、ユビキチン E3 リガーゼ TOPORS を同定した。その作用機序として、DNA に取り込まれた DNA メチル化阻害剤とクロスリンクシモ化を受けた DNMT1 に対して、TOPORS がユビキチンリガーゼとして働き、DNA-DNMT1 adduct の分解に関わることを明らかとし、DNA メチル化阻害剤と TOPORS の機能抑制の併用が有望な新規治療戦略となりうることを提示した (Nat Commun, 2024)。

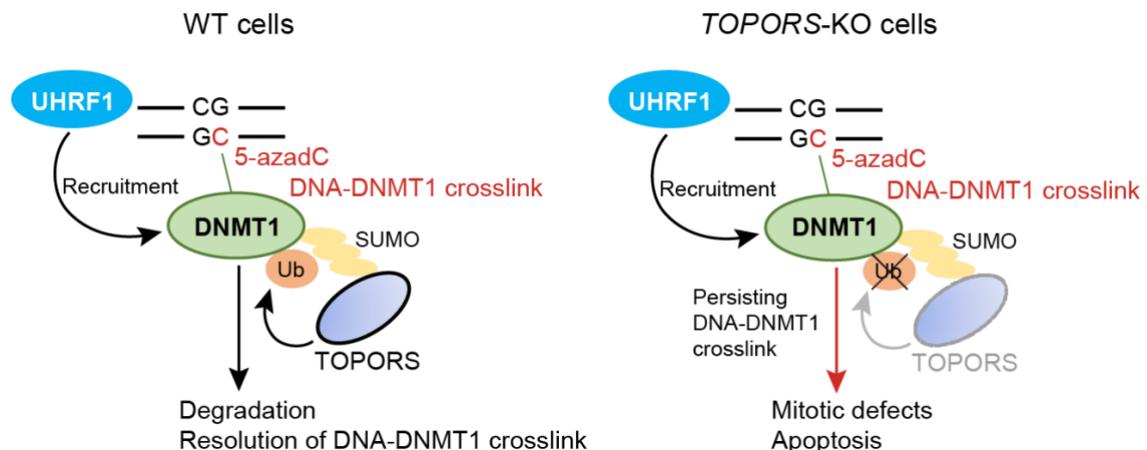


図5. TOPORS の DNA-DNMT1 共有結合物の分解機能

【研究項目 3】 非ゲノム情報調節因子 ASXL1 によるクロマチン複製制御機構の解明（北村・岩間）

分担研究者の北村は、ASXL1、BAP1 を中心としたヒストン修飾分子群が細胞運命に与える影響を解析する。造血器腫瘍で認められる ASXL1 変異の多くは C 末端欠失型(ASXL1-MT) であり、活性化(H3K4me3)・不活化(H3K27me3/H2AK119Ub)ヒストン修飾の両方を低下させることを示してきた。本研究では以下を明らかにした。

1. ASXL1-MT ノックインマウスにおいて、ASXL1-MT は造血幹細胞の細胞周期亢進・ミトコンドリア活性化・ROS 上昇を介して DNA ダメージをもたらし、造血幹細胞数・機能の低下を誘導する(Nat Commun, 2021)。
2. ASXL1-MT ノックインマウスでは炎症性マクロファージが増加し、動脈硬化が増悪する。
3. ASXL1-MT は BAP1 と協調して H2AK119Ub の脱ユビキチン化を介して下流のオンコジーン発現を誘導し、白血病発症を増強する。同時に BAP1 をノックアウトすると白血病細胞の増殖が抑制されることから、従来がん抑制遺伝子と考えられていた BAP1 が造血系の細胞ではがん遺伝子的な機能を有する (Blood, 2020)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kaito S, Aoyama K, Oshima M, Tsuchiya A, Miyota M, et al., and Agger K, Helin K, Yamazaki S, Koseki H, Doki N, Harada Y, Harada H, Nishiyama A, Nakanishi M, Iwama A	4. 巻 in press
2. 論文標題 Inhibition of TOPORS ubiquitin ligase augments the efficacy of DNA hypomethylating agents through DNMT1 stabilization.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-30440-2	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 Watanuki Shintaro, Kobayashi Hiroshi, et al., and Iwama Atsushi, Suda Toshio, Takubo Keiyo	4. 巻 12
2. 論文標題 Context-dependent modification of PFKFB3 in hematopoietic stem cells promotes anaerobic glycolysis and ensures stress hematopoiesis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 RP87674
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.87674	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 -
1. 著者名 Nakajima-Takagi Yaeko, Oshima Motohiko, Takano Junichiro, Koide Shuhei, Itokawa Naoki, Uemura Shun, Yamashita Masayuki, Andoh Shohei, Aoyama Kazumasa, Isshiki Yusuke, Shinoda Daisuke, Saraya Atsunori, Arai Fumio, Yamaguchi Kiyoshi, Furukawa Yoichi, Koseki Haruhiko, Ikawa Tomokatsu, Iwama Atsushi	4. 巻 12
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 e83004
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.83004	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 -
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 Rizq Ola, Mimura Naoya, Oshima Motohiko, et al., and Honda Hiroaki, Iwama Atsushi	4. 巻 37
2. 論文標題 UTX inactivation in germinal center B cells promotes the development of multiple myeloma with extramedullary disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 1895 ~ 1907
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-023-01928-7	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7件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Iwama A
2. 発表標題 Aging of hematopoietic stem cells
3. 学会等名 International Symposium on "Signals for Human, Animal and Planetary Health (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Iwama A
2. 発表標題 Targeting Hippo pathway in bone marrow niche promotes hematopoietic regeneration.
3. 学会等名 The 21st IRCMS Symposium on The Dynamics and Development of Normal and Malignant Hematopoietic Stem Cells (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Iwama A
2. 発表標題 TOPORS ubiquitin ligase promotes degradation of DNMT1 in the presence of DNA hypomethylating agents.
3. 学会等名 Tsuruoka Conference "Role of epigenetic factors in cancer" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Iwama A
2. 発表標題 Chromatin accessibility in stem cells unveils progressive transcriptional reprogramming in myelodysplastic syndrome.
3. 学会等名 The 82th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Iwama A
2. 発表標題 TOPORS ubiquitin ligase promotes DNMT1 degradation upon DNA hypomethylating agents.
3. 学会等名 The 2nd International Symposium on REPLICATION of NON GENOME 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Iwama A
2. 発表標題 Research trends in hematopoietic regeneration and immunotherapy.
3. 学会等名 A Regenerative Medicine and Gene Therapy Showcase by AMED-SCN (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shin Kaneko, Panelist: Atsushi Iwama, Masahiro Kino-oka, and Kiyoshi Okada
2. 発表標題 The Japanese Society for Regenerative Medicine Roundtable “The way of Japan: Japan’s efforts to promote science and industry in the field of regenerative medicine.
3. 学会等名 The 29th International Society for Cell & Gene Therapy Annual Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

幹細胞分子医学分野ホームページ https://www.ims.u-tokyo.ac.jp/molmed/ 幹細胞分子医学分野 https://www.ims.u-tokyo.ac.jp/molmed/ 幹細胞分子医学分野ホームページ https://www.ims.u-tokyo.ac.jp/molmed/ 細胞療法分野ホームページ https://www.ims.u-tokyo.ac.jp/clinical_oncol/index.html 幹細胞分子医学分野HP https://www.ims.u-tokyo.ac.jp/molmed/

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	北村 俊雄 (Kitamura Toshio) (20282527)	東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・名誉教授 (12601)	

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