

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08705

研究課題名(和文)クロマチンループ因子CTCFによるヒト造血幹細胞静止期離脱機構の解明

研究課題名(英文) Study for the regulation of exit from quiescent self-renewing programs in human hematopoietic stem cells by chromatin looping factor, CTCF

研究代表者

高山 直也 (Takayama, Naoya)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：10584229

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)：長期造血幹細胞と自己複製能を消失した直後の短期造血幹細胞の差の検証は、自己複製能のメカニズム解明に重要である。本研究では、以下の点を明らかにした。HiC/ATAC/RNAシーケンス法による解析から、ヒト造血幹細胞の静止期から活動期への移行に伴いCTCFが結合するクロマチンループ、及び内包される遺伝子群を同定した。これらは転写抑制に働くクロマチンループであり、細胞周期、代謝、インターフェロニンシグナルなどに関連する遺伝子が内包されていた。これらの遺伝子群に着目して、IFN非依存的に維持されるインターフェロニンシグナルにより、幹細胞性を維持している可能性を示唆する結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高い自己複製能を持つ造血幹細胞は、造血幹細胞移植など再生医療へ広く応用可能であるが、深刻なドナー不足は解決の目処がたっていない。その解決策として、HSC固有の能力である自己複製機構を正しく理解し、自己複製能を維持したまま増幅できる培養系の確立が必要である。本研究では、ヒト造血幹細胞の自己複製能に直結する静止期離脱機構にCTCFを介したゲノムの3次元構造の変化が必須であること、さらにCTCFによる静止期離脱、増幅開始にインターフェロニンシグナルが重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Verification of the difference between long-term hematopoietic stem cells (HSC) and short-term hematopoietic stem cells immediately after losing self-renewal ability is important for elucidating the mechanism of self-renewal ability. In this study, we clarified the following points.(1) From analysis by HiC/ATAC/RNA sequencing, we identified chromatin loops to which CTCF binds and the genes involved in the transition from quiescent to active phases of human hematopoietic stem cells.(2) Most of these chromatin loops repress transcription, and contain genes related to cell cycle, metabolism, interferon signaling, etc.(3) Focusing on these genes, we obtained results that stemness is maintained by IFN-independent interferon signals.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：造血幹細胞 エピゲノム クロマチン 静止期制御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞 (hematopoietic stem cell:HSC) 移植は実用化されている再生医療の成功例であるが、深刻なドナー不足は解決の目処がたっていない。その解決策として、HSC 固有の能力である自己複製機構を正しく理解し、自己複製能を維持したまま増幅できる培養系の確立が必要である。

HSC の自己複製機構の先行研究では、遺伝子発現プロファイル解析に基づく解析データが蓄積されたが依然未解明な点も多く、長期間の安定した維持・増幅培養系の確立には至っていない。HSC と自己複製能を消失した多能性造血前駆細胞 (MultiPotent Progenitor:MPP) の違いは、申請者らが最近その詳細な差異を明らかにしており (Notta, Science 2011)、HSC のみが自己複製能を保持可能であることを担保した実験モデルとして非常に有用である。HSC から MPP、さらに様々な終末分化細胞までの分化下流の細胞同士を比較することで、自己複製能および各種細胞系譜への分化制御のメカニズムを知る手がかりを得ることが可能である。興味深いことに、臍帯血由来のヒト HSC (Lin-/CD34+/CD38-/CD45RA-/CD90+/CD49f+) と MPP (Lin-/CD34+/CD38-/CD45RA-/CD90-/CD49f-) の遺伝子発現解析では、明確な遺伝子発現の違いは得られなかった。一方、細胞周期に着目すると HSC や MPP の 90% 以上は静止期の細胞であり、細胞の性質を規定する重要な遺伝子が、定常状態では全て発現しているとは限らないと推察できる。以上の知見から、これらの細胞は何らかの刺激に対応して速やかに発現する準備段階であると考えられ、静止期の幹細胞には遺伝子発現解析では捉えられない重要な生命原理が存在するという仮説に至った。エピゲノム解析は、活性化のみならず準備段階であるゲノム領域を捉えることが可能であるため、本仮説の検証に最適である。

臍帯血由来の高純化細胞集団の ATAC-seq を実施したところ、10 数個のモチーフが HSC と MPP 以下の分化下流細胞を差別化する因子として同定された。このうち、CTCF の結合シーケンスが、Act-HPSC signature (造血幹細胞では開いておらず、MPP 以降の早期前駆細胞で開いているクロマチン領域) に多数存在することを同定した。CTCF は HSC から、早期の MPP への移行に重要な因子であることが予想されたため、Sh RNA 法を用いて抑制したところ、コントロールと比較して、CTCF-knockdown (KD) では、すべての分化細胞の産生が減少すること、造血幹細胞 (HSC) の G0 期が増加することを証明した。興味深いことに、より分化段階が進んだ (多能性造血前駆細胞; MPP や CD34+/CD38+) 造血前駆細胞段階で CTCF の発現抑制を行っても、細胞周期にはほとんど影響が見られず、CTCF の役割は、造血幹細胞が G0 静止期から脱出する過程で重要なゲートキーパー因子であることが明らかになった。CTCF は分化開始を促進する重要な“ハブ遺伝子”として働いていると考えられるが、一方、これらターゲットの遺伝子がどのように G0 期離脱を行うかは明らかになっていない。

2. 研究の目的

これらの予備データから、HSC の静止期からの脱出および分化開始に CTCF が必須の遺伝子であることが明らかになった。CTCF は Cohesin 因子と協調し、クロマチンの 3 次元構造を形成し、Enhancer と Promoter の距離を変化させることで、ゲノムワイドに遺伝子発現を調節する重要な因子である。しかし、造血系における CTCF の役割は詳細に解析されておらず、また、今回申請者が捉えた、幹細胞の静止期からの脱出機構に関与するという事実は知

られていない。

そこで本研究では、以下の点を明らかにし、造血幹細胞の自己複製機構を人為的に制御する‘作用点’の候補を見出し、将来的な造血幹細胞の体外増幅の可能性を検証する。

- (1) HiC によるクロマチンループの詳細な解析
- (2) CTCF による幹細胞特異的な静止期脱出制御機構の解明
- (3) 造血幹細胞の静止期離脱における CTCF と協調する因子の同定

3. 研究の方法

- (1) CTCF による ChIP、および、Chromatin conformation capture 法、CTCF 抑制後の RNA sequence による遺伝子発現解析により、CTCF のターゲット因子を同定する。
- (2) で同定された候補遺伝子の改変実験により、CTCF の下流の自己複製制御経路、因子の同定を目指す。

4. 研究成果

- (1) HiC の結果、LT-HSC と ST-HSC の間には、明確な TAD (Topologically Associated Domain) の変化は観察されなかった。一方、現状の少数の細胞を用いた HiC では、TAD の観察までが限界であった。さらに解像度を上げたクロマチンループを観察するために、白血病細胞株である OCI-AML2 での HiC データを取得し、比較したところ、LT-HSC から ST-HSC へと分化に伴い開いていく領域では 351 個の CTCF が結合するクロマチンループが同定され、そのループ内には 412 個の遺伝子が内包されていた。興味深いことにこれらのループ内の遺伝子のほとんどが、LT-HSC から ST-HSC の分化に伴い、発現が抑制されることから、同定した 351 個の CTCF ループは転写抑制に働くクロマチンループであることが分かった。またこれらのループに内包される遺伝子は、従来報告されてきた幹細胞制御経路である、細胞周期、アポトーシス、代謝、インターフェロンシグナルなどに関連する遺伝子であった。これらのデータを基に論文を投稿し、受理された (Takayama et., al, Cell Stem Cell 2021)
- (2) 上記経路のうち、インターフェロンシグナルに着目して、研究を進めた。インターフェロンは、長期の刺激で幹細胞を枯渇させる幹細胞に対して負の制御因子として知られている。一方、近年、マウス造血幹細胞の胎生型から成体型への移行に、胎生期の皮膚線維芽細胞から放出されるインターフェロンガンマによる教育が重要であることが明らかにされ、従来報告されてきた幹細胞性への負の制御以外の側面も報告され、注目を集めた (Li Y., Cell Stem Cell 2020)。さらに、King らのグループは、DNMT3A 変異を持つ造血幹細胞の Clonal Hematopoiesis (ガン化前段階と考えられる造血幹細胞のクローン性増殖) が生じる機序として、DNMT3A 変異により、骨髄球系への分化を促す Batf2, Jun, Fos などの骨髄球分化を促進する転写因子のプロモーター部位の DNA メチル化上昇、mRNA 発現が抑制されることを見出した。インターフェロンからのシグナルは、増殖の促進と骨髄球系への分化を促進するが、上記 DNMT の変異により、骨髄球系への分化促進因子群の遺伝子が上昇しないため分化が抑制された結果、造血幹細胞レベルでの増幅が生じることが原因であるという報告がなされた (Hormaechea-Agulla D,

Cell Stem Cell2021)。 以上の様にインターフェロンシグナルについての造血幹細胞制御機構については、新たな局面を迎えており、より詳細な解析が必要である。申請者らは、本研究と並行して、造血支持細胞を用いた骨髓環境模倣によるヒト造血幹・前駆細胞の体外増幅を目指し、研究を推進している。この過程で、ヒト造血幹細胞は、従来の造血幹細胞能力を維持できない培養条件では、インターフェロンシグナル遺伝子群が低下していること、MSC との共培養により造血幹細胞能力を維持・増強した培養条件では、相関してインターフェロンシグナル遺伝子群が上昇していることを確認している。これらの結果から、Li らのグループと同様、インターフェロンシグナルが幹細胞性に正の制御を与えている可能性が示唆された。

- (3) さらに、興味深いことに臍帯血由来造血幹細胞分画は、培養前の静止期の状態でもインターフェロンシグナル遺伝子群が高発現していたため、何らかの幹細胞特異的な機能が疑われた。そこで、主要な分子である IRF3/7 に対し、shRNA 遺伝子抑制を行い、FACS による表面マーカー解析を行った。ノックダウンにより、造血幹細胞分画の強い増殖抑制が観察される一方、CD34 陽性の造血前駆細胞やさらに分化した集団への影響は限定的であり、幹細胞特異的な機能が示唆された。一方、リコンビナント IFN タンパクを複数濃度で添加しても幹細胞集団の増幅は見られず、むしろ高濃度で減少するという結果であった。以上から、臍帯血由来造血幹細胞は、IFN 非依存的に維持されるインターフェロンシグナルにより、幹細胞性を維持している可能性が示唆された。これらの結果は、本年の日本血液学会で発表予定である。現在、長期骨髓再構築能の評価を計画している。

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 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Masamitsu Sone, Sou Nakamura, Koji Eto, and Naoya Takayama (corresponding author) et al.	4. 巻 16
2. 論文標題 Silencing of p53 and CDKN1A establishes sustainable immortalized megakaryocyte progenitor cells from human iPSCs.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports.	6. 最初と最後の頁 2861-2870
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2021.11.001. Epub 2021 Dec 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 -

1. 著者名 Naoya Takayama, et al	4. 巻 28
2. 論文標題 The transition from quiescent to activated states in human hematopoietic stem cells is governed by dynamic 3D genome reorganization.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 488-501
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stem.2020.11.001.	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

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高山 直也
2. 発表標題 前駆細胞リプログラミングによる細胞の不老化技術の確立と 人工骨髄への応用
3. 学会等名 第22回 日本再生医療学会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 高山 直也	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 137
3. 書名 実験医学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

ヒト造血幹細胞による幹細胞制御機構の分子メカニズムが明らかに https://www.jiji.com/jc/article?k=00000475.000015177&g=prt	難治性血液疾患の発症機序の解明へ期待
ヒト造血幹細胞による幹細胞制御機構の分子メカニズムが明らかに https://www.asahi.com/and_M/pressrelease/pre_25519906/	難治性血液疾患の発症機序の解明へ期待
ヒト造血幹細胞による幹細胞制御機構の分子メカニズムが明らかに https://www.fnn.jp/articles/-/160608	難治性血液疾患の発症機序の解明へ期待

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	大島 基彦 (Oshima Motohiko) (70506287)	東京大学・医科学研究所・助教 (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
---------	---------