

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09952

研究課題名(和文)クロマチン構造調節蛋白SATB1によるリンパ球初期分化制御機構の解析

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：2016年度までの研究において作製したSATB1レポーターマウスを用い、造血幹細胞におけるSATB1発現強度別に検討した。発現強度上昇に正比例してリンパ球系分化の能力は高くなる一方で自己複製能力も保たれた。一つの造血幹細胞から自己複製した細胞集団のSATB1発現強度は、ドナー細胞のそれに関わらず多様であり、リンパ球に分化しやすい”lineage-biased”な造血幹細胞を、SATB1発現量を指標にして区分できることを示した。以上の研究成果は、学術雑誌Cell Reportsに論文掲載された(Doi et al. Cell Rep. 2018, 12;23(11):3223-3235.)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の身体は、造血幹細胞が自己複製能力と多分化能力の両方を備えているために、生涯にわたる造血を行うことができる。その二つは相反した性質であり、細胞内部の経時的な変化無くしては実現できないが、その仕組みは分かっていなかった。我々は、造血幹細胞のSATB1発現強度が高い際にはリンパ球系へ分化しやすく、かつ自己複製する過程において、SATB1発現強度の異なる、即ち分化能力の異なる遺伝子発現状態を取りうることを示した。このことは数学・物理学的な観点から計算によって示されており、我々の研究は、それを実際の生命現象を通して観察することに成功した。

研究成果の概要(英文)：SATB1 is involved in regulating HSC heterogeneity. HSCs from SATB1/Tomato-knock-in reporter mice were classified based on SATB1/Tomato intensity, with transplantation experiments revealing robust self-renewal as well as stronger differentiation toward the lymphoid lineage along with high SATB1 levels. Importantly, SATB1⁻ and SATB1⁺ HSCs were interconvertible upon serial transplantation, with SATB1⁺ HSCs showing higher reconstituting and lymphopoietic potentials in primary recipients relative to SATB1⁻ HSCs, whereas both HSCs exhibited equally efficient reconstituted lympho-hematopoiesis in secondary recipients. Single-cell-transplantation experiments also confirmed the HSC fluctuation at the clonal level by displaying diverse levels of SATB1 expression in individual reconstituted HSCs. These results suggest that SATB1 levels regulate the maintenance of HSC multipotency, with variations contributing to heterogeneity and fluctuation in the HSC population.

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

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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不可欠である。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た(Dickinson et al. Cell 1992, Alvarez et al. Genes Dev. 2000)。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などのクロマチン修飾蛋白や各種転写因子を引き寄せ、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(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示されていた。申請者らは、SATB1の発現が骨髄中の造血幹細胞においても認められ、系統分化に応じてその程度が変化することを見出した(Satoh & Yokota et al. Immunity 2013)。即ち、SATB1発現量は骨髄球系細胞においては低い一方、造血幹細胞から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、老化した造血幹細胞においても、そのリンパ球産生能力を部分的に回復させることができた。このことから、SATB1はリンパ球の初期分化過程において重要な役割を担うことが明らかとなった。

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を選択する機構については明らかでない。近年では力学的な観点から見た幹細胞内部の遺伝子発現の「ゆらぎ」が提唱されており、その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た(Furusawa et al. Science 2012)。即ち、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)。

申請者らは、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。そこで、平成26年度～平成28年度の研究において、SATB1発現量を生体内でモニタリングできるレポーターマウスを作製し、SATB1発現量と造血幹細胞のリンパ球分化能力の関係を検討した(Doi et al. Blood 2015)。高度に純化した造血幹細胞集団を、SATB1発現量に応じて細分画し機能解析を行うと、SATB1発現量が高い造血幹細胞分画は、低い分画に比べてリンパ球への分化能力が高く、骨髄球系への分化能力は低いことが判明した。

これまで胸腺細胞や腫瘍細胞において、SATB1が直接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)。しかしSATB1の標的遺伝子は細胞の系統・分化段階で異なるため、造血幹細胞からリンパ球系への初期分化が促進される過程において、SATB1がどのような遺伝子の発現を包括的に調節するのか、またそれが加齢の影響によりどのように変化するのかを精緻に解明することは、この分野の基礎的な研究の進展のみならず、造血幹細胞の老化に伴う免疫能低下に対する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期待された。

2. 研究の目的

SATB1発現レベルと造血幹細胞の分化・自己複製能力との関係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) タグ付加SATB1発現マウスの作製

FlagタグおよびBiotin化標識配列をSATB1蛋白N末端に有する遺伝子組み換えマウスを作製する。このマウスと、大腸菌由来Biotinリガーゼ(BirA)を恒常的に発現するマウスを交配することで、SATB1蛋白N末端にFlagペプチドとBiotinの二重タグを有するマウスを作製し解析する。

(2) SATB1発現レベルと調節を受ける遺伝子の変化の解析

Satb1-floxマウスをVav1遺伝子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することにより造血幹細胞特異的なSATB1欠損マウスを作製し、その造血幹細胞における変化を検討する。

(3) SATB1のリンパ球分化能力の維持と、造血幹細胞の老化における役割の解析

SATB1レポーターマウスを、48週齢を超えた老齢マウスと、7-8週齢程度の若齢マウスの2群に分離する。それぞれの骨髄より造血幹細胞を分取し、造血幹細胞の機能維持や系統分化能力に關与する遺伝子の発現量のばらつきについて検討する。

4. 研究成果

(1) タグ付加SATB1発現マウスの作製

6-8週齢のマウス骨髄のLin⁻Kit⁺細胞分画において、Flag タグおよびBiotin タグを標的としたWestern Blottingを行った。元々のSATB1発現量が少ないことから安定したbandの得られる条件設定に難航しており、今後数十匹の骨髄を合わせた解析を計画している。

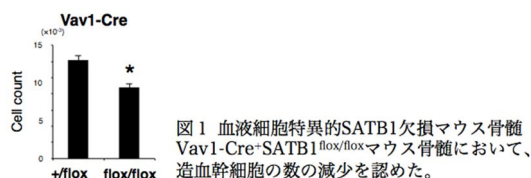


図1 血液細胞特異的SATB1欠損マウス骨髄 Vav1-Cre⁺SATB1^{flox/flox}マウス骨髄において、造血幹細胞の数の減少を認めた。

(2) SATB1発現レベルと調節を受ける遺伝子の変化の解析

Vav1-Cre⁺SATB1^{flox/flox}マウスを作製し、骨髄LSK CD150⁺Flt3⁻細胞の数を検討したところ、絶対数の減少を認めた(図1)。この結果は、平成26年度～平成28年度において検討した Tie2-Cre⁺SATB1^{flox/flox}マウスの結果と一致していた。研究計画の時点では、その造血幹細胞におけるリンパ球分化関連遺伝子の発現状態の変化を、野生型マウスを対照群としてRNA-sequenceにより解析する予定としていた。しかし、SATB1欠損マウスで自己免疫疾患の発症率が高いことが報告されている(Kondo M. et al., J. Immunol. 2016)ことから、成獣になってからの薬剤刺激などでCre発現を誘導できるようなマウスを導入後に検討を行うよう計画を修正し、現在Mx1-Creマウスを導入し解析を予定している。

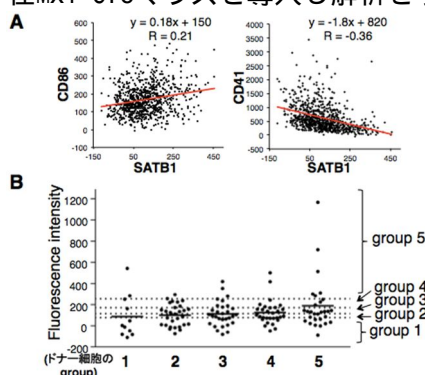


図2 SATB1発現強度と造血幹細胞機能の関係
A. 造血幹細胞の系統分化能力に關与する表面抗原の発現強度とSATB1-Tomato発現量をプロットした。SATB1発現強度が上昇するに従い、リンパ球分化能力は上昇した。
B. 造血幹細胞を、SATB1発現強度が低い方から高い方へgroup1-5に分類し、single cell移植4ヶ月後に解析した。レシビエント骨髄内で自己複製した造血幹細胞は、多様なSATB1発現量を示した。

(3) SATB1のリンパ球分化能力の維持と、造血幹細胞の老化における役割の解析

平成26年度～平成28年度の検討により、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ができること、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を示していた。これらの結果は、最低10個の造血幹細胞を用いた検討であったため、造血幹細胞の性質をより精緻に解析するため、単一の細胞についての検討を行うこととした。SATB1レポーターマウス骨髄からLSK CD150⁺Flt3⁻細胞を分取し、SATB1発現量とリンパ球系分化マーカー(CD86)、骨髄球系分化マーカー(CD41)の発現量をフローサイトメーターで解析したところ、SATB1発現強度が上昇するに従い、リンパ球分化能力は上昇し、骨髄球系への分化能力は低下した。(図2A)。また、LSK CD150⁺Flt3⁻細胞を、SATB1発現量の低い方から高い方へ、group1-5に分け、それぞれから1個ずつの造血幹細胞を採取して、致死量の放射線照射を行ったマウスに移植し、4ヶ月後に解析を行った。その結果、いずれのgroupの造血幹細胞から自己複製した造血幹細胞も、多様なSATB1発現強度を示した(図2B)。以上の結果は、平成26年度～平成28年度の研究成果と合わせて、論文掲載された(Cell Rep. 2018; 23(11): 3223-3235)。

次に、造血幹細胞が老化することと、その自己複製能力と分化能力を表す遺伝子の発現量のゆらぎの関係を検討することとした。野生型マウスのうち10週齢の若齢、86週齢の高齢の個体から造血幹細胞を採取し、その表面抗原の発現量をフローサイトメーターによって数値化し、

変動係数(標準偏差/平均)を算出した(図 3)。その結果、加齢により変動係数=ゆらぎの大きくなる遺伝子と小さくなる遺伝子があることが判明した。今後、造血幹細胞の本質に関わることの判明している内部遺伝子の発現量を計測するため、single-cell RNA-sequence などの手法を検討している。

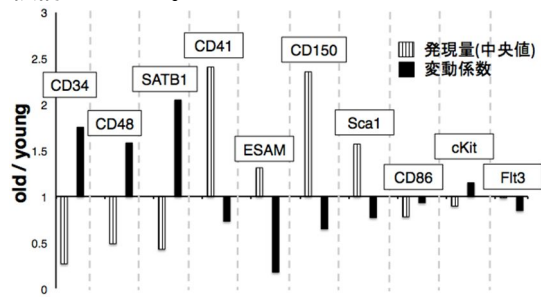


図3 老化による造血幹細胞の遺伝子発現のゆらぎの変化
 young(10週齢)、old(86週齢)の野生型マウス骨髄の造血幹細胞1個
 ずつの表面抗原の発現強度を、フローサイトメーターを用いて数値
 化した。その変動係数は、加齢によって増減する。
 (n=214,609(young), 185,536(old))

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|--------------------------|
| 1. 著者名 Yukiko Doi, Takafumi Yokota, Yusuke Satoh, Daisuke Okuzaki, Masahiro Tokunaga, Tomohiko Ishibashi, Takao Sudo, Tomoaki Ueda, Yasuhiro Shingai, Michiko Ichii, Akira Tanimura, Sachiko Ezoe, Hirohiko Shibayama, Terumi Kohwi-Shigematsu, Junji Takeda, Kenji Oritani, and Yuzuru Kanakura | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 Variable SATB1 Levels Regulate Hematopoietic Stem Cell Heterogeneity with Distinct Lineage Fate | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Cell Reports | 6. 最初と最後の頁 3223, 3235 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.05.042. | 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 横田 貴史 | 4. 巻 11月号 |
| 2. 論文標題 リンパ球造血に関する最近の知見 | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 実験医学 | 6. 最初と最後の頁 137 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| 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 - |

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yukiko Doi, Takafumi Yokota, Yusuke Satoh, Takao Sudo, Michiko Ichii, Sachiko Ezoe, Kenji Oritani, Terumi Kohwi-Shigematsu, Yuzuru Kanakura |
| 2. 発表標題 SATB1 expression is useful to identify the lymphoid-lineage-biased trajectory of functionally fluctuating hematopoietic stem cells. |
| 3. 学会等名 第46回日本免疫学会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Doi Y, Yokota T, Satoh Y, Ueda T, Shingai Y, Ichii M, Tanimura A, Ezoe S, Shibayama H, Oritani K, Kohwi-Shigematsu T, Kanakura Y |
| 2. 発表標題 Variable SATB1 levels confer hematopoietic stem cell heterogeneity with distinct lineage fate |
| 3. 学会等名 第15回幹細胞シンポジウム |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 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 |
| 2. 発表標題 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 |
| 3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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

| | 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 | 金倉 讓 (KANAKURA Yuzuru) (20177489) | 大阪大学・医学系研究科・教授 (14401) | |
| 研究分担者 | 横田 貴史 (YOKOTA Takafumi) (60403200) | 大阪大学・医学系研究科・講師 (14401) | |
| 連携研究者 | 竹田 潤二 (TAKEDA Junji) (50163407) | 大阪大学・医学系研究科・教授 (14401) | |