

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19544

研究課題名(和文)造血システムにおけるPcgfファミリー分子の機能差異

研究課題名(英文)The functional difference among Pcgf family proteins in hematopoietic system

研究代表者

中島 やえ子(Nakajima-Takagi, Yaeko)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：50749497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Pcgf1欠損造血幹細胞は、自己複製能は保たれているものの、B細胞への分化能が減弱し骨髄球への分化能が増強していた。実際に、Pcgf1 CKOマウスでは骨髄球系前駆細胞が集積し、長期飼育すると約半数が骨髄増殖性疾患様の病態を示した。網羅的解析から、Pcgf1欠損造血幹前駆細胞では骨髄球分化におけるマスター制御因子であるCebpaのH2AK119ub1修飾レベル低下を伴う発現亢進が観察され、その標的遺伝子群の発現も上昇していることが明らかになった。これらの結果は、Pcgf1が骨髄球分化の抑制因子として機能することで造血幹前駆細胞の多分化能のバランスを制御していることを示している。

研究成果の概要(英文)：We found that deletion of Pcgf1 in mice did not compromise self-renewal capacity of HSCs, but induced accumulation of granulocyte-macrophage progenitors and mature myeloid cells, eventually leading to the development of a lethal myeloproliferative neoplasm-like disease in mice. Detailed analysis of hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) revealed skewing of HSC differentiation to myeloid lineages at the expense of B lymphocyte commitment in the absence of Pcgf1. Comprehensive analyses revealed that Cebpa, a master transcriptional factor for myeloid differentiation, was up-regulated following a reduction in H2AK119ub1 levels in Pcgf1-deficient HSPCs, resulting in the activation of C/EBP targets in Pcgf1-deficient MPPs. These results indicate that Pcgf1 negatively regulates myeloid commitment of HSPCs to balance their multi-lineage differentiation.

研究分野：基礎医学

キーワード：ポリコーム Pcgf1 non-canonical PRC1 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞においてはDNA塩基配列の変化を伴わずに遺伝子発現状態を規定するエピジェネティック機構、特にクロマチン修飾を中心とした制御機構が自己複製能、多分化能を規定するのに重要であることがわかっている。近年、ヒストン修飾機能を有するポリコム群 (polycomb group; PcG) タンパク質が造血幹細胞のエピジェネティック制御に重要な機能を有し、中でも Bmi1/Pcgf4 が中心的な役割を果たしていることが報告された (Park et al., Nature, 2003, Iwama et al., Immunity, 2004, Oguro et al., Cell Stem Cell, 2010)。PcG タンパク質は標的遺伝子座の発現を抑制する分子群であり、核内で複合体を形成し、その複合体は Pcgf ファミリーを含む PRC (Polycomb repressive complex) 1 と Ezh2 を含む PRC2 の2つの複合体に大別される。

これまで主に解析されてきた PRC1 は Mel18/Pcgf2 もしくは Bmi1/Pcgf4 を含む複合体 (Canonical PRC1) であるが、最近他の Pcgf ファミリー (Pcgf1/3/5/6) を含む PRC1 (Non-Canonical PRC1) が Canonical PRC1 とは異なる機能を示すことが明らかになりつつある。造血細胞においても網羅的 RNA 干渉スクリーニングより Pcgf1 が Runx1 と協調して造血細胞の分化と自己複製に関わっていることが報告され (Ross et al., Blood, 2012)、Non-Canonical PRC1 の重要性が示唆されている。Non-Canonical PRC1 の構成因子は Canonical PRC1 と異なり Cbx を含まない (Gao et al., Mol cell, 2012)。そのため、これまで考えられてきた PcG 複合体の標的遺伝子座へのリクルートモデル [始めに PRC2 が遺伝子座に結合し、H3K27 をトリメチル化 (H3K27me3) する。次に PRC1 に含まれる Cbx が H3K27me3 を認識、結合することにより PRC1 がリクルートされる。その後 PRC1 が H2K119 をモノユビキチン化 (H2AK119ub1) する。] とは違った様式でリクルートされることが示唆された。実際に、Pcgf1 を含む PRC1 (PRC1.1) は、その構成因子として Fbx110 を有しており、Fbx110 が非メチル化 CpG 領域に結合することで PRC1.1 は遺伝子座にリクルートされることが報告された (He et al., Nat Cell Biol, 2013, Wu et al., Mol cell, 2013)。つまり PRC1.1 のリクルート様式は、PRC2 依存的リクルートである Canonical PRC1 とは全く異なり PRC2 非依存的なものであることが示された。(図1)

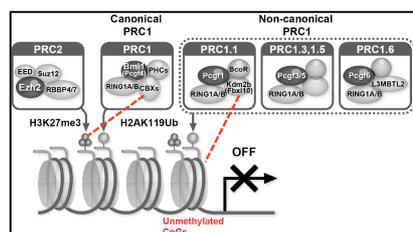


図1. Canonical PRC1 と Non-Canonical PRC1

Pcgf1 以外の Pcgf ファミリー分子を含む Non-Canonical PRC1 には Cbx はもちろん Fbx110 も含まれないため、さらに違ったリクルート様式であることが考えられる。そのため、これら Non-Canonical PRC1 は異なる遺伝子座へ異なるリクルート様式で結合し、異なる標的遺伝子の制御を行うため、異なる機能を発揮することが考えられる。

2. 研究の目的

造血幹細胞の自己複製能、多分化能を規定するにはヒストン修飾を中心としたエピジェネティック機構が重要であることが明らかとなっている。この機構においてはポリコム群タンパク質である Pcgf ファミリーの Bmi1/Pcgf4 が重要な役割を担うことが明らかにされてきた。しかしながら、最近、ES細胞を用いた解析から Pcgf ファミリー分子である Pcgf1、Pcgf3、Pcgf5 が Bmi1/Pcgf4 とは異なる機能を持つことが報告され、その機能差異が担う意義に関して注目が集まっている。そこで本研究では、造血幹細胞における Pcgf1、Pcgf3、Pcgf5 の機能と、Bmi1/Pcgf4 との機能差異を明らかにすることを目的とする。これらのファミリー分子機能の全体像を明らかにすることで、造血幹細胞のエピジェネティック制御機構に関する包括的な理解を深める。

3. 研究の方法

Pcgf1、Pcgf3、Bmi1/Pcgf4、Pcgf5 コンディショナルノックアウトマウスを用いて骨髓移植を行い、骨髓再構築能を調べることで各 Pcgf ファミリー分子を欠失した造血幹細胞の機能検討を行う。さらに各 Pcgf ファミリー分子を欠失した造血幹細胞/前駆細胞を単離し、遺伝子発現解析、エピゲノム解析を行い、結果を比較検討することでそれぞれの分子の機能を明らかにする。また、コンディショナルノックアウトマウスと Bmi1/Pcgf4 過剰発現ノックインマウスを交配することでレスキュー実験を行い、機能差異の有無を明確にする。

4. 研究成果

Pcgf3、Pcgf5 コンディショナルノックアウトマウスに関しては骨髓移植を行っても野生型と比較して骨髓再構築能に大きな違いは観察されなかった。Pcgf5 に関しては造血機能に重要な役割は果たさないものの、Pcgf5 欠損マウスの造血細胞においては H2AK119ub1 修飾レベルの低下が見られ、ヒストン修飾には寄与していることがあきらかになった (Si, Nakajima-Takagi et al., PLoS One, 2016)。

Bmi1/Pcgf4 コンディショナルノックアウトマウスを用いた骨髓移植を行うと、これまでの報告通り、骨髓再構築能の減弱が観察された。

興味深いことに *Pcgf1* コンディショナルノックアウトマウス用いた骨髓移植を行うと、*Pcgf1* 欠損造血幹細胞は、自己複製能は保たれているものの、B 細胞への分化能が減弱し骨髓球への分化能が増強していることが明らかになった (図 2)。

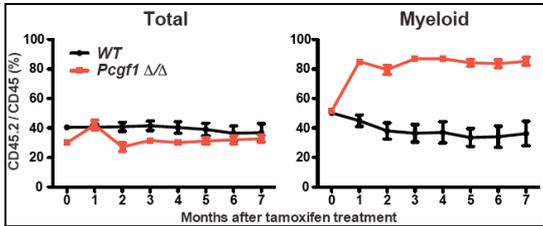


図 2. 競合移植後の末梢血におけるキメリズム

実際に、*Pcgf1* コンディショナルノックアウトマウスでは骨髓球系前駆細胞である GMP (granulocyte/macrophage progenitor) が集積し、長期飼育すると約半数が骨髓増殖性疾患様の病態を示した (図 3)。

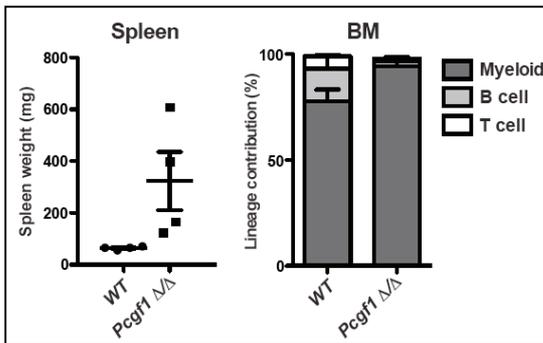


図 3. *Pcgf1* コンディショナルノックアウトマウスにおける骨髓増殖性疾患様病態

この表現型が、*Pcgf1* と同じファミリー分子で造血幹細胞の機能維持に重要な役割を果たすことが明らかになっている *Pcgf4/Bmi1* の過剰発現でレスキューされるか検証した。*Pcgf1* コンディショナルノックアウトマウスと *Pcgf4/Bmi1* 過剰発現マウスを交配し、コンパウンドマウスを作成した。このマウスの造血における表現型を観察したところ、*Pcgf1* コンディショナルノックアウトマウスとほぼ変わりがなく、*Pcgf1* の機能は *Pcgf4/Bmi1* の過剰発現ではレスキューされないことが明らかとなった。

また、*Pcgf1* 欠損造血幹前駆細胞を骨髓球分化条件で培養すると野生型と比較して増殖活性の増強が認められた。

網羅的解析から、*Pcgf1* 欠損造血幹前駆細胞では骨髓球分化におけるマスター制御因子である *Cebpa* の H2AK119ub1 修飾レベル低下を伴う発現亢進が観察され、さらにはその標的遺伝子群の発現も上昇していることが明らかになった。主成分分析では、*Pcgf1* 欠損多能性前駆細胞 (MPP) が骨髓球前駆細胞 (GMP、PreGM) 様の発現パターンを示すこと

が示された (図 4)

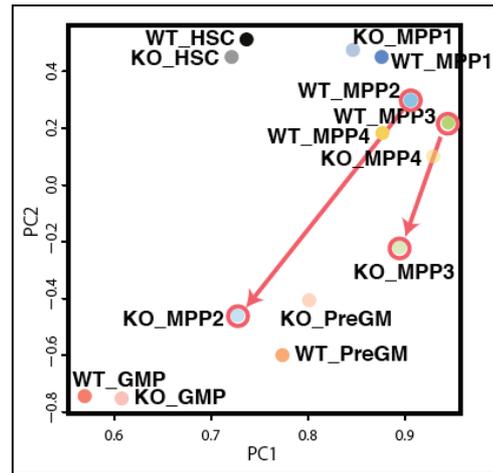


図 4. 主成分分析

これらの結果は、*Pcgf1* が骨髓球分化の抑制因子として機能することで造血幹前駆細胞の多分化能のバランスを制御していることを示しており、canonical PRC1 と noncanonical PRC1 が異なる機能によって造血幹細胞分化に重要な役割を果たすことを示唆する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Sha Si, Yaeko Nakajima-Takagi, Kazumasa Aoyama, Motohiko Oshima, Atsunori Saraya, Hiroki Sugishita, manabu Nakayama, Tomoyuki Ishikura, Haruhiko Koseki, Atsushi Iwama. Loss of *Pcgf5* Affects Global H2A Monoubiquitination but Not the Function of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *PLoS One*, 査読有, 11 巻, 2016, e0154561
DOI: 10.1371/journal.pone.0154561.

[学会発表] (計 4 件)

- ① Yaeko Nakajima-Takagi, Motohiko Oshima, Sha Si, Atsunori Saraya, Tomokatsu Ikawa, Junichiro Takano, Haruhiko Koseki, Atsushi Iwama. Role of the polycomb-group protein *Pcgf1* in the lineage commitment of hematopoietic stem cells. 第 78 回日本血液学会学術集会, 2016 年 10 月 13-15 日, パシフィコ横浜 (神奈川県, 横浜市).
- ② Yaeko Nakajima-Takagi, Motohiko Oshima, Sha Si, Atsunori Saraya, Haruhiko Koseki, Atsushi Iwama. Role of the polycomb group protein *Pcgf1* in hematopoietic system. 第 77 回日本血液学会学術集会, 2015 年 10 月 16-18 日, 石

川県立音楽堂（石川県，金沢市）。

- ③ Sha Si, Yaeko Nakajima-Takagi, Motohiko Oshima, Kazumasa Aoyama, Atsunori Saraya, Haruhiko Koseki, Atsushi Iwama. Role of polycomb group protein Pcgf5 in hematopoietic system. 第 77 回日本血液学会学術集会, 2015 年 10 月 16-18 日, 川県立音楽堂(川県, 金沢市)。
- ④ Tomoyuki Tanaka, Yaeko Nakajima-Takagi, Motohiko Oshima, Atsunori Saraya, Shiro Tara, Sha Si, Hirohito Sone, Haruhiko Koseki, Atsushi Iwama. Role of the polycomb gene Bcor in hematopoiesis. The 44th Annual Meeting of International Society for Experimental Hematology, 2015 年 9 月 17-19 日, 国立京都国際会館 (京都府, 京都市)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 やえ子 (NAKAJIMA-TAKAGI, Yaeko)
千葉大学・大学院医学研究院・特任助教
研究者番号：50749497