

111. 造血幹細胞の加齢と造血器腫瘍発症のエピゲノム基盤

大島 基彦

千葉大学 大学院医学研究院 細胞分子医学

Key words : 造血, 老化, エピジェネティック, ポリコーム, 腫瘍

緒言

造血幹細胞は加齢に伴い、様々な表現系の変化を示すとともに、骨髓球系腫瘍の温床となる。その過程では、遺伝子変異を伴ったクローナル造血が進行するとともに、エピゲノムも様々に変化することが想定される。クローナル造血と骨髓球系腫瘍発症の過程において、*Tet2*, *Ezh2*, *Dnmt3A* といったエピジェネティック制御因子の多くに変異が見られることが報告されているが¹⁾、そのメカニズムの詳細は不明な点が多い。

そこで本研究では、マウス造血幹細胞の加齢に伴う生理的なエピゲノム変化の網羅的な解析と、高齢者に高頻度に見られる骨髓異形性症候群 (myelodysplastic syndrome: MDS) のマウスモデル²⁾ (DNA 脱メチル化と H3K27me3 修飾を介した負の転写制御に関わる *Tet2* 及び *Ezh2* の機能異常をもつ) のエピゲノム変化についての比較検証を行った。

方法、結果および考察

若齢 (10 週)、中間齢 (12 ヶ月)、老齢 (20 - 24 ヶ月) マウスの造血幹細胞 (Hematopoietic stem cells: HSCs) と、短期骨髓再構築能を示す前駆細胞 (Myeloid progenitor cells: MPP) 1、MPP2、骨髓球系への分化傾向を示す MPP3、リンパ球系への分化傾向を示す MPP4 の各分画を用いて解析を行った (図 1A)。造血幹細胞の数は、これまでの報告どおり加齢に伴い増加していたが³⁾、一方で、リンパ球系への分化傾向を示す MPP4 の数は有意に減少していた (図 1B)。

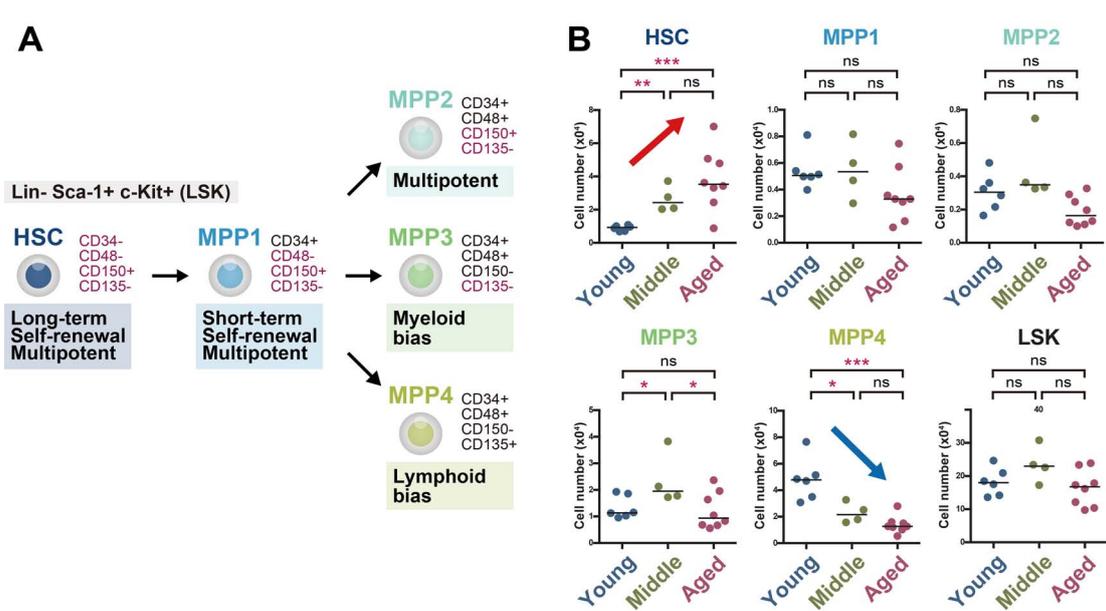


図1. 加齢に伴い造血幹細胞の数は増加し、MPP4 の数は減少する
 (A) 造血幹・前駆細胞分画と分化マーカー。(B) 加齢に伴う造血幹・前駆細胞数の変化。
 *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 (student's t 検定)。

次に、造血幹細胞、及び MPP1-4 分画を用いて RNA-seq を行い、加齢に伴う発現変動遺伝子のプロファイリングを行った。階層クラスタリング及び主成分分析から、各分画は加齢に伴い比較的近い発現プロファイルの変化を示すことが示された (図 2A、B)。また、加齢に伴う造血幹細胞での発現変動遺伝子は、その多くが造血幹細胞特異的である一方で、すべての分画で共通して変化する遺伝子群が認められた。MPP3 に特異的に発現している遺伝子群は、MPP4 特異的遺伝子群に比べ、老化造血幹細胞において有意に発現が上昇していた (図 2C)。

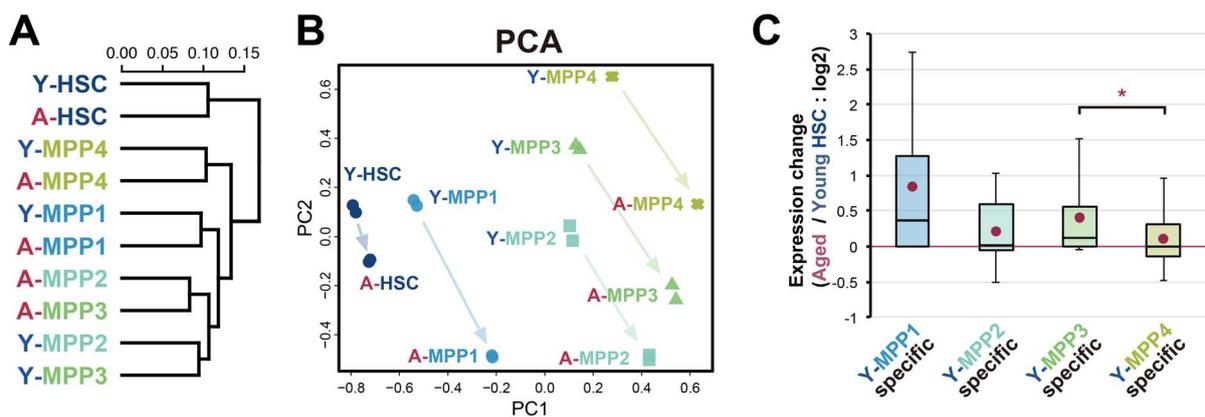


図2. 造血幹・前駆細胞の加齢に伴う遺伝子発現変化
 (A、B) 造血幹・前駆細胞分画の RNA-seq データを用いた階層クラスタリングと主成分分析。
 (C) MPP1-4 の各分画に特異的に発現している遺伝子群の、造血幹細胞数における発現変化。
 *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 (student's t 検定)。

次に、加齢に伴う発現変動遺伝子の機能について検証を行うため、GSEA (Gene set enrichment analysis) を行った。その結果、Polycomb repressive complex (PRC) 2 の構成因子である *Ezh2*, *Ezh1* 及び *Eed* 遺伝子を欠損した造血幹細胞において発現が亢進する遺伝子群を用いた GSEA において、これらの遺伝子群は老齢造血幹細胞で発現が有意に上昇していたことから、PRC2 を介した転写抑制は、加齢に伴い少なくとも一部、減弱することが示唆された (図 3A、B)。

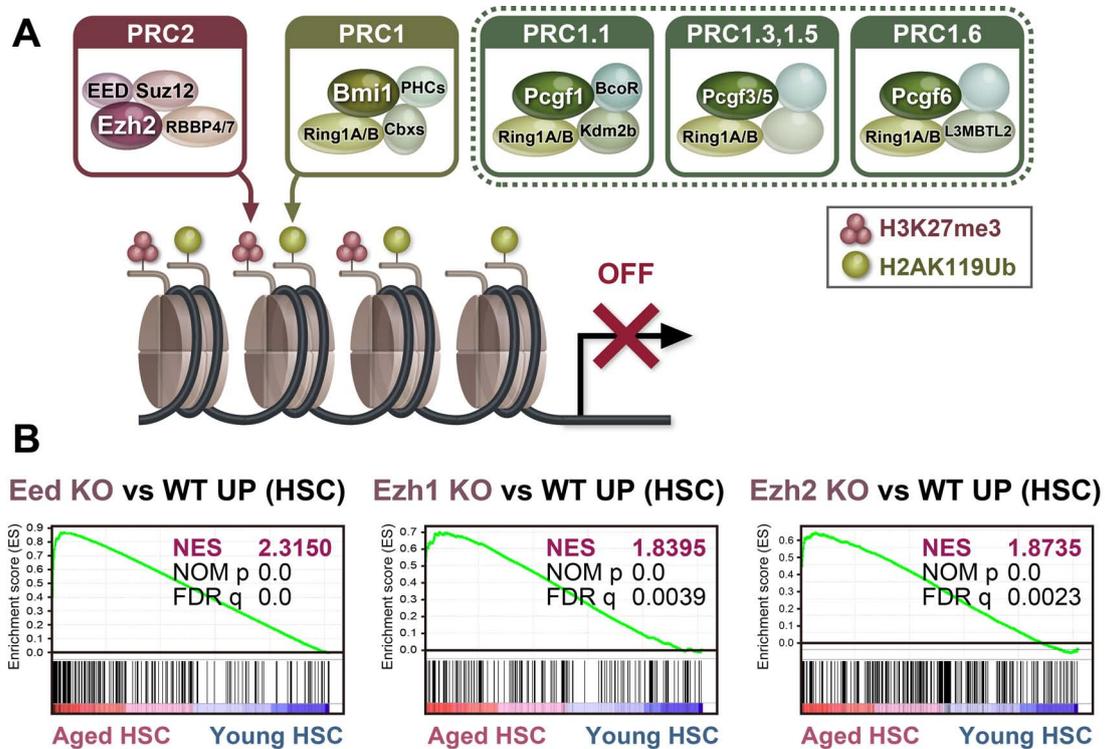


図 3. 老化造血幹細胞において、PRC2 標的遺伝子の発現は脱抑制する

(A) Polycomb repressive complex (PRC) 1, 2 の模式図。(B) *Ezh2*, *Ezh1* 及び *Eed* を欠損した造血幹細胞において発現が亢進する遺伝子群を用いた、若齢及び老齢造血幹細胞の GSEA。

そこで、造血幹細胞を用いた H3K27me3 の ChIP-seq 解析を行い、PRC2 を介したヒストン修飾の、加齢に伴う変化について、検証を行った。その結果、老齢造血幹細胞では、TSS (Transcription start site) に H3K27me3 マークを持つ PRC2 標的遺伝子の数が減少し、H3K27me3 レベルも低下することが示された (図 4A)。また、ChIP-seq により定義した、若齢造血幹細胞における PRC2 標的遺伝子群の加齢に伴う発現変動について、GSEA により検証を行ったところ、老齢造血幹細胞において多くの遺伝子の発現が脱抑制していることが明らかになった。また、造血前駆細胞を含む Linage-c-kit⁺Scal⁺ (LSK) 分画の細胞においても H3K27me3 レベルの低下と脱抑制が認められた (図 4B、C)。PRC1 によるヒストン修飾 H2AK119Ub1 は、その多くが PRC2 と協調して制御されていることから、H2AK119Ub1 の ChIP-seq を行い、比較検討した結果、H3K27me3 と同時に修飾されている TSS の H2AK119Ub1 のレベルが、加齢に伴い減少していることがわかった。これらの結果から、造血幹・前駆細胞では、加齢に伴い PRC の活性が一部減弱することで TSS の H3K27me3 修飾が減少し、遺伝子発現が脱抑制する事が示唆された。

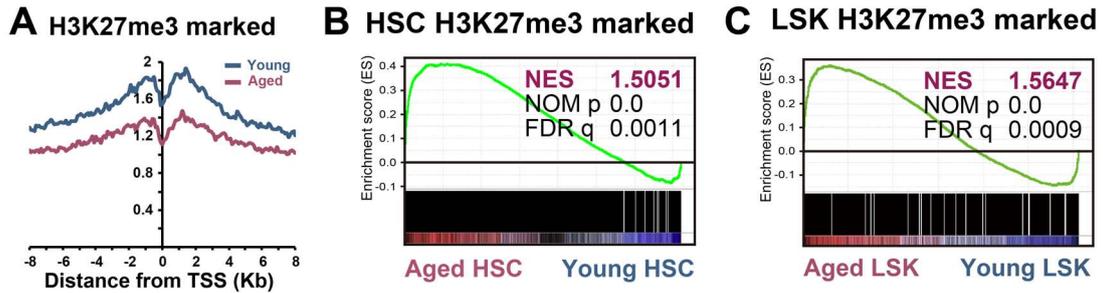


図 4. 造血幹・前駆細胞において、H3K27me3 は加齢に伴い減少し、標的遺伝子の発現は脱抑制する

(A) Transcription start site (TSS) 周辺の H3K27me3 の Density。(B、C) 造血幹細胞及び LSK 分画における H3K27me3 マーク遺伝子群を用いた、若齢及び老齢造血幹細胞及び LSK の GSEA。

これらの結果を踏まえ、MDS のマウスモデルの系を用いて、MDS を発症したマウスの造血幹・前駆細胞⁴⁾と加齢に伴うエピジェネティックな変化についての比較を行った。その結果、MDS を発症したマウスの造血幹・前駆細胞と老齢造血幹細胞では、多くの遺伝子が共通して発現上昇しており、その一部は PRC2 標的遺伝子であることが明らかとなった (図 5A、B)。また、DMS 患者の CD34⁺細胞を用いたマイクロアレイデータとの比較から⁵⁾、これら複数の遺伝子の発現が、DMS 患者で顕著に増加していることが示された (図 5C)。

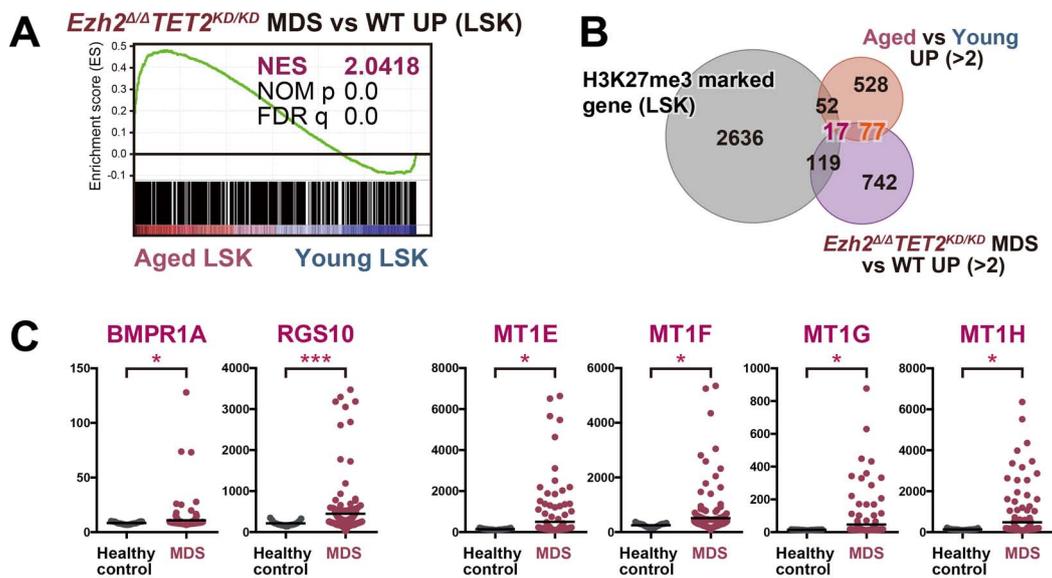


図 5. MDS 発症造血幹・前駆細胞と老齢造血幹細胞において、一部の PRC2 標的遺伝子が共通して脱抑制する

(A) MDS 発症 LSK と老齢 LSK における発現変動の GSEA による比較。(B) MDS と加齢、及び PRC2 標的遺伝子とのベン図による比較。(C) DMS 患者の CD34⁺細胞を用いたマイクロアレイデータを用いた標的遺伝子の群蜂図。*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 (student's t 検定)。

以上の結果から、造血幹・前駆細胞において、加齢に伴い PRC の活性が一部減弱することで標的遺伝子の発現が脱抑制し、造血系細胞の老化の表現型と、造血器腫瘍発症につながるものが強く示唆された。

文 献

- 1) Malcovati L, Papaemmanuil E, Ambaglio I, Elena C, Galli A, Della Porta MG, Travaglino E, Pietra D, Pascutto C, Ubezio M, Bono E, Da Vià MC, Brisci A, Bruno F, Cremonesi L, Ferrari M, Boveri E, Invernizzi R, Campbell PJ, Cazzola M. Driver somatic mutations identify distinct disease entities within myeloid neoplasms with myelodysplasia. *Blood*. 2014;124(9):1513-21. doi: 10.1182/blood-2014-03-560227. Epub 2014 Jun 26. PMID: 24970933
- 2) Muto T, Sashida G, Oshima M, Wendt GR, Mochizuki-Kashio M, Nagata Y, Sanada M, Miyagi S, Saraya A, Kamio A, Nagae G, Nakaseko C, Yokote K, Shimoda K, Koseki H, Suzuki Y, Sugano S, Aburatani H, Ogawa S, Iwama A. Concurrent loss of Ezh2 and Tet2 cooperates in the pathogenesis of myelodysplastic disorders. *J Exp Med*. 2013;210(12):2627-39. doi: 10.1084/jem.20131144. Epub 2013 Nov 11. PMID: 24218139
- 3) Geiger H, de Haan G, Florian MC. The ageing haematopoietic stem cell compartment. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(5):376-89. doi: 10.1038/nri3433. Epub 2013 Apr 15. PMID: 23584423
- 4) Hasegawa N, Oshima M, Sashida G, Matsui H, Koide S, Saraya A, Wang C, Muto T, Takane K, Kaneda A, Shimoda K, Nakaseko C, Yokote K, Iwama A. Impact of combinatorial dysfunctions of Tet2 and Ezh2 on the epigenome in the pathogenesis of myelodysplastic syndrome. *Leukemia*. 2017;31(4):861-871. doi: 10.1038/leu.2016.268. Epub 2016 Oct 3. PMID: 27694924
- 5) Pellagatti A, Cazzola M, Giagounidis A, Perry J, Malcovati L, Della Porta MG, Jädersten M, Killick S, Verma A, Norbury CJ, Hellström-Lindberg E, Wainscoat JS, Boultonwood J. Deregulated gene expression pathways in myelodysplastic syndrome hematopoietic stem cells. *Leukemia*. 2010;24(4):756-64. doi: 10.1038/leu.2010.31. Epub 2010 Mar 11. PMID: 20220779