

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：12501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22618

研究課題名(和文)炎症性老化をもたらす造血幹細胞のエピジェネティック変化とその誘導因子の解明

研究課題名(英文)Unveiling epigenetic alteration during aging of hematopoietic stem cells and its inducing factors contributing to the inflammaging

研究代表者

中西 未央(Nakanishi, Mio)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：70534353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は全身の炎症性老化の原因となる造血幹細胞老化(HSC)の内在性メカニズム解明を目的として、少数細胞をもちいた新規エピジェネティクス解析法を確立し、これをもちいてHSCの活性型および抑制型ヒストン修飾・クロマチン高次構造調節因子の局在の加齢に伴う変化を網羅的に解析した。その結果、リンパ球の分化抑制・骨髄球への分化亢進・HSC増加などの老化HSCの特徴と関連する遺伝子のヒストン修飾状態の変化が検出された。さらに若齢HSCでbasalレベルに発現する分化関連転写因子が老化にともない発現低下し、領域特異的なエピジェネティック変化を引き起こした可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、従来の1/1000の細胞数での解析を可能にする新規解析法を確立する事により、組織幹細胞のような希少細胞におけるクロマチン変化の網羅的解析を可能にした。これによって老化HSCの特徴であるミエロイド球への分化の偏り・細胞死減少と関連する遺伝子における活性型ヒストンの増加など、先行研究では検出できなかった幹細胞老化をもたらす主要な原因としてのHSCの領域特異的なエピジェネティック変化を明らかにした。さらにこのような変化を抑止する潜在的なターゲットとして複数の分化関連転写因子を同定した。本研究の成果は将来の組織幹細胞をターゲットとした抗老化医療へと道を拓くものである。

研究成果の概要(英文)：This study has aimed to unveil mechanisms underlying aging of hematopoietic stem cells (HSCs) that is mainly contributing to the inflammaging. To this end, I established new assay for epigenetic analysis and analyzed age-dependending change in genome-wide localization of active- and repressive histone marks and regulators of higher-order chromatin structure. As a result, I found changes in histone modifications occurred specifically in genes related to aged HSC phenotypes (e.g. myeloid bias and increased HSC number). Furthermore, the results implied a link between these specific epigenetic alterations and differentiation-related transcription factors whose expression levels are decreased from basal to undetectable levels during HSC aging. These achievements in this study open a path to future anti-aging medicine targeting somatic stem cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：幹細胞老化 分化バイアス クロマチン解析 次世代シーケンシング

## 1. 研究開始当初の背景

全身における慢性的な炎症は個体の老化や様々な加齢関連疾患進行の主要なプロセスと考えられている。加齢による慢性炎症の惹起は内分泌系・代謝の変化や各組織細胞・微小環境の変化に加えて、骨髄由来の炎症性免疫細胞の全身における増加が原因となると考えられている。このことは、HSC 老化による炎症性免疫細胞への分化亢進が、全身の炎症性老化の引き金となる事を強く示唆している。

このような全身の老化における中心的役割にもかかわらず、HSC 老化の内在性メカニズムは不明である。老化 HSC では炎症性免疫細胞への分化が亢進する一方、ミエロイド系に分化能が限定された細胞が増加する (右図)。この分化能低下は若齢マウス骨髄に移植しても回復せず、(*Cell Stem Cell* 22 600)、1 細胞遺伝子発現プロファイルでは大きな変化が見られない(*Nat Cell Biol* 21 1309)。これらの結果から、細胞微小環境や遺伝子発現よりもエピジェネティックな変化が HSC 老化をつかさどっていることが推測される。

しかし従来のエピジェネティクス解析は、必要細胞数等の技術的制約から分化能や老化応答における HSC の不均一性を考慮せず単一の細胞集団とみなして解析し、結果として炎症性老化を誘導するエピジェネティック変化を同定するに至らなかった(*Cell Stem Cell* 14 673)。そこで本研究では高感度・網羅的な新規エピジェネティクス解析法を開発し、これを利用して「全身の炎症性老化の原因となる HSC 老化はどのようなエピジェネティック変化に因るのか? それを誘導する老化ドライバーは何か?」という問いを解決する。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は全身の炎症性老化の原因となる造血幹細胞 (HSC) 老化の知られざる内在性メカニズムを解明し、その誘導因子を明らかにすることである。そのために本研究では (1) 1 細胞レベルでヒストン修飾領域を解析する新規解析法を開発する。そして (2) HSC に含まれる分化能・老化応答の異なる各細胞のエピジェネティック変化を識別して解析する事で、従来の解析では捉えられなかった炎症性老化をもたらす HSC 老化機序を明らかにする。さらに (3) このような変化誘導の鍵となる転写因子 (老化ドライバー) を同定する。

## 3. 研究の方法

(1) 【高感度エピジェネティクス解析法の検討】: 最初に、HSC にふくまれる分化能・老化応答が異なる各分画のエピジェネティクス解析を可能にするため、少数細胞をもちいたヒストン修飾領域の高感度解析法を開発した。

(2) 【炎症性免疫細胞への分化亢進をもたらす HSC 老化のエピジェネティクスの解析】: 次に前項で開発した新規解析法をもちいて、老化 HSC のエピジェネティック変化を解析した。若齢 (2~3 ヶ月齢)・老齢マウス (24 ヶ月齢) から分離した造血幹細胞の活性型 (H3K4me1、H3K4me3、H3K27ac) および抑制型 (H3K47me3) ヒストン修飾およびクロマチン高次構造調節因子の局在をゲノムワイドに解析し、それぞれについて若齢・老齢間での比較をおこなった。解析にあたって特にトランスクリプトーム解析では検出できない遺伝子発現の"待機状態" (活性型・抑制型ヒストン修飾の共局在) の局在変化が老化 HSC で起きているか検証した。

(3) 【全身の炎症性老化の引き金となる HSC 老化ドライバーの探索】: 前項のエピジェネティック解析の結果をもとに HSC 老化を誘導する因子 (老化ドライバー) を探索した。HSC 老化にともなって特徴的なヒストン修飾状態 (前項参照) が現れたゲノム領域から、これを制御する転写因子を ChIP データベースをもとにした推測プログラムにより予測した。次に予測された HSC 老化ドライバー候補を、若齢/老齢マウス HSC における発現量とゲノム結合領域をもとに絞り込んだ。これらのアプローチにより、老化 HSC でのエピジェネティック変化を引き起こし、炎症性老化の引き金となる老化ドライバー探索を試みた。

## 4. 研究成果

(1) 【高感度エピジェネティクス解析法の確立】 CUT-and-RUN 法 (*Nat Protoc* 13 1006) をベースとして、脾臓由来単球および骨髄由来マクロファージを使用した予備実験により抜本的な改良をおこない、従来法 (クロマチン免疫沈降法) 1/1000 の細胞数で同等のシグナルを得ることに成功した。

(2) 【老化 HSC における領域特異的なヒストン修飾状態変化の解明】 まず遺伝子のエンハンサー領域におけるヒストン修飾状態の変化に注目して解析をおこなったところ、リンパ球分

化に関連する遺伝子上流のエンハンサー領域において活性型ヒストン修飾の減少が観察された。これに対して、ミエロイド球分化およびアポトーシス抑制に関連する遺伝子のエンハンサー領域においては活性型ヒストンの増加がみられた。

次に遺伝子のプロモーター領域におけるヒストン修飾状態の変化を解析した。老化 HSC においてのみみられる活性型プロモーターマーカー H3K4me3 ピークの殆どはプロモーター領域外にあったことから、老化による特異的に活性化するプロモーターは非常に少数であった。これに対して、多くの酸化ストレス応答およびアポトーシス関連遺伝子のプロモーターにおいて、老化による活性型ヒストン修飾の減少がみられた。

リンパ球への分化能減少とミエロイド球への分化の偏りは老化 HSC の代表的な特徴である。さらに老化 HSC におけるアポトーシスの減少も示唆されている (*Nat Cell Biol* 20 413)。以上のことから、本研究開始当初の推測どおり、老化 HSC の多様な表現型をうみだす内在メカニズムとして、エピゲノム変化とくにヒストン修飾状態の変化がある事が強く示唆された。

(2) 【老化 HSC における bivalent ヒストン修飾の変化の解明】次にトランスクリプトーム解析では検出できない遺伝子発現の "待機状態" (活性型・抑制型ヒストン修飾の共局在; bivalent 修飾) の局在変化を調べた。若齢と老齢双方の HSC において共通する (老化によって変化しない) bivalent 修飾は多くが幹細胞増殖抑制やレチノイン酸シグナル関連遺伝子 (*Cell* 169 807) など HSC の静的状態の維持に関連する遺伝子のプロモーター領域において観察された。これに対して、老化によって待機状態が解除 (殆どは活性型 H3K4me3 喪失による解除) は古典的 Wnt シグナル関連遺伝子のプロモーターで多く見られた。興味深いことに HSC 老化にしたがって古典的 Wnt シグナルから非古典的 Wnt シグナルへの切り替えがみられることが近年報告されており (*Nature* 503 392) 本研究の結果は HSC 老化に重要なシグナル経路の変化の基盤としてヒストン修飾状態の変化がある事を強く示唆するものである。

(3) 【HSC 老化ドライバーの予測】HSC 老化にともなって特徴的なヒストン修飾状態 (前項参照) が現れたゲノム領域から、これを制御する転写因子を ChIP データベースをもとにした推測プログラムにより予測した。次に予測された HSC 老化ドライバー候補を、若齢/老齢マウス HSC における発現量をもとに絞り込んだ。その結果、SpiC や Runx2、Ebf3、Gata1 など複数の分化関連転写因子の発現が老化 HSC において消失し、かつこれらの転写因子の結合領域周辺において、老化にともなって活性型ヒストン修飾が喪失する事を見出した。この結果は若齢 HSC におけるこれら分化関連転写因子の basal な発現が、エピジェネティック修飾の維持に必要である可能性を示唆する。今後、これらの転写因子のノックダウンによる HSC のエピジェネティック維持および機能維持に与える影響を解析して検証をおこない、老化抑止のための潜在的なターゲット分子となる可能性を追求する。

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 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Orlando Luca, Tanasijevic Borko, Nakanishi Mio, Reid Jennifer C., Garcia-Rodriguez Juan L., Chauhan Kapil Dev, Porras Deanna P., Aslostovar Lili, Lu Justin D., Shapovalova Zoya, Mitchell Ryan R., Boyd Allison L., Bhatia Mickie	4. 巻 34
2. 論文標題 Phosphorylation state of the histone variant H2A.X controls human stem and progenitor cell fate decisions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108818 ~ 108818
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2021.108818	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 Aslostovar Lili, Boyd Allison L., Benoit Yannick D., Di Lu Justin, Garcia Rodriguez Juan Luis, Nakanishi Mio, Porras Deanna P., Reid Jennifer C., Mitchell Ryan R., Leber Brian, Xenocostas Anargyros, Foley Ronan, Bhatia Mickie	4. 巻 2
2. 論文標題 Abnormal dopamine receptor signaling allows selective therapeutic targeting of neoplastic progenitors in AML patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports Medicine	6. 最初と最後の頁 100202 ~ 100202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xcrm.2021.100202	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

中西 未央(Mio Nakanishi) - researchmap <a href="https://researchmap.jp/mio_nakanishi">https://researchmap.jp/mio_nakanishi</a>
---

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

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			
カナダ	McMaster University	Ottawa University	University of Western Ontario	