

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08842

研究課題名(和文) HMGA2によるがん特異的クロマチン・転写因子ネットワーク機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of cancer specific chromatin and transcriptional network by Hmga2

研究代表者

横溝 貴子 (Yokomizo, Takako)

熊本大学・国際先端医学研究機構・特定事業研究員

研究者番号：40636867

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Hmga2は休止期のない胎児造血幹細胞で強発現しており、胎児幹細胞の高い自己複製機能に必須の因子であるが、正常幹細胞及びMDS/MPN幹細胞における標的領域・遺伝子を含めたクロマチン制御機構は明らかではなかった。本研究により、Hmga2はストレス状況下において造血幹細胞を障害から守り、造血の維持と再生に寄与することを示した。Hmga2は成体の造血幹細胞において、外的ストレスや遺伝子変異による内的ストレスという様々な局面で新たな転写制御ネットワークを確立し、造血の維持と再生、そして病態発症へと寄与することを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Hmga2は胎児造血幹細胞の高い自己複製機能に必須の因子であるほか、骨髄異形成症候群(MDS)や急性骨髄性白血病(AML)においてがん遺伝子としての機能も示唆されている。本研究では、成体造血においてHmga2がストレス状況下で造血幹細胞を障害から守り、造血の維持と再生に寄与するという新たなHmga2の機能を示した。本研究成果は、老化造血幹細胞の若返りや、がん幹細胞の維持機構を理解する上で意義深いものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：High Mobility Group AT-hook 2 (HMGA2) is a chromatin modifier and the expression levels of Hmga2 were found to be markedly higher in fetal HSCs than in adult HSCs. Furthermore, overexpression of Hmga2 has been found in patients with myelodysplastic syndrome (MDS) and acute myeloid leukemia (AML). Although Hmga2 had been known to enhance the self-renewal capacity of HSCs, the molecular mechanism of how Hmga2 regulates chromatin complexes of normal HSC and MDS-stem cells is still unclear. In this study, we showed Hmga2 directly activated Igf2bp2 to enhance the self-renew of HSC, but also repressed the inflammatory response to protect HSC from damage in the stress condition. Hmga2 may regulate transcriptional program to maintain normal hematopoiesis and regeneration in the response to environmental stress.

研究分野：造血幹細胞

キーワード：Hmga2 造血幹細胞

1. 研究開始当初の背景

組織幹細胞は、個体発生や成体組織恒常性を維持するために自己複製能と多分化能があり、様々なストレスによって生じる組織障害を修復するために不可欠な細胞である。このため、組織幹細胞の自己複製と分化制御の破綻は、老化に伴う臓器障害やがん発症を引き起こすことが広く知られている。ただし、組織・個体の定常状態やストレス状態に応じて、どのように幹細胞がエピゲノム・転写因子ネットワークを制御して、幹細胞の自己複製と分化を決定するのかが未だ明白ではない。

造血は造血幹細胞と骨髄微小環境が様々な状況に応じ、相互に制御されることで精密に維持される。定常状態では造血幹細胞の多くは分裂を行わない静止状態にあるが、ストレスに暴露されると自己複製と分化を亢進し、速やかに造血を再構築する。しかし、定常状態やストレス状態に応じ、自己複製と分化の使い分けを制御する、造血幹細胞のエピゲノム制御機構および転写因子ネットワーク制御機構は明らかとなっていない。

クロマチン制御因子である Hmga2(High-mobility group AT-hook 2)は、休止期のない胎児造血幹細胞で強発現しており、その発現は *Lin28b-Let7-Hmga2* 経路によって制御されている。Hmga2 は生体レベルで欠損させると小人様表現形を生じるが(Xiang X, et al. Science 1990)、成体造血の明らかな障害はない。ただし、発生過程における Hmga1 による補正が否定できず、造血幹細胞特異的・時期特異的に Hmga2 欠損を誘導した研究が必要である。また、Hmga2 は胎児幹細胞の高い自己複製機能に必須の因子であるが、その標的遺伝子や分子基盤は未だ明白でなく、成体造血における機能も不明であった。

近年、健常高齢者において、骨髄異形成症候群(MDS)や慢性骨髄増殖性腫瘍(MPN)と同様に、*TET2* などエピゲノム制御遺伝子変異を持つクローナル造血・前がん状態が報告され、エピゲノム異常のがん発症過程における重要性が再認識されている(Xie M, et al. Nat Med 2014)。さらに、遺伝子変異に依存しないスーパーエンハンサー活性化と転写の異常亢進が、がん病態進展に重要であることが示され、エピゲノム制御機構やエンハンサー機能を標的としたがん治療が精力的に研究され始めている(Loven J, et al. Cell 2013)。ただし、こうしたクローナル造血とエピゲノム制御機構の破綻によるがん幹細胞の発生と病態進展の分子メカニズムは未だ明らかではない。申請者らはポリコム複合体因子である *Ezh2* 欠損 MDS/MPN マウスを用いた病態解析をもとに、*Ezh2* 機能欠損によって抑制性 H3K27me3 修飾が減少して、活性化 H3K27ac 修飾とエンハンサー機能の亢進によって、Hmga2 が著しく発現上昇して Myc 発現亢進を伴うとともに、がん病態を進展させることを報告している(Muto T, et al. J Exp Med 2013; Sashida G, et al. J Exp Med 2016)。HMGA2 は造血器腫瘍のみならず固形癌でも強発現しており、がん遺伝子として知られていたが、がん幹細胞における機能的役割は未だ明白でない。さらに、MDS/MPN 幹細胞における HMGA2 によるクロマチン制御・MYC を含めたがん遺伝子群の発現ネットワークの仕組みは不明である。

2. 研究の目的

本研究では、造血幹細胞特異的な Hmga2 発現を誘導できる新規マウス(*Rosa26 loxP-Stop-loxP Hmga2-HA-tagged IRES-GFP; enhancer of Runx1 (eR1) Cre-ERT2* マウス)を活用して、HMGA2 による正常造血幹細胞およびがん幹細胞のエピゲノム制御機構および転写因子ネットワーク制御機構を解明する。

3. 研究の方法

申請者は Hmga2 発現誘導可能な *Rosa26 loxP-Stop-loxP Hmga2-HA-tagged IRES-EGFP* コンディショナルノックインマウスを作製(熊本大学・荒木喜美博士との共同研究)し、造血幹細胞特異的に Cre を誘導できる *enhancer of Runx1 Cre-ERT2* マウス(eR1-Cre;シンガポール国立大学・大里元美博士供与)と交配して、Hmga2 KI:eR1-Cre マウスを得た。さらに、熊本大学・生命資源研究支援センター荒木喜美博士の協力のもと、Hmga2 flox/flox コンディショナルノックアウト(Hmga2 cKO)マウスの作製にも成功した。これらの新規マウスを活用することで、クロマチン領域特異的な HMGA2 による造血幹細胞の機能制御機構を詳細に解明した。また、Hmga2 発現による幹細胞機能の分子メカニズムを解明するために、造血幹細胞の遺伝子発現解析および ATAC-sequencing に加え、Hmga2 の ChIP-sequencing によって Hmga2 が直接結合するクロマチン領域を検証した。

4. 研究成果

Hmga2 は造血幹細胞に高発現するが、その中でも特に胎児期の造血幹細胞において発現が高い。Vav-Cre;Hmga2 cKO マウスによって Hmga2 を胎児期で欠損させると、成人期において中等度の血小板減少と軽度貧血を認めるとともに、造血幹細胞数が減少し増殖能も低下していた。このことから、Hmga2 の発現は胎児期において、造血幹細胞の量的・質的制御に重要であることが示唆された。Hmga2 cKO マウスの解析から、胎児期 Hmga2 欠損は定常状態では造血幹細胞数を減少させるものの、個体の生存には影響を及ぼさないことがわかった。続いて、造血幹細胞の増殖能および細胞分化能を競合的骨髄移植実験によって評価した。Hmga2 KI;eR1-Cre マウスでは、末梢血液において、リンパ球に比較して顆粒球・単球に有意な GFP 陽性細胞を認められた(CD45.2+GFP+)。また、全ての細胞系統において、コントロール eR1-Cre に比較して有意なキメリズムの増加をきたしており、造血幹細胞の自己複製能の亢進が証明された。また、野生型幹細胞は連続移植によって自己複製能を失ったが、Hmga2 KI 幹細胞は3次移植時においても高い自己複製能が維持されており、Hmga2 強発現によって幹細胞の自己複製能が維持・亢進されることがわかった。

Hmga2 KI マウスの造血幹細胞における RNA-seq、ATAC-seq、Hmga2-ChIP-seq によるオミックス解析を実施し、Hmga2 が近傍に結合しクロマチンを伸展させる標的遺伝子として Hmga1、Igf2bp2 などを見出した。現在までの解析では、プロモーター領域や遺伝子には結合が乏しく(1.8%)、イントロン(29%)やインタージェニック領域(68%)に有意な Hmga2 結合を認めた。一般的に、Hmga2 はリンカーヒストン H1 を競合的に阻害してゲノムワイドなクロマチン伸展を促進するが、領域特異的な制御機構は明白でない。モチーフ解析は予想通り AT リッチ配列で、核マトリクス結合蛋白 Arid と協調した直接的なクロマチン制御が示唆された。

また、成体造血幹細胞では、5-FU 抗癌剤投与によっても Hmga2 およびそのファミリー遺伝子の Hmga1 の発現レベルを一時的に上昇させることを明らかにした。野生型造血幹細胞と比較して、5-FU 投与後の Hmga2 KI 幹細胞は幹細胞数を増やすだけでなく、速やかな造血と骨髄組織の回復をもたらした。Hmga2 KI 造血幹細胞では野生型造血幹細胞に比して、5-FU 投与による炎症シグナルが顕著に抑制されていることが明らかとなった。炎症シグナルは造血幹細胞の自己複製能の減衰および分化促進に寄与することが知られており、Hmga2 はストレス状況下において造血幹細胞を障害から守り、造血の維持と再生に寄与することが示された。このように、Hmga2 は成体の造血幹細胞において、外的ストレスや遺伝子変異による内的ストレスという様々な局面で新たな転写制御ネットワークを確立し、造血の維持と再生、そして病態発症へと寄与することが示唆された。このように、移植や 5-FU といったストレス状況において、Hmga2 が幹細胞の対称性分裂を促進し、自己複製能を維持・亢進させることで、造血の維持と再生において重要な機能を持つことが強く示唆された。

一方、Tet2 欠損幹細胞に Hmga2 を発現誘導すると、分化障害と血球異形成を伴った MDS/MPN また AML を発症した。遺伝子発現解析では、Hmga2 発現 Tet2 欠損幹細胞において、強力ながん遺伝子 Myc の標的遺伝子群の有意な発現亢進が認められ、がん幹細胞特異的な転写制御ネットワークが確立することで MDS 発症が促進していた。Hmga2-ChIP-seq のデータから、Tet2 存在/非存在下では Hmga2 の結合領域が大きく変化しており、Tet2 欠損下では自己複製能の亢進及び骨髄球形細胞への分化が阻害されるようにリモデリングが起きていることが示された。

以上の研究結果より、Hmga2 は成体の造血幹細胞において、外的ストレスや遺伝子変異による内的ストレスという様々な局面で新たな転写制御ネットワークを確立し、造血の維持と再生、そして病態発症へと寄与することを示唆した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Bai Jie, Yokomizo-Nakano Takako, Kubota Sho, Sun Yuqi, Kanai Akinori, Imori Mihoko, Harada Hironori, Iwama Atsushi, Sashida Goro	4. 巻 40
2. 論文標題 Overexpression of Hmga2 activates Igf2bp2 and remodels transcriptional program of Tet2-deficient stem cells in myeloid transformation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 1531 ~ 1541
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-020-01629-w	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 -

1. 著者名 Sun Yuqi, Kubota Sho, Imori Mihoko, Hamashima Ai, Murakami Haruka, Bai Jie, Morii Mariko, Yokomizo-Nakano Takako, Osato Motomi, Araki Kimi, Sashida Goro	4. 巻 115
2. 論文標題 The acidic domain of Hmga2 and the domain's linker region are critical for driving self-renewal of hematopoietic stem cell	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 553 ~ 562
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-021-03274-9	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	白 潔 (Bai Jie) (60775336)	熊本大学・国際先端医学研究機構・外国人客員研究員 (17401)	

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