

令和元年5月27日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05339

研究課題名(和文)造血幹細胞における包括的転写調節分子SATB1の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of SATB1, a global transcription regulator, in hematopoietic stem cells

研究代表者

金倉 譲 (KANAKURA, Yuzuru)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20177489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、造血幹細胞からリンパ球分化の初期段階を制御する分子機構を明らかにすることを目的に、全ゲノムの遺伝子発現を網羅的に制御するクロマチン構造調節蛋白Special AT-richsequence binding protein 1(SATB1)の機能に焦点を当てて解析を行った。造血幹細胞はSATB1の発現強度により生理的特質の異なる集団に細分化できること、SATB1はリンパ球系偏位の指標となること、造血幹細胞のSATB1発現量は自己複製過程において変容することが判明した。本研究成果は、生命物理学野において提唱されている「幹細胞のゆらぎ」の概念を、実際の生命現象として観察したと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血幹細胞は、全系統の血液細胞に分化する能力と自己複製能力を有し、生涯の造血を支える細胞である。機能的に均一な細胞集団という概念に基づき、高純度で分離する技術が確立されてきたが、最近の研究で高度に純化した造血幹細胞集団も、機能的に不均一な細胞から構成されていることが明らかにされつつある。我々の成果は、リンパ球を産生する能力が高い造血幹細胞の存在を明らかに証明するとともに、それらの分子細胞学的な特徴について、「幹細胞のゆらぎ」の観点から提示した。リンパ球を高率に産生する造血幹細胞の同定は、老化や疾患によって衰える免疫系の機能を回復させる方法につながり、今後の高齢化社会にとって極めて重要である。

研究成果の概要(英文)：The population of hematopoietic stem cells (HSCs) consists of a range of cells exhibiting diverse self-renewal and differentiation capabilities. However, the mechanisms underpinning this heterogeneity remain unclear. We studied how Special AT-richsequence binding protein 1 (SATB1), a global genome organizer, is involved in regulating HSC heterogeneity. HSCs from Satb1/Tomato-knockin reporter mice were classified based on SATB1/Tomato intensity, with transplantation experiments revealing stronger differentiation toward the lymphocytic lineage along with high SATB1 levels, whereas SATB1⁻ HSCs followed the myeloid lineage. Importantly, SATB1⁻ and SATB1⁺ HSC populations were interconvertible upon transplantation. Single-cell-transplantation experiments showed heterogeneous reconstitution of HSCs over long period. These results suggest that SATB1 levels regulate the maintenance of HSC multipotency, with variations contributing to HSC heterogeneity.

研究分野：血液学

キーワード：造血幹細胞 リンパ球 クロマチン構造調節蛋白

1. 研究開始当初の背景

真核生物の細胞核内に保存される遺伝子情報の発現は、その細胞が果たすべき役割に応じて適切に制御されている。膨大な遺伝子情報の中から必要なものを適切に選択し、不必要なものを抑制する分子機構は、個体の正常な発生と維持に必須である。この分子機構において、遺伝子発現を階層的に調節する転写因子に加え、遺伝子発現を包括的に制御するエピジェネティックな機構が近年注目されるようになった。血液・免疫細胞の分化においても、ジェネティックな機構とエピジェネティックな機構が相補的に働き、遺伝子発現を精巧に調節していることが明らかにされつつあった(Yokota, Kanakura et al. *Int J Hematol* 2013)。

Special AT-rich sequence binding protein 1 (SATB1)は、ゲノム全体の構造を調節するエピジェネティックな機構を介して、多くの遺伝子の発現を調節する機能を持つ蛋白である。当初この蛋白は、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同定された(Dickinson et al. *Cell*. 1992)。組織では胸腺において高発現しており、Tリンパ球の分化に必須であることが明らかにされていた(Alvarez et al. *Genes Dev*. 2000)。

申請者らは、独自に開発した細胞分離方法(Yokota et al. *Immunity* 2003)を用いて解析を行い、骨髄中の造血幹細胞や未分化リンパ球前駆細胞においても SATB1 が発現していることを見出した。SATB1 の発現量はリンパ球系への初期分化に伴って増加し、機能的にもリンパ球系への運命決定に強く関与していた。さらに老化による造血幹細胞の機能低下に SATB1 の発現量の低下が関与しており、外来的な SATB1 の発現誘導によって造血幹細胞のリンパ球産生能力を増幅できることを明らかにしていた(Satoh & Yokota et al. *Immunity* 2013)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、造血幹細胞の自己複製能力・分化能力の維持において、クロマチン構造の調節を介して遺伝子発現を包括的に制御する蛋白 SATB1 の機能と動態を解析し、その異常と造血幹細胞の劣化との関連を解明することである。申請者らは、先行研究で、造血幹細胞からリンパ球への分化において SATB1 が必須であり、造血幹細胞の老化とともにその発現量が顕著に減衰することを見出していた。本研究では、高度に純化した造血幹細胞を SATB1 の発減量に基づいて細分化し、SATB1 陽性幹細胞の機能的特性と SATB1 陰性幹細胞との相互関係を解析する。さらに造血幹細胞における SATB1 の共役蛋白と標的遺伝子を明らかにする。その知見に基づき、老化や疾患に伴う造血幹細胞の機能不全の克服を目指す。

3. 研究の方法

(1) SATB1 発現レベルを生体内でモニターできるレポーターマウスの作製と解析

生体において SATB1 の発現を蛍光色素でモニタリングできるマウスを作製する。造血幹細胞や未分化造血前駆細胞の集団を SATB1 の発現量で細分化し、増殖・分化能力を比較する。造血幹細胞集団が SATB1 陽性と陰性に分離できた場合、それぞれの発現遺伝子のプロファイリングを mRNA-sequence 法を用いて行う。

(2) 条件付き SATB1 欠損マウスの作製と解析

SATB1-floxed マウスと造血幹細胞において活性化しているプロモーターによって Cre recombinase を発現するマウス (Tie2-Cre または Vav-Cre トランスジェニックマウス) を交配し、造血細胞特異的な SATB1 欠損状態を誘導して、造血・免疫機構における表現型を解析する。またそれらのマウス骨髄から造血幹細胞を分離し、*in vitro* で増殖・分化能力を解析する。

(3) ビオチン化 SATB1 を発現するトランスジェニックマウスの作製と解析

SATB1 蛋白の N 末端にビオチン化領域と Flag タグ領域を付加したノックインマウスを作製する。ビオチンや Flag タグに特異的に結合する蛍光色素を用いて、造血幹細胞核内における SATB1 の動態を、色々な条件下で解析する。

次にアビジンとビオチンの特異的結合を応用した免疫沈降を行い、生体内の造血幹細胞の核内で SATB1 と相補的に機能している蛋白を同定する。また免疫沈降と chip-sequence assay と組み合わせて、造血幹細胞の中で SATB1 が直接制御している遺伝子群を同定する。

4. 研究成果

極めて未分化な造血幹・前駆細胞集団において、SATB1 がどのような機能的意義を持つのかを検討した。まず、Mx1-Cre, Tie2-Cre および Vav-Cre トランスジェニックマウスと、SATB1-floxed マウスを交配し、3系統の血液細胞特異的 SATB1 欠損マウスを作製した。野生型マウスと血液細胞特異的 SATB1 欠損マウスから造血幹細胞分画を採取し、致死量の放射線照射を行ったマウスに移植し 4 ヶ月後に解析すると、SATB1 欠損造血幹細胞移植群のドナー細胞キメラは、野生型移植群に比べ有意に低かった。また、採取した造血幹細胞を異なる条件下で培養すると、SATB1 欠損造血幹細胞は、骨髄・赤芽球系細胞の産生能力は保たれていたが、リンパ球産生能力は有意に低下していた。

次に生理的な条件での SATB1 発現を観察するため、SATB1 遺伝子座の片方に赤色蛍光蛋白 tdTomato の遺伝子を導入したレポーターマウスを作製した。このマウスの骨髄を解析した結果、造血幹細胞分画において SATB1-tdTomato の発現が検出でき、発現強度に基づいて SATB1⁻、SATB1⁺ の 2 つに分画化できた。培養実験で、SATB1⁺ 造血幹細胞は SATB1⁻ に比べ骨髄球・赤血球系コロニー形成が有意に少なく、またリンパ球誘導条件では、SATB1⁺ 造血幹細胞からのリンパ球産生は、SATB1⁻ に比べ有意に増加した。次に長期造血再構築能力を評価するため、継代的移植実験を行った。SATB1⁻、SATB1⁺ 造血幹細胞を放射線照射マウスに移植し 4 ヶ月後に解析し(一次移植)、レシピエント骨髄細胞を別のマウスに移植し 4 ヶ月後に解析した(二次移植)。一次移植後、SATB1⁺ 移植群で有意に共通リンパ球前駆細胞の再構築能が高かった。その一方、一次・二次移植とも、両群で同様の造血幹細胞分画が再構築されたことから、両群はリンパ球分化能力が異なるものの、どちらも長期自己複製能力を有する造血幹細胞集団であることが示唆された。さらに造血幹細胞分画を SATB1 の発現強度毎に 5 群に細分化し、各々 10 個の細胞を放射線照射マウスに移植し 4 ヶ月後に解析すると、SATB1 発現の高い造血幹細胞の方がリンパ球系を効率よく再構築した。最後に上記の 5 群の造血幹細胞を、単一細胞レベルでの移植実験を行ったところ、1 個の造血幹細胞から多様な SATB1 の発現強度を呈する造血幹細胞分画が再構築された。

以上の結果から、造血幹細胞は SATB1 の発現強度により生理的特質の異なる集団に細分化できること、SATB1 はリンパ球系偏位の指標となること、造血幹細胞の SATB1 発現量は自己複製過程において変容することが判明した。また本研究成果は、幹細胞が自己複製能と多能性を保持するためには遺伝子発現量が常に変動していることが必要条件であるという「幹細胞のゆらぎ」の概念を、実際の生命現象を通して観察することに成功したと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Ueda T, Maeda T, Kusakabe S, Fujita J, Fukushima K, Yokota T, Shibayama H, Tomiyama Y, Kanakura Y. Addition of melphalan to fludarabine/busulfan (FLU/BU4/MEL) provides survival benefit for patients with myeloid malignancy following allogeneic bone-marrow transplantation/peripheral blood stem-cell transplantation. *Int J Hematol*. 2019;109(2):197-205. (査読有) doi: 10.1007/s12185-018-2562-8.

2. Doi Y, Yokota T, Satoh Y, Okuzaki D, Tokunaga M, Ishibashi T, Sudo T, Ueda T, Shingai Y, Ichii M, Tanimura A, Ezoe S, Shibayama H, Kohwi-Shigematsu T, Takeda J, Oritani K, Kanakura Y. Variable SATB1 Levels Regulate Hematopoietic Stem Cell Heterogeneity with Distinct Lineage Fate. *Cell Rep*. 2018;23(11):3223-3235. (査読有) doi: 10.1016/j.celrep.2018.05.042.

3. Ishibashi T, Yokota T, Satoh Y, Ichii M, Sudo T, Doi Y, Ueda T, Nagate Y, Hamanaka Y, Tanimura A, Ezoe S, Shibayama H, Oritani K, Kanakura Y. Identification of MS4A3 as a reliable marker for early myeloid differentiation in human hematopoiesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;495(3):2338-2343. (査読有) doi: 10.1016/j.bbrc.2017.12.117.

4. Yokota T, Kanakura Y. Genetic abnormalities associated with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Sci*. 2016;107(6):721-725. (査読有) doi: 10.1111/cas.12927.

5. Sudo T, Yokota T, Okuzaki D, Ueda T, Ichii M, Ishibashi T, Isono T, Habuchi Y, Oritani K, Kanakura Y. Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule Expression in Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Is Essential for Erythropoiesis Recovery after Bone Marrow Injury. *PLoS One* 2016;11(4):e0154189. (査読有) doi: 10.1371/journal.pone.0154189.

6. Ishibashi T, Yokota T, Tanaka H, Ichii M, Sudo T, Satoh Y, Doi Y, Ueda T, Tanimura A, Hamanaka Y, Ezoe S, Shibayama H, Oritani K, Kanakura Y. ESAM is a novel human hematopoietic stem cell marker associated with a subset of human leukemias. *Exp Hematol*. 2016;44(4):269-281. (査読有) doi: 10.1016/j.exphem.2015.12.010.

[学会発表] (計 15 件)

1. Ueda T, Yokota T, Uno Y, Mashimo T, Sudo T, Ishibashi T, Doi Y, Shingai Y, Tanimura A, Ichii M, Ezoe S, Shibayama H, Oritani K, Kanakura Y.

ESAM on the Cells of Endothelial Lineage Plays an Important Role in the Development of Definitive Hematopoiesis.

The American Society of Hematology 60th Annual Meeting. 2018. San Diego, USA.

2. Shingai Y, Yokota T, Ozawa T, Ueda T, Doi Y, Ishibashi T, Tanimura A, Ichii M, Shibayama H, Kanakura Y.

Monitoring ESAM Expression Levels Reveals Autonomous Fluctuation of Leukemia Stem Cells By Autocrine/Paracrine Cytokine Signaling.

The American Society of Hematology 60th Annual Meeting. 2018. San Diego, USA.

3. Kusakabe S, Fukushima K, Maeda T, Yokota T, Nakai R, Hino A, Nagate Y, Fujita J, Daisuke M, Nakamura S, Shibayama H, Kanakura Y.

A Novel Unifrac-Based Analytical Method for Determining Sequential Changes in Gut Microbiota after Hematopoietic Stem Cell Transplantation.

The American Society of Hematology 60th Annual Meeting. 2018. San Diego, USA.

4. Nagate Y, Ezoe S, Fujita J, Yokota T, Ichii M, Tanimura A, Doi Y, Ueda T, Toda J, Shibayama H, Oritani K, Kanakura Y.

Ectonucleosidase CD39 Is Highly Expressed on ATLL Cells and Suppresses the Immune Response through the Adenosine Pathway.

The American Society of Hematology 60th Annual Meeting. 2018. San Diego, USA.

5. Ueda T, Maeda T, Fukushima K, Fujita J, Kusakabe S, Yokota T, Shibayama H, Tomiyama Y, Kanakura Y.

Addition of Melphalan to Fludarabine/Busulfan (FLU/BU4/MEL) Provides Survival Benefit for Patients with Myeloid Malignancy Following Allogeneic Bone Marrow Transplantation/Peripheral Blood Stem Cell Transplantation.

The American Society of Hematology 60th Annual Meeting. 2018. San Diego, USA.

6. 土居 由貴子, 横田 貴史, 佐藤 友亮, 石橋 知彦, 数藤 孝雄, 上田 智朗, 新開 泰宏, 小澤 孝幸, 一井 倫子, 谷村 朗, 江副 幸子, 柴山 浩彦, Terumi Kohwi-Shigematsu, 織谷 健司, 金倉 讓

クロマチン構造制御蛋白 SATB1 はリンパ球分化における造血幹細胞の機能的ゆらぎに關与する

第 80 回日本血液学会学術集会 2018. 大阪国際会議場 大阪.

7. 小澤 孝幸, 横田 貴史, 新開 泰宏, 上田 智朗, 土居 由貴子, 柴山 浩彦, 金倉 讓

B 細胞免疫寛容における SATB1 蛋白の機能的意義について

第 80 回日本血液学会学術集会 2018. 大阪国際会議場 大阪.

8. 新開 泰宏, 横田 貴史, 小澤 孝幸, 上田 智朗, 土居 由貴子, 石橋 知彦, 数藤 孝雄, 谷村 朗, 一井 倫子, 江副 幸子, 柴山 浩彦, 金倉 讓

自分分泌/傍分泌サイトカインシグナル伝達を介した白血病幹細胞の自動的ゆらぎ

第 80 回日本血液学会学術集会 2018. 大阪国際会議場 大阪.

9. 長手 泰宏, 江副 幸子, 藤田 二郎, 横田 貴史, 一井 倫子, 谷村 朗, 濱中 有理, 土居 由貴子, 上田 智朗, 戸田 淳, 柴山 浩彦, 織谷 健司, 金倉 讓

ATLL 細胞は CD39 を高発現し、Adenosine 経路を介して免疫応答を抑制する

第 80 回日本血液学会学術集会 2018. 大阪国際会議場 大阪.

10. 頼 晋也, 田中 宏和, 鈴木 麻衣, Luis Espinoza, 谷村 朗, 森田 泰慶, 辰巳 陽一, 横田 貴史, 織谷 健司, 渡邊 俊雄, 金倉 讓, 松村 到

異常な RTK の細胞内輸送阻害は急性骨髄性白血病における有望な治療標的である

第 80 回日本血液学会学術集会 2018. 大阪国際会議場 大阪.

11. Ueda T, Yokota T, Shingai Y, Doi Y, Ishibashi T, Tanimura A, Ichii M, Ezoe S, Shibayama H, Oritani K, Kanakura Y.

Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule (ESAM) plays important roles in the adult-type hemoglobin synthesis during fetal erythropoiesis.

The American Society of Hematology 59th Annual Meeting. 2017. Atlanta, USA.

12. Shingai Y, Yokota T, Ueda T, Doi Y, Ishibashi T, Tanimura A, Ichii M, Ezoe S, Shibayama H, Oritani K, Kanakura Y.

Variable Expression Levels of the Hematopoietic Stem Cell Surface Antigen ESAM Depict Heterogeneity and Fluctuations in Leukemic Stem Cells.

The American Society of Hematology 59th Annual Meeting. 2017. Atlanta, USA.

13. 新開 泰宏, 横田 貴史, 上田 智朗, 土居 由貴子, 石橋 智彦, 谷村 朗, 一井 倫子, 江副 幸子, 柴山 浩彦, 織谷 健司, 金倉 讓

造血幹細胞表面抗原 ESAM を用いた白血病幹細胞の不均一性とゆらぎの解析
第 79 回日本血液学会学術集会 2017. 東京国際フォーラム 東京.

14. Doi Y, Yokota T, Ishibashi T, Satoh Y, Ichii M, Tanimura A, Ezoe S, Shibayama H, Oritani K, Kanakura Y.

SATB1 expression is useful to identify the lymphoid-lineage-biased trajectory of functionally fluctuating hematopoietic stem cells.

第 46 回日本免疫学会学術集会 2017. 仙台国際センター 宮城.

15. Sudo T, Yokota T, Kanakura Y, Ishii M.

Stressed microenvironment induced by 5-FU promotes the proliferation of HSPC in bone marrow.

第 46 回日本免疫学会学術集会 2017. 仙台国際センター 宮城.

〔図書〕(計 2 件)

1. 横田 貴史 「リンパ球造血に関する最近の知見」実験医学 35 巻・18 号 (2017 年 11 月発行) pp 3063-3070 羊土社

2. 横田 貴史・金倉 譲 「急性リンパ性白血病の遺伝子異常」血液内科 第 74 巻第 1 号 (2017 年 1 月発行) pp 103-108 科学評論社

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hematology.pro>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：横田 貴史

ローマ字氏名：YOKOTA, Takafumi

所属研究機関名：大阪大学

部局名：大学院医学系研究科

職名： 講師

研究者番号 (8 桁)：60403200

研究分担者氏名：土居 由貴子

ローマ字氏名：DOI, Yukiko

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学部附属病院

職名： 医員

研究者番号 (8 桁)：60722288

研究分担者氏名：織谷 健司

ローマ字氏名：ORITANI, Kenji

所属研究機関名：国際医療福祉大学

部局名：医学部

職名： 教授

研究者番号 (8 桁)：70324762

(2) 研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。