

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：84503

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20936

研究課題名(和文)単核貪食細胞分化モデルを用いた普遍的細胞分化メカニズムの解読

研究課題名(英文)Decoding the universal cell differentiation mechanisms.

研究代表者

西村 耕太郎(Nishimura, Koutarou)

公益財団法人神戸医療産業都市推進機構・その他部局等・研究員(上席・主任研究員クラス)

研究者番号：30909982

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文):細胞分化は、真核多細胞生物に固有の生命現象プロセスの一つであり、その厳密な時空間的制御は個体形成、生体の恒常性維持に必須である。近年、生命科学の研究におけるエピジェネティクス分野の発展は、様々な生命現象の新たな側面を明らかにしてきており、それは細胞分化の研究でも同様である。本研究では、造血細胞系譜の分化過程とマスター転写因子に注目し、未知のエピゲノム制御機構を解明することで、造血細胞系譜特異的な知見のみならず細胞分化の根本原理、遺伝子制御からその表現型に迫る普遍的細胞分化メカニズムの解読とその異常により引き起こされる様々な疾患メカニズムの解明を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞分化を制御する転写因子や細胞表面マーカーは、個々の細胞系譜に特有のものが多く、細胞分化全体に共通のメカニズムに関する知見は乏しい。細胞分化に伴うエピゲノム制御という未だ知見に乏しい領域に注目し解析した本研究では、p53が分化に与える影響を明らかにした。この結果はあらゆる細胞系譜に共通する普遍的分化メカニズムを解明する可能性があり、生物学的にきわめて意義深いものである。また、終末分化細胞を正常に維持する分子機構の解明は、医学・医療に新たな局面を切り開く可能性があり、社会的にも非常に意義深いと考えられる。

研究成果の概要(英文):Cell differentiation is one of the unique life processes specific to eukaryotes, and its precise spatiotemporal control is essential for the development processes and maintenance of homeostasis. In recent years, epigenetics has revealed new aspects of various biological processes, which is also true for cell differentiation. In this study, we focus on the cell differentiation of hematopoietic cell lineages and the master transcription factors, aiming to elucidate unknown epigenomic regulatory mechanisms. These findings could uncover lineage-specific insights into hematopoietic cell differentiation and decode the fundamental principles of cell differentiation and aims to elucidate various disease mechanisms caused by abnormalities.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：細胞分化 転写因子 エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

真核多細胞生物体で個々の細胞は、増殖、分化、細胞死など様々な運命をたどっている。ヒトでは分化全能性を有する受精卵が多能性幹細胞、前駆細胞、終末分化細胞へと増殖、分化し、その細胞分化階層の綿密な制御が、個体の恒常性、高次機能を維持している。これまで多くの組織、特に血球系細胞では、細胞系譜を決定するマスター転写因子と細胞系譜特異的な表面マーカーの解析により、その分化系譜図が確立されてきた。また、細胞分化は細胞増殖と深く結びついており、終末分化細胞の多くは不可逆的に増殖を停止していることも知られているが、その恒久的増殖停止メカニズムには未解明の部分も多い。

近年、DNA 配列変化を伴わない様々なエピゲノム制御機構が明らかとなり、既知の遺伝情報に時空間的な位置情報を付加することが可能になり、生命現象の新たな側面が明らかとなってきている。これまでの研究では転写因子による細胞分化を担うエピゲノム因子は未解明であり、観察されている細胞の不均一性と増殖抑制を生み出す素因であると予想している。本研究の主軸は「系譜特異的分化メカニズムと普遍的分化メカニズムがどこで出会うのか?」という問いである。細胞分化は時期、組織特異的遺伝子発現メカニズムが重要であり、細胞分化に伴うエピゲノム変化、また細胞増殖依存的エピゲノム変化も報告がある。これらをつなぐ終末分化に普遍的な増殖停止メカニズムとそれに伴うエピゲノム変化は非常に興味深く、細胞分化と増殖停止がどのように関連しているのかを理解する上でも重要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、系譜特異的転写因子がどのように普遍的な制御因子と協調して遺伝子発現を制御しているのか、また細胞分化に伴う恒久的増殖停止メカニズムをエピゲノムを中心に明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1)細胞分化に関わるエピゲノム因子の CRISPR-Cas9 スクリーニングによる同定。

マウス骨髄造血幹細胞と細胞分化誘導可能な細胞株に sgRNA ライブラリーと Cas9 を導入する。導入した細胞株を分化誘導し次世代シーケンシングにより解析、分化過程で失われた sgRNA クローンから分化誘導に必須のエピゲノム因子、その逆にコピー数が増加した sgRNA クローンから分化を抑制、または分化に伴う増殖停止を制御する因子の同定を試みる。

(2)細胞分化に伴う恒久的細胞増殖停止機構の解明。

細胞分化に伴う増殖停止機構について、まず p53 について注目した。p53 は DNA 損傷と細胞ストレスに応答して下流転写プログラムを活性化し、細胞周期停止、老化、細胞死の中核を担う分子である。造血細胞に関しても p53 は造血幹細胞の休止期を制御し (Liu *et al.* *Cell Stem Cell.* 2010)、p53 変異は造血幹細胞レベルでのクローン性造血やクローン拡大に寄与する (Wong *et al.* *Nature.* 2015)。p53 による増殖停止が細胞分化に必要であるかを分化誘導可能な細胞株、TF-1 と HL-60 に p53 野生型 (wt) を過剰発現し検証する。さらに p53 機能の異常が細胞分化に与える影響を明らかとするため同時に p53 変異体 (R273H) を導入し、細胞を分化誘導、FACS により細胞分化段階を解析する。

(3)転写因子-エピゲノム複合体の同定。

細胞分化過程において転写因子とその協調エピゲノム因子の同定のため細胞株に APEX2p53 融合遺伝子を導入する。APEX2 は過酸化水素処理により活性化されたビオチンフェノールを基質とし、その周囲半径 20 nm 以内に存在する分子のビオチン化を触媒することができる。分化誘導可能な細胞株、TF-1 に p53 野生型 (wt)、p53 変異体 (R273H) を導入し、ビオチン化を誘導後、ビオチン化された分子を質量分析法により網羅的に解析、同定する。

4. 研究成果

(1)細胞分化 CRISPR-Cas9 スクリーニングのため、マウス正常骨髄から単離した造血幹細胞への CRISPR ライブラリー導入を検討した。結果、ドロップアウトスクリーニングに必要な Coverage (x500)を確保するためのライブラリーの導入は可能であるが幹細胞の分化能を維持した状態を維持することが困難であった。原因としては、ライブラリーサイズが Primary 細胞に対して大きく (sgRNA が合計約 6000 種)、高効率の導入のため濃縮レンチウイルス sgRNA を用いる必要があり、高濃度のウイルス導入による細胞ダメージがある。結果現在のライブラリーでの NGS 解析

は困難であるとの結論に至った。Primary 細胞用の Small カスタムライブラリー (sgRNA が合計約 500 種以下) を設計検討中である。また、マスター転写因子による細胞分化の解析のため、樹状細胞 (DC) 分化に可能な Cas9 発現 MUTZ3 細胞株を新たに作成した。IL4/IFN α による MUTZ3-DC 分化プロトコルを最適化中であり、さらに sgRNA ライブラリー導入を進める予定である。

(2) 細胞分化の普遍的増殖停止機構解明のため p53 分子に着目し実験を進めた。

TF-1 細胞株で EPO 処理による赤血球系分化誘導実験で p53 の影響を解析した。TF-1 において p53wt 発現誘導は分化を促進する傾向にあった。p53 機能に異常がある R273 変異体では逆に分化が抑制されていた (図 1)。さらに HL-60 の ATRA によるミエロイド系分化誘導でも TF-1 と同様の結果が得られるとともに、分化誘導していない DMSO 処理群において、p53wt 発現は分化を顕著に促進した (図 2)。以上の結果から、p53 による細胞停止は細胞分化に必要であることが示唆される。現在、分化誘導下で p53 により誘導される遺伝子やクロマチン変

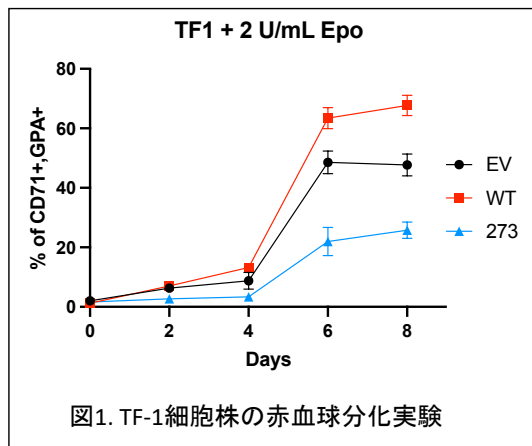


図1. TF-1細胞株の赤血球分化実験

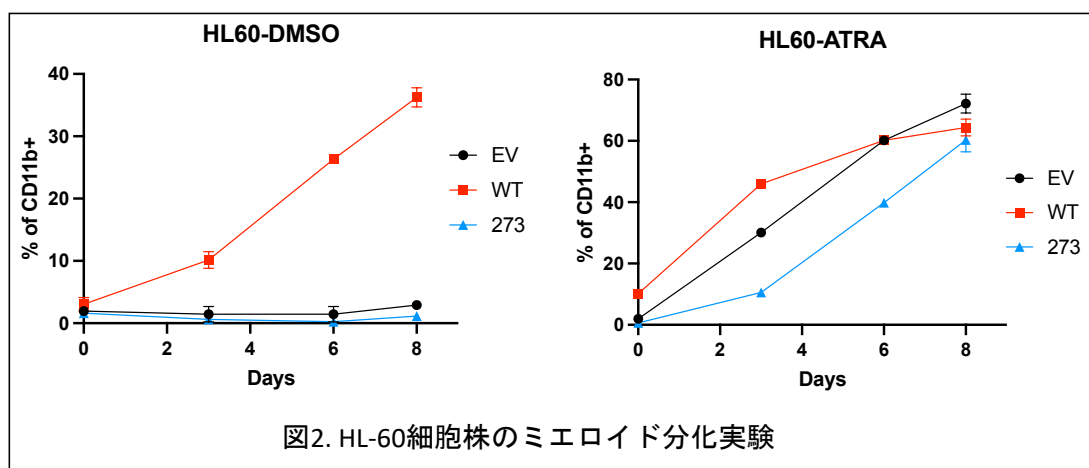


図2. HL-60細胞株のミエロイド分化実験

化同定するため、RNA-seq、ATAC-seq を行い解析中である。さらに MUTZ3 による DC 分化 p53 発現誘導系の確立も行なっている。

(3) p53 による細胞分化制御の詳細な解明のため、APEX2 による細胞内ビオチン化近位標識により増殖停止と細胞分化をつなぐエピゲノム因子の同定を試みた。TF-1 細胞に APEX2-p53 融合遺伝子の導入、分化誘導と同時にビオチン化の検討を行った。Streptavidin により APEX2-p53 を介した高度なビオチン化が確認され (図 3)、質量分析を進めている。

今後 (1)、(2) で同定したエピゲノム因子とその分子標的の変化を、細胞株を用いて生化学的また次世代シーケンス (RNA-seq、ATAC-seq、ChIP-seq、Hi-C など) で解析し、有意な候補因子を絞り込む。最終的に絞り込んだエピゲノム因子のノックアウトマウスを入手または作成し、生体骨髄中の造血幹細胞、末梢組織中の分化細胞を細胞株と同様に解析する。その分子がどのように協調して細胞分化、増殖停止、エピゲノム変化、さらには個体の表現型に影響を与えるか、その連関を明らかにする。

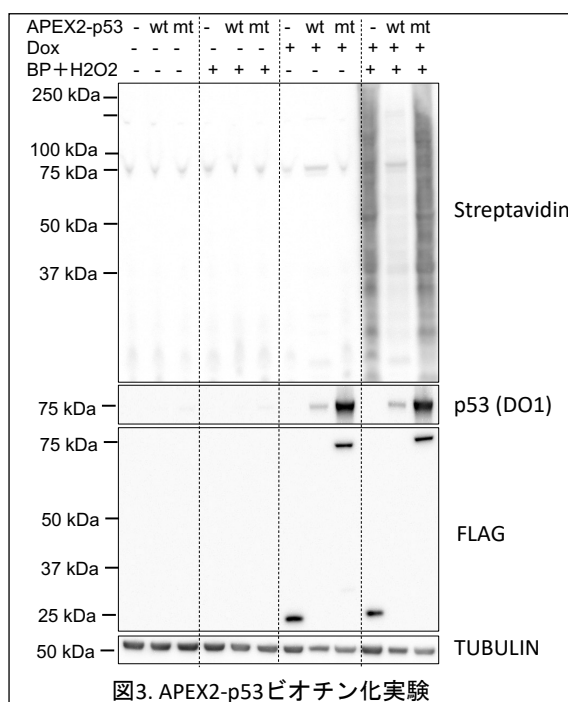


図3. APEX2-p53ビオチン化実験

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 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hayashi Yasutaka, Nishimura Koutarou, Tanaka Atsushi, Inoue Daichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Extracellular vesicle-mediated remodeling of the bone marrow microenvironment in myeloid malignancies	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-023-03587-x	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 Ikeda N, Kubota H, Suzuki R, Morita M, Yoshimura A, Osada Y, Kishida K, Kitamura D, Iwata A, Yotsumoto S, Kurotaki D, Nishimura K, Nishiyama A, Tamura T, Kamatani T, Tsunoda T, Murakawa M, Asahina Y, Hayashi Y, Harada H, Harada Y, Yokota A, Hirai H, Seki T, Kuwahara M, Yamashita M, Shichino S, Tanaka M, Asano K	4. 巻 42
2. 論文標題 The early neutrophil-committed progenitors aberrantly differentiate into immunoregulatory monocytes during emergency myelopoiesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 112165 ~ 112165
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2023.112165	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 Nishimura Koutarou, Yamazaki Hiromi, Zang Weijia, Inoue Daichi	4. 巻 113
2. 論文標題 Dysregulated minor intron splicing in cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2934 ~ 2942
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15476	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5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Koutarou Nishimura, Weijia Zang, Hiromi Ito, Yui Koike, Hiromi Yamazaki, Daichi Inoue
2. 発表標題 Uncovering the unrecognized roles on cell fate and leukemogenesis of p53 mutations
3. 学会等名 The 20th Stem Cell Research Symposium
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西村耕太郎、井上大地
2. 発表標題 p53変異体を標的とする新規治療戦略の開発
3. 学会等名 第27回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Koutarou Nishimura
2. 発表標題 Dissecting the unrecognized roles of mutations in TP53 “Guardian of the Genome”
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Koutarou Nishimura, Weijia Zang, June Takeda, Yui Koike, Hiromi Ito, Hiromi Yamazaki, Seishi Ogawa and Daichi Inoue
2. 発表標題 Revealing Unrecognized Gain-of-Function of TP53 Mutations in the Determination of HSC Fate
3. 学会等名 第85回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西村耕太郎
2. 発表標題 単核貪食細胞分化におけるIrf8エンハンサー群の動的制御機構の解明
3. 学会等名 第26回造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2022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
---------	---------