

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06011

研究課題名（和文）多層的なクロマチン構造破綻による造血幹細胞老化メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanism Underlying Hematopoietic Stem Cell Aging via the Disruption of Multilayered Chromatin Structure

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） 3,200,000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を目的とした。この目的達成のために本研究では従来より高感度なエピジェネティック修飾解析法をもちいて、各若齢・老齢マウス個体から得られた造血幹細胞を解析し、造血幹細胞老化の主要な特徴である特定の細胞系譜への分化の偏り（ミエロイドバイアス）・休止維持・変異細胞の生存がそれぞれエピジェネティックな変化を基盤として引き起こされていることを示す結果を得た。さらに本研究は造血幹細胞において低レベルに発現する複数の血球分化関連転写因子の加齢にともなう発現消失との関連を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では造血幹細胞老化の主要な特徴である分化の偏り（ミエロイドバイアス）や休止維持・変異細胞の生存がエピジェネティック変化を基盤とすることを示した。さらにこのようなエピジェネティック変化と分化制御転写因子との関連を示唆した。これらは将来的な抗老化医療の重要なターゲットをもたらすものである。今後本研究の成果を基盤として、さらに多細胞間の造血レジリエンス制御変容を理解することにより、未知の老化メカニズム解明が進むことが強く期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate the unknown intrinsic mechanisms of aging in hematopoietic stem cells (HSCs) that cause systemic inflammatory aging and to identify its inducers. To achieve this, the research employed a highly sensitive epigenetic modification analysis method to examine HSCs from young and old mice. It found that key characteristics of HSC aging, such as differentiation bias towards certain cell lineages (myeloid bias), maintenance of quiescence, and the survival of mutated cells, are all underpinned by epigenetic changes. Additionally, the study demonstrated the association between the loss of expression of several blood differentiation-related transcription factors and aging in HSCs.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：老化 造血幹細胞 分化バイアス 休止 エピジェネティクス アポトーシス

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。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、解明をこころみた。

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 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。この目的達成のために本研究では(1) 稀少な組織幹細胞のヒストン修飾領域を解析する新規解析法を検討する。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樹立した。CUT-and-RUN 法(Nat Protoc 13 1006)をベースとした条件検討により、従来法(クロマチン免疫沈降法)の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) 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を解明す

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明らかにした。特に以下の点に注目して解析をおこなった。まず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同在)が老化 HSC の炎症関連遺伝子プロモーター/エンハンサーで起きているか検証した。第二に研究代表者らは最近1細胞 RNA-seq 解析によって、老化 HSC 由来の炎症性免疫細胞で特異的に発現抑制される転写因子群を見出した。これらの転写因子の老化 HSC でのヒストン修飾状態を解析し、分化に沿った遺伝子発現プログラムの不全の分子基盤の解明をこころみた。

(3) HSC 老化ドライバーの同定

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)を同定をこころみた。具体的には HSC 老化にともなって特徴的なヒストン修飾状態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(Genome Biol 21 32)。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(新規解析法で同定)をもとに絞込んだ。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同定をこころみた。

4. 研究成果

最初に造血幹細胞老化にともなう各遺伝子エンハンサー領域のヒストン修飾状態変化に着目して解析をおこなった。その結果、リンパ球分化およびその機能活性化に関連する遺伝子(サイトカイン応答、リンパ球活性化制御など)のエンハンサー領域において、加齢にともない活性化ヒストン修飾 H3K4me1, H3K27ac がともに顕著に低下していることを明らかにした(図1)。

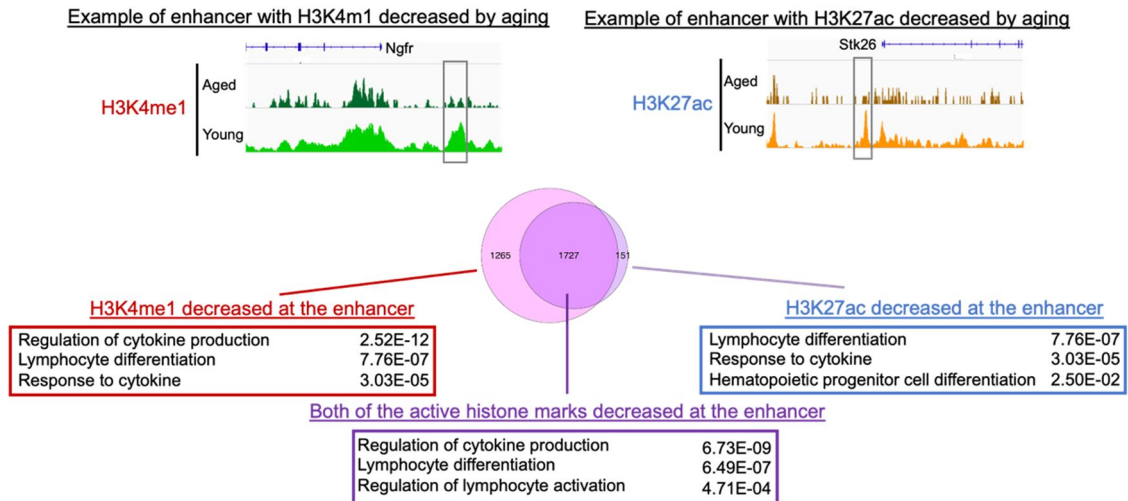


図 1 : 加齢によるリンパ球分化関連遺伝子エンハンサーの活性化ヒストン喪失

さらにこれとは対照的に、リンパ球分化の負の制御遺伝子およびミエロイド分化関連遺伝子のエンハンサー領域においては H3K4me1 および H3K27ac の顕著な増加が見出された (図 2)。これらの結果は老化造血幹細胞における分化プログラムの異常 (ミエロイドバイアス) とヒストン修飾の特異的变化の関連を明確に示したものである。これらの分化関連遺伝子にくわえて、アポトーシスの負の制御遺伝子のエンハンサー領域においても活性化ヒストン修飾の顕著な増加が見出された (図 2)。先行研究において、アポトーシス開始の抑制が、加齢にともない DNA 損傷を受けた造血幹細胞の生存に関与していることが報告されている (文献 3)。われわれの結果は加齢によるヒストン修飾制御の変化によってこのようなアポトーシス抑制が生じ、結果として DNA 損傷を受けた幹細胞の生存を助けている可能性を示唆する。

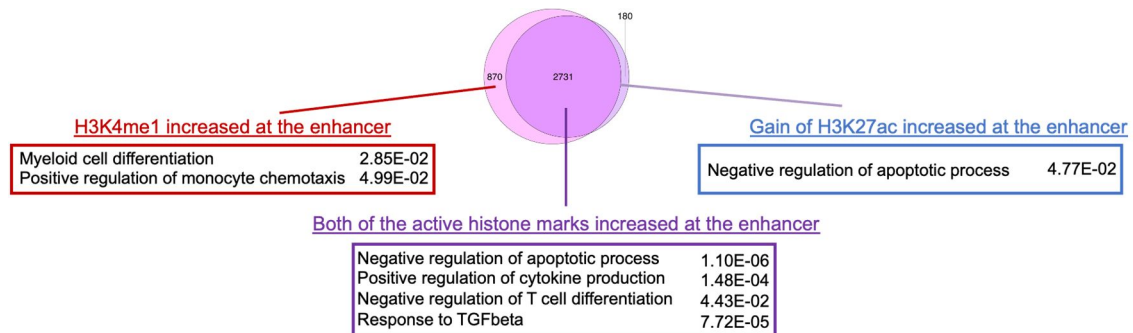


図 2 : 加齢による骨髓球分化・アポトーシス抑制関連遺伝子エンハンサーの活性化ヒストン獲得

次に加齢にともなう各遺伝子のプロモーター領域における活性化ヒストン修飾 (H3K4me3, H3K27ac) の変化を探索した。プロモーター活性化を標識するヒストン修飾である H3K4me3 は加齢により一部領域で増加が観察されたが、その 95%以上がプロモーター領域外で生じていた。一方、アポトーシスの正の制御遺伝子および酸化ストレス応答、オートファジー制御関連遺伝子のプロモーター領域において、老化による活性化ヒストン (H3K4me3, H3K27ac) の喪失がみられた (図 3)。上述のアポトーシス抑制と幹細胞老化の関連に加えて、実験的に酸化ストレス応答制御およびオートファジー制御を抑制したマウスでは造血幹細胞老化プロセスの亢進が報告されている (文献 4,5)。われわれの結果はこれら広範な造血幹細胞老化メカニズムの基盤としてヒストン修飾状態の変化、特に活性化ヒストン減少が働いていることを強く示唆する。

Example of promoter with H3K4me3 decreased by aging Example of promoter with H3K27ac decreased by aging

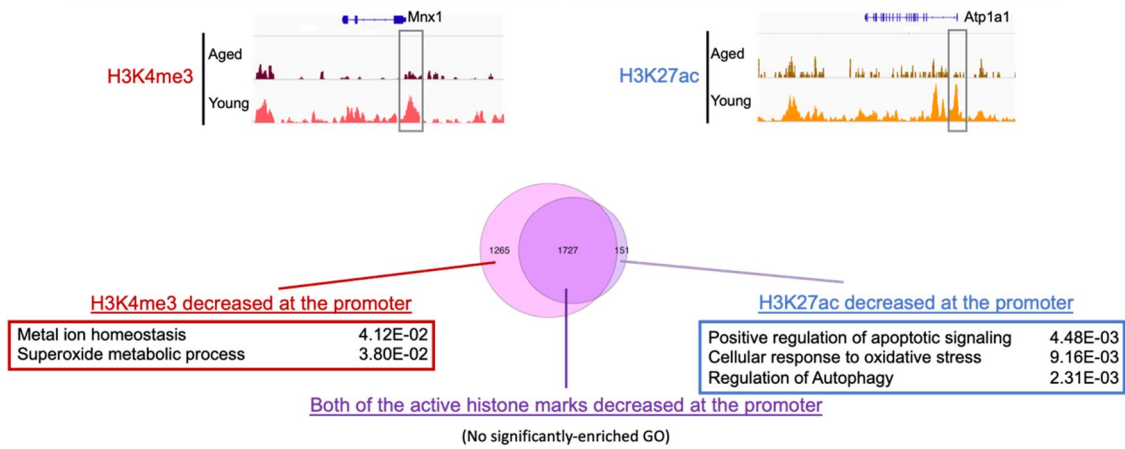


図3：加齢によるアポトーシス促進・酸化ストレス応答・オートファジー制御関連遺伝子プロモーターにおける活性化ヒストン喪失

遺伝子プロモーター領域で活性型ヒストン修飾(H3K4me3)と抑制型ヒストン修飾(H3K27me3)が共局在し遺伝子発現を「待機状態」におく、いわゆる bivalent 修飾は多能性幹細胞で見出され、造血幹細胞においても比較的少数のゲノム領域において bivalent 修飾が見られることが報告されていた(文献6)。そこで加齢によるこれら bivalent 修飾の変化を調べたところ、古典的 Wnt シグナルやレチノイン酸シグナルを含む造血幹細胞休止の制御遺伝子(文献7,8)のプロモーター領域において bivalent 修飾がみられた(図4)。このうち古典的 Wnt シグナル関連遺伝子プロモーター領域においては加齢とともに抑制型ヒストンが失われることが見出された。造血幹細胞の休止抑制は分化バイアスとならぶ造血幹細胞老化の主要な兆候であるが、われわれの結果から休止制御について、その主要な制御(休止誘導)シグナルが bivalent 修飾による発現待機状態にあること、および加齢によりこれらの bivalent 修飾部位の一部から抑制性ヒストンが喪失することが、造血幹細胞の無秩序な増殖の引き金になることが示唆された。

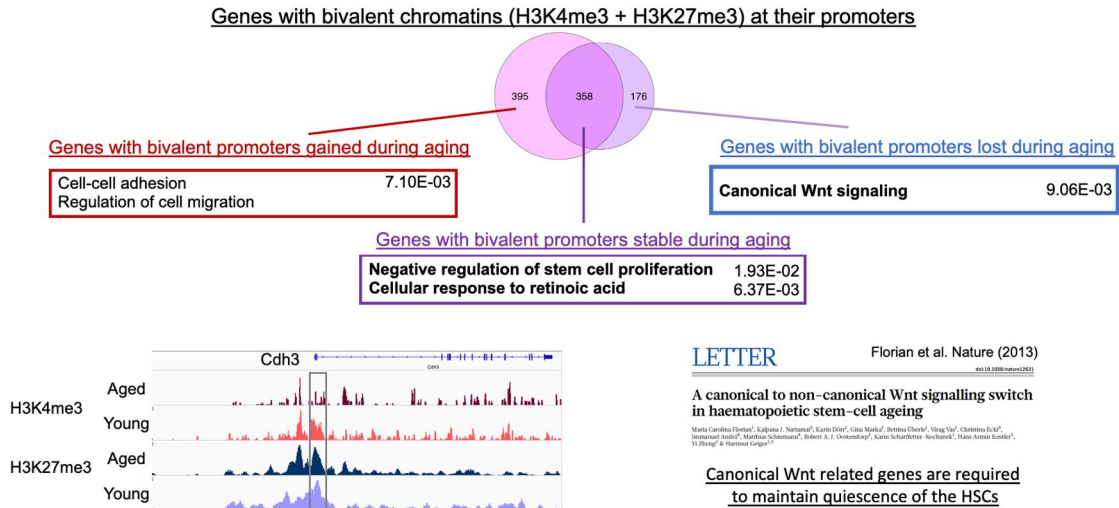


図4：幹細胞増殖抑制関連遺伝子プロモーターにおける bivalent 修飾と、加齢による抑制型ヒストン喪失

以上述べたように、本研究では従来より高感度なエピジェネティック修飾解析法をもちいて、各若齢・老齢マウス個体から得られた造血幹細胞を解析することにより、造血幹細胞老化における主要な分化・休止維持・生存プログラムの変容がエピジェネティックな変化を基盤として引き起こされていることを示唆する結果を得た。本研究ではさらに造血幹細胞において低レベルに発現する複数の血球分化関連転写因子の加齢にともなう発現消失と、ヒストン修飾状態変化との関連を示唆する結果を得ている。これらの転写因子が幹細胞老化抑制の鍵となっている可能性の追求、さらには多細胞間の相互制御にもとづいた造血レジリエンスの変容を理解することにより、今後 本研究成果を基盤とした未知の老化メカニズムの解明が進むことが強く期待される。

【引用文献】

- 1) Kuribayashi W et al. *J Exp Med* (2021) 218(3):e20192283. doi: 10.1084/jem.20192283.
- 2) Meers MP et al. *Elife* (2019) 8:e46314. doi: 10.7554/eLife.46314.
- 3) Gutierrez-Martinez P et al. *Nat Cell Biol* (2018) 20(4):413-421. doi: 10.1038/s41556-018-0054-y.
- 4) Ito K et al. *Nature* (2004) 431(7011):997-1002. doi: 10.1038/nature02989.
- 5) Dong S et al. *Nature* (2021) 591(7848):117-123. doi: 10.1038/s41586-020-03129-z
- 6) Oguro H et al. *Cell Stem Cell* (2010) 6(3):279-86. doi: 10.1016/j.stem.2010.01.005.
- 7) Florizn MC et al. *Nature* (2013) 503 (7476):392-6. doi: 10.1038/nature12631.
- 8) Cabezas-Wallscheid et al. *Cell* (2017) 169(5):807-823. doi: 10.1016/j.cell.2017.04.018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Vojnits Kinga, Nakanishi Mio, Porras Deanna, Kim Yeonjoon, Feng Zhuohang, Golubeva Diana, Bhatia Mick	4. 巻 27
2. 論文標題 Developing CRISPR/Cas9-Mediated Fluorescent Reporter Human Pluripotent Stem-Cell Lines for High-Content Screening	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 2434 ~ 2434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules27082434	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 Orlando Luca, Benoit Yannick D., Reid Jennifer C., Nakanishi Mio, Boyd Allison L., Garc?a-Rodriguez Juan L., Tanasijevic Borko, Doyle Meaghan S., Luchman Artee, Restall Ian J., Bergin Christopher J., Masibag Angelique N., Aslostovar Lili, Di Lu Justin, Laronde Sarah, Collins Tony J., Weiss Samuel, Bhatia Mickie	4. 巻 30
2. 論文標題 Chemical genomics reveals targetable programs of human cancers rooted in pluripotency	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 780 ~ 794.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chembiol.2023.06.004	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 該当する

1. 著者名 Yoneda Yuriko, Kato Hisaya, Maezawa Yoshiro, Yokote Koutaro, Nakanishi Mio	4. 巻 21
2. 論文標題 Real-time imaging of human endothelial-to-hematopoietic transition in vitro using pluripotent stem cell derived hemogenic endothelium	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 e211015
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.bppb-v21.s015	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中西未央
2. 発表標題 Plasticity of lineage-restricted progenitors: potential key mechanism underlying homeostasis, regeneration, and ageing of the somatic stem cells
3. 学会等名 第55回日本発生活物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mio Nakanishi
2. 発表標題 Homeostasis of stem cell populations maintained by rare de-differentiating subsets
3. 学会等名 The 59th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中西未央
2. 発表標題 造血幹細胞の発生・再生・老化の分子基盤
3. 学会等名 第5回 東京理科大学総合研究院合成生物学研究部門シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔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

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	University of Ottawa	University of Calgary