

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15498

研究課題名(和文)造血細胞における癌抑制遺伝子BCORの分子機能の解明

研究課題名(英文)Tumor suppressor role of BCOR in hematopoiesis

研究代表者

岩間 厚志(Iwama, Atsushi)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：70244126

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文): BcorはBcl-6とポリコム群複合体と結合し、複合体を形成して転写抑制に機能する。これまで、様々な造血腫瘍症例に機能喪失型の遺伝子変異が同定されている。本研究では、Bcl-6結合ドメインを欠損したBcor変異マウスの移植実験を行い、6割のマウスがT細胞性の急性リンパ性白血病(T-ALL)を発症することを見出した。クロマチン免疫沈降シーケンス解析やRNA-seq解析から、BcorがMycをはじめとした多くのNOTCH1ターゲット遺伝子のプロモーター領域に結合することが示され、Bcorを含む転写抑制機構がNOTCH1ターゲット遺伝子の発現調節に機能することが示された。

研究成果の概要(英文): Recurrent inactivating mutations have been identified in various hematological malignancies in the X-linked BCOR gene encoding BCL6 corepressor (BCOR). We herein generated mice missing Bcor exon 4, expressing a variant BCOR lacking the BCL6-binding domain (Bcor^{E4/y}). Bcor^{E4/y} thymocytes had augmented proliferative capacity in culture and showed a strong propensity to induce acute T-cell lymphoblastic leukemia (T-ALL) mostly in a Notch-dependent manner. Myc, one of the critical NOTCH1 targets in T-ALL, was highly upregulated in Bcor^{E4/y} T-ALL cells. ChIP-seq analysis revealed that BCOR was recruited to the Myc promoter and restrained its activation in thymocytes. BCOR also targeted other NOTCH1 targets and potentially antagonized their transcriptional activation. Bcl6-deficient thymocytes behaved in a similar manner to Bcor^{E4/y} thymocytes. Our results provide the first evidence of a tumor suppressor role for BCOR in the pathogenesis of T lymphocyte malignancies.

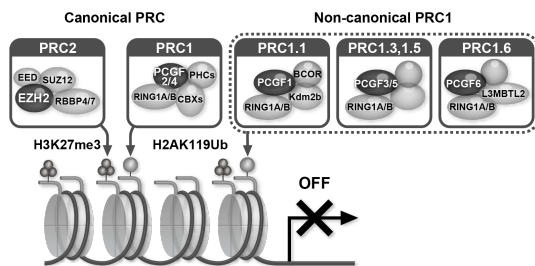
研究分野：血液内科学

キーワード：BCOR がん抑制遺伝子 造血腫瘍

1. 研究開始当初の背景

ポリコーム群複合体はヒストン修飾 (H3K27me3, H2AK119ub1) を介して転写を抑制的に制御する。ポリコーム群複合体は各種幹細胞とともに、癌の発症・進展に重要な機能を有する。ポリコーム群複合体は、癌種により癌遺伝子として、あるいは癌抑制遺伝子として機能する。

Non-canonical ポリコーム群複合体 (PRC1.1) (下図) はヒストン H2AK119 のモノユビキチン化 (H2AK119ub1) を触媒するが、その構成因子である BCOR の機能喪失型変異が造血器腫瘍に認められている。BCOR は BCL6 とポリコーム群複合体と結合し、複合体を形成して転写抑制に機能する。しかしながら、BCOR の機能は明らかではなく、その機能喪失型変異の意義も不明である。

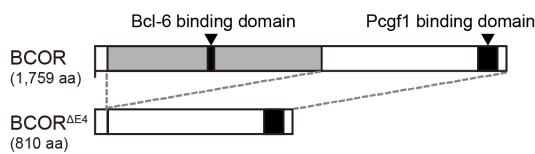


2. 研究の目的

本研究においては Bcl-6 結合ドメインを欠損した Bcor 変異マウスの解析を行い、PRC1.1 における BCOR ならびに BCOR の機能喪失型変異の生物学的機能を明らかにし、BCOR の癌抑制遺伝子としての機能解明を目的とした。

3. 研究の方法

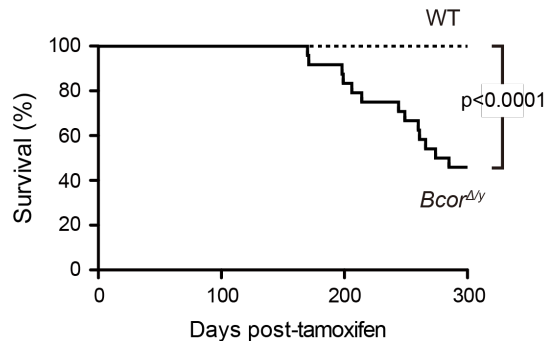
Bcor 機能障害による造血異常の解析



Bcl-6 結合ドメインを欠損した Bcor 変異マウス (*Bcor*^{ΔE4/y}) (上図) を *Rosa26::Cre-ERT* マウスと交配し、その骨髄細胞を致死量の放射線を照射したレシピエントマウスに移植した。ドナー細胞のレシピエントマウスへの生着を確認したのち、タモキシフェンを腹腔内投与することにより Cre を活性化し、生着したドナーの血液細胞特異的に *Bcor* 遺伝子の Exon 4 を欠損させた。その後レシピエントマウスに於ける造血を長期に観察した。また、胸腺細胞や腫瘍細胞を用いて、クロマチン免疫沈降シーケンス法 (ChIP-seq) ならびに RNA-seq 解析を行った。

4. 研究成果

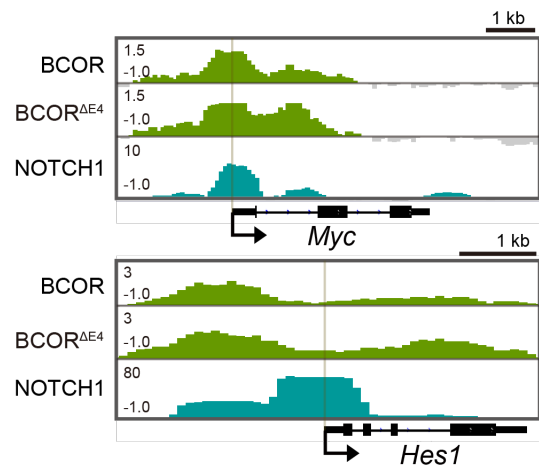
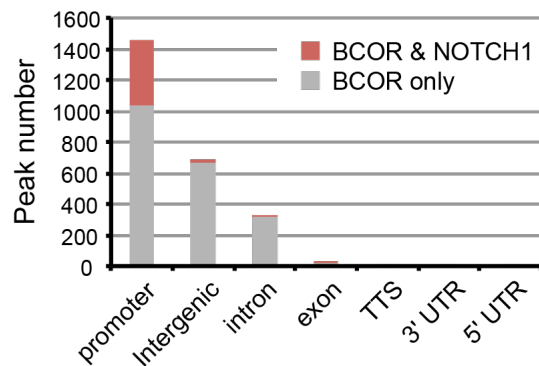
Bcor (Bcl-6 corepressor) は X 染色体上に位置し、Bcl-6 と結合するドメインとポリコーム群複合体と結合するドメインを有し、Bcor 蛋白はこれらの分子と複合体を形成して転写抑制に機能すると考えられている。これまで、急性骨髄性白血病などの骨髄系腫瘍、節外性 NK/T 細胞性リンパ腫などのリンパ性腫瘍、また再生不良性貧血や骨髄異形成症候といった造血不全の一部症例に機能喪失型の変異が明らかになっていた。しかし、生体の造血における役割はほとんど不明であった。そこで本研究では、Bcl-6 と結合するドメインの欠損した *Bcor* 変異マウスをレシピエントマウスに移植することにより、*Bcor* の造血への影響を検討した。*Bcor* 変異マウスから移植を受けたマウスを長期間観察すると 6 割のマウスが T 細胞性の急性リンパ性白血病 (T-ALL) を発症した (下図生存曲線と死因)。



Causes of death

T-ALL	11/15 (73.3%)
CD4 ⁺ CD8 ⁺	2/15 (13.3%)
CD4 ⁺ CD8 ⁺ ~CD8 SP	4/15 (26.7%)
CD8 SP	3/15 (20.0%)
CD4 ⁺ CD8 ^{-low}	2/15 (13.3%)
B-ALL/lymphoma	1/15 (6.7%)
uncharacterized	3/15 (20.0%)

メカニズムを解明するために T-ALL 細胞や胸腺細胞における ChIP-seq ならびに RNA-seq を用いて T 細胞における *Bcor* や Bcl-6 のゲノム上での挙動や転写への影響を解析した。*Bcor* 変異マウスの T-ALL 細胞では *Myc* などの NOTCH1 ターゲット遺伝子の発現が亢進していた。*Bcor* 抗体によるクロマチン免疫沈降シーケンスでは *Myc* をはじめとして多くの NOTCH1 ターゲット遺伝子のプロモーター領域に *Bcor* が結合することが示され、*Bcor* を含む転写抑制機構が NOTCH1 ターゲット遺伝子の発現調節にかかわっていることが示された (次頁図)。



本研究によって、Bcor 変異により T-ALL が発症すること、さらには T 細胞において Bcl-6、Bcor、ポリコム群複合体の集合体が NOTCH1 ターゲット遺伝子の過剰な活性化を抑制し、癌抑制遺伝子として働くことが明らかとなった。

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 4 件)

Tanaka T, Nakajima-Takagi Y, Aoyama K, Tara S, Oshima M, Saraya A, Koide S, Si S, Manabe I, Sanada M, Nakayama M, Masuko M, Sone H, Koseki H and Iwama A. Internal deletion of BCOR reveals a tumor suppressor function for BCOR in T lymphocyte malignancies. *J Exp Med* 210(10):2901-2913, 2017. 査読有

Iwama A, Polycomb repressive complexes in hematological malignancies. (Review) *Blood* 130(1): 23-29, 2017. 査読有

Sashida G, Iwama A. Multifaceted role of the polycomb-group gene *EZH2* in hematological malignancies. (Review) *Int J Hematol* 105(1):23-30, 2017. 査読有

Si S, Nakajima-Takagi Y, Aoyama K,

Oshima M, Saraya A, Sugishita H, Nakayama M, Ishikura T, Koseki H, Iwama A. Loss of Pcgf5 affects global H2A monoubiquitination but not the function of hematopoietic stem and progenitor cells. *Plos One* 11(5):e0154561, 2016 査読有

[学会発表](計 6 件)

Iwama A. "Deregulated polycomb function in the pathogenesis of myelodysplasia" New directions in Leukaemia Research 2018 Meeting. March 25-28, 2018 (Brisbane, Australia)

Iwama A. "Role of PRC1.1, a non-canonical PRC1 complex in the lineage commitment of hematopoietic stem and progenitor cells" JSPS & National University of Singapore Joint 2nd symposium. New Horizons in Normal and Cancer Stem Cell Research. January 18-20, 2018 (Kumamoto University, Kumamoto)

Iwama A. "Pcgf1, a component of PRC1.1, functions as a tumor suppressor in myeloproliferative neoplasms. 2017 US-Japan Symposium on Normal/Malignant Hematopoiesis and Novel Therapies for Hematologic Malignancies. February 21-23, 2017 (Hilton Waikoloa Village, Hawaii, U.S.A.)

Iwama A. "Role of non-canonical polycomb repressive complex 1 in fate decision of hematopoietic stem cells. Annual Meeting of International Society of Stem Cell Research. June 22-25, 2016 (San Francisco, U.S.A.)

Iwama A. "Polycomb repressive complex in hematological malignancies" 11th International Workshop on Molecular aspects of myeloid stem cell development and leukemia. 2016.5.2-5.5 (Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Ohio, U.S.A.)

岩間厚志 "造血幹細胞におけるバリエーション PRC1 複合体の機能" 第 15 回日本再生医療学会総会 2016 年 3 月 17 日-19 日 (大阪市 リーガロイヤルホテル)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/molmed/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岩間 厚志 (IWAMA, Atsushi)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：70244126