

【要約】

Imprinting epigenetic memories in chromatin accessibility
in hematopoietic stem cells with aging

(加齢造血幹細胞のクロマチンアクセシビリティに
刷り込まれたエピゲノム記憶)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：江藤 浩之 教授)

糸川 直樹

【背景】

造血幹細胞は生涯にわたり全系統の血液細胞を産生しつづける体性幹細胞であるが、加齢に伴い骨髄球系への分化の偏り、リンパ球の産生能の低下、骨髄再構築能の低下といった質的变化をきたすことが知られている。また、いくつかの造血器腫瘍、特に骨髄異形成症候群の発症は加齢と強く相関がみられる。造血幹細胞の加齢性変化の原因については多くの要因が考えられているが、エピゲノム因子が重要な役割を担っていることが示唆されている。*DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, *EZH2* といったエピゲノム修飾遺伝子の変異が、骨髄異形成症候群や高齢健常者にみられるクローン造血に頻繁に認められている。また造血幹細胞の DNA メチル化、ヒストン修飾は加齢に伴い特徴的な変化をきたすことが報告されている。そこで我々は、エピゲノム解析を通して造血幹細胞の加齢性変化を調べるため、次世代シーケンサーを用いた網羅的なクロマチンアクセシビリティ、ヒストン修飾、トランスクリプトーム解析を若齢マウス造血幹細胞、加齢マウス造血幹細胞に対して実施した。

【結果】

加齢に伴う遺伝子の発現変動 (RNA-seq)

10 週齢の若齢マウス、20 ヶ月齢の加齢マウスの骨髄細胞を、造血幹細胞 (HSC)、4 つの分画の多能性前駆細胞 (MPP1, MPP2, MPP3, MPP4)、顆粒球マクロファージ系前駆細胞 (GMP)、巨核球赤血球系前駆細胞 (MEP)、リンパ球系前駆細胞 (CLP) にそれぞれフローサイトメトリーを用いて分画し、RNA-seq による網羅的なトランスクリプトーム解析を実施した。HSC では加齢に伴い 291 の遺伝子の発現が有意に上昇し、127 の遺伝子の発現が有意に低下しており、その中には *Se1p*, *Clu* といった加齢 HSC の hallmark といわれる遺伝子も含まれていた。また、過去に同様に加齢 HSC の変動遺伝子を調べた報告 (Sun et al. Cell Stem Cell. 2014) と約半数は重複しており、反復実験においても同様の遺伝子発現の変動がみられた。これらは、加齢に伴う発現変動はランダムではなく、一定の傾向をもった変化であることを意味している。

同様に MPP1, MPP2, MPP3, MPP4, GMP, MEP, CLP といった前駆細胞での加齢に伴う発現変動遺伝子を調べたところ、HSC よりも前駆細胞では多くの遺伝子の発現が変動している傾向がみられた。MPP と HSC では発現変動遺伝子は共通しているものが多かったが、GMP, MEP, CLP での発現変動遺伝子はそれぞれ特異的なものが多くみられた。MPP1, 2, 3, 4 と 4 つの分画に用いて解析をしたが、4 つの分画で変動している遺伝子は共通しているものが多くみられた。発現変動遺伝子の特徴を Gene ontology 解析で調べたところ、MPP1, 2, 3, 4 で共通して加齢に伴い発現が上昇する遺伝子には細胞代謝、細胞周期、protein

folding、RNA splicingに関連した遺伝子が多く含まれており、MPP1, 2, 3, 4で共通して発現が低下する遺伝子には分化を制御する転写因子が多く含まれていた。発現変動遺伝子のプロモーターを用いたモチーフ解析を行ったところ、GMP、MEP、CLPで発現が上昇する遺伝子にはインターフェロン調節因子（IRF）の標的遺伝子が多く含まれており、加齢に伴う慢性炎症を反映していると考えられた。また、CLPで加齢に伴い発現が減少する遺伝子にはE2Fの標的遺伝子が多くみられ、造血組織の加齢性変化の特徴のひとつであるリンパ球産生の減少は、前駆細胞の細胞周期の変化が一因である可能性が示唆された。

加齢に伴うクロマチンアクセシビリティの変化 (ATAC-seq)

ATAC-seqにより全ての分画から合計で102,983のchromatin accessible regionを検出した。Chromatin accessibilityは分化に伴いダイナミックに変化しており、K-means法クラスタリングによりHSC、MPPで特徴的に開いている領域cluster1、GMPで特徴的に開いている領域cluster2、MEPで特徴的に開いている領域cluster3、CLPで特徴的に開いている領域cluster4に分けられた。モチーフ解析を行うと、cluster1にはAP-1、Hoxa9など幹細胞の維持に重要な転写因子の標的配列が多く含まれており、cluster2には骨髄球の分化に重要なCEBPとPU.1の標的配列が、cluster3には赤血球の分化に重要なGATA配列が、cluster4にはリンパ球の分化に重要なE2A、PU.1の標的配列がそれぞれ多く含まれていた。これらは、クロマチンアクセシビリティの変化が分化制御に重要な転写因子の働きを反映していることを示している。

次に加齢に伴うクロマチンアクセシビリティの変化を調べたところHSC、MPP1、MPP2、MPP3、MPP4、GMP、MEP、CLPそれぞれで加齢に伴いクロマチンアクセシビリティが変化する領域(DAR)を認めたが、特にHSCで加齢に伴い開くDARが428カ所と多く認められた。DARは非プロモーター領域に多く、cluster1に属するHSC、MPPで特徴的に開いている領域に主に属していた。加齢に伴いHSCでopenとなるDARの多くは分化に伴い閉じていく傾向があったが、一部のDARは前駆細胞でもopenな状態となっていた。モチーフ解析を行ったところ、加齢に伴いHSCでopenとなるDARにはATFファミリー、STATファミリー、CNCファミリー、IRFファミリーの標的配列が豊富に含まれており、加齢に伴いHSCでcloseとなるDARにはMYBファミリー、SpiB、Pbx1、Meis1の標的配列が豊富に含まれていた。こうしたクロマチンアクセシビリティの変化が遺伝子発現にどう影響をしているのかを調べるためRNA-seqのデータと組み合わせ解析したところ、意外なことにDAR近傍の大部分の遺伝子の発現は加齢HSCにおいても変動していなかった。また逆に発現変動遺伝子のクロマチンアクセシビリティを調べたところ、多くの発現変動遺伝子のプロモ

ーターのアクセシビリティは若齢、加齢 HSC いずれにおいても open な状態であり、発現変動の多くはクロマチンリモデリング以外の要因によるものと考えられた。

加齢に伴うヒストン修飾の変化 (ChIP-seq)

次に造血細胞の分化に重要な役割を担っている抑制性のヒストン修飾である H3K27me3 と H2AK119Ub、活性化型のヒストン修飾である H3K4me3 の加齢に伴う変化を調べた。HSC では分化を制御する重要な遺伝子は H3K27me3、H3K4me3 の両方で修飾される bivalent な状態となっていることがあり、発現が抑制されている一方で分化刺激に応じた素早い遺伝子発現を可能にしている。それぞれのヒストン修飾への特異的抗体を用いたクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq) を行ったところ、若齢 HSC では 3,524 遺伝子のプロモーターが H3K27me3 で修飾され、6,896 遺伝子のプロモーターが H3K4me3 で修飾されており、そのうち 576 の遺伝子が両方で修飾される bivalent 遺伝子となっていた。加齢 HSC での ChIP-seq の結果と比べたところ、若齢 HSC において H3K27me3 で修飾されている遺伝子や bivalent となっている遺伝子の H3K27me3 のヒストン修飾が、加齢に伴い著明に減少する傾向がみられた。一方、加齢に伴い H3K4me3 はわずかに減少しており、H2AK119Ub は増加していた。遺伝子の数も、加齢 HSC では H3K27me3 で修飾される遺伝子が 1,821、H3K4me3 で修飾される遺伝子が 4,616 と減少しており、その結果として bivalent 遺伝子が 148 と若齢 HSC に比べ大きく減少していた。HSC で加齢に伴い H3K27me3 が失われる 1,848 遺伝子 (H3K27me3 loss genes) を Gene ontology 解析を用いてプロファイリングしたところ、分化関連の遺伝子が多く含まれており、ヒストン修飾の変化と加齢に伴う分化異常との関連が示唆された。遺伝子発現について RNA-seq のデータと照合して解析したところ、H3K27me3 loss genes のうち 57 の遺伝子は加齢 HSC で抑制がとれて発現が上昇していた一方で、大部分の 1,786 遺伝子の発現は抑制されたままであった。こうした遺伝子がなぜ H3K27me3 が失われたにも関わらず発現が抑制されたままであるかを調べるため、他の抑制性のエピゲノムである DNA メチル化の状態を過去に deposit された Whole genome bisulfite sequence (Kuribayashi W. J Exp Med. 2021) のデータと照合させたところ、加齢 HSC で発現が脱抑制される H3K27me3 loss genes ではそのプロモーター CpG island (CGI) が低メチル化状態を保っている一方で、加齢 HSC で発現が抑制されたままの H3K27me3 loss genes ではそのプロモーター CGI の DNA メチル化が加齢に伴い亢進している傾向がみられた。この H3K27me3 領域の DNA メチル化の亢進が、H3K27me3 loss genes の発現の脱抑制を妨げている一因である可能性が考えられた。

【考察・結語】

今回我々は加齢に伴う造血幹細胞のクロマチンアクセシビリティの変化、ヒストン修飾の変化を解析した。加齢に伴うクロマチンアクセシビリティの変化は造血幹細胞において多くみられており、一部は分化した細胞にも引き継がれていた。これは、クロマチンアクセシビリティの変化は、造血組織の頂点である造血幹細胞に主に記憶されており、造血組織全体の加齢性変化に影響を及ぼしている可能性を示唆している。加齢に伴い造血幹細胞でクロマチンが開く領域には、ATF ファミリー、STAT ファミリー、CNC ファミリー、IRF ファミリーの標的配列が豊富に含まれていた。これらはサイトカイン刺激、酸化ストレス、炎症ストレスといった各種ストレスに応答する転写因子の標的配列であり、長期にわたるストレスが造血幹細胞のエピゲノムに記憶された結果であると考えられた。意外なことに、大部分のクロマチンアクセシビリティの変化は遺伝子発現の変動を伴っていなかった。しかしながら、今回解析したトランスクリプトームは定常状態での遺伝子発現であり、ストレス環境、分化過程など特殊な条件下ではクロマチンアクセシビリティの変化が遺伝子発現に関与している可能性も考えられた。

ChIP-seq により加齢に伴う H3K27me3, H3K4me3, H2AK119ub の変化を解析したところ、造血幹細胞で加齢に伴い H3K27me3 が減少する傾向がみられた。その中には分化関連の遺伝子が多く含まれており、加齢に伴う分化異常との関連が示唆された。

以上のように、我々は次世代シーケンサーを用いた網羅的な解析により、造血幹細胞での加齢に伴うエピゲノム、トランスクリプトーム変化を明らかにした。詳細な加齢性変化のメカニズムの解明には更なる研究が求められるが、我々の網羅的なデータをリソースとして今後の研究が進むことを期待したい。