

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：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19566

研究課題名(和文) H3K36メチル化転移酵素Mmsetの造血幹細胞における機能の解明

研究課題名(英文) Role of H3K36 methyltransferase Mmset in Hematopoietic stem cells

研究代表者

望月 牧子(Mochizuki, Makiko)

千葉大学・大学院医学研究院・特任研究員

研究者番号：40751300

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)：ヒストンH3リジン36番目のメチル化修飾酵素であるWHSC1(NSD2,MMSET) KOマウスおよびVav1-Creコンディショナルノックアウトマウスの造血機能の解析を実施した結果、成体マウス造血幹細胞(Hematopoietic Stem Cell; HSC)数はコントロールWTと比較して数が増加していたものの、in vivoで移植実験を実施するとHSCの長期骨髄再構築能の低下が確認された。

研究成果の概要(英文)：Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1 (WHSC1), also known as NSD2 or MMSET, functions as a one of the Histone H3 Lysin36 methyltransferase (H3K36me) transcriptional regulation together with developmental transcription factors and that the Whsc1 deficiency is responsible for WHS.

In this research, we showed that Whsc1 is required for normal Hematopoietic stem cell (HSC) homeostasis. We performed Hematopoietic analysis in both Whsc1 conventional knockout (KO) and conditional knockout (cKO) mice. HSC number was slightly increased in adult Whsc1 cKO. Nevertheless competitive reconstitution of hematopoietic cell analysis reveals that Whsc1-deficient HSCs impaired reconstitution capacity in vivo. These data indicate DNA damage repair associated modification H3K36me plays important role for HSC self-renewal, differentiation and reconstitution.

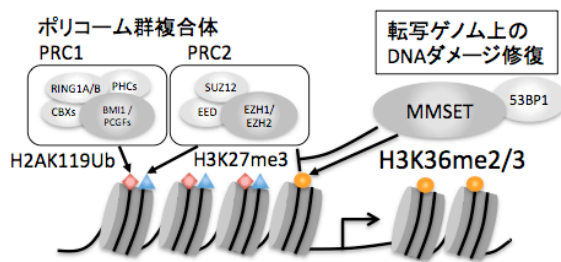
研究分野：血液学

キーワード：Mmset Whsc1 Nsd1 HSC H3K36me2/3

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞 (Hematopoietic Stem Cell: HSC) は自己複製能と多分化能を併せもち、その運命決定にエピジェネティックな修飾 (DNA メチル化修飾、ヒストン修飾) は重要な役割を担っている。これまでに申請者のグループでは、転写抑制的ヒストン修飾を行うポリコーム群複合体の構成分子である Bmi1 が HSC の自己複製能に重要であること (Iwama A et.al., *Immunity* 2004)、また Ezh2 欠損下において Ezh1 がその機能を部分的に代償し造血が維持されること (Mochizuki-Kashio M et.al., *Blood* 2011)、しかしながら Ezh2 欠損によりマウスにおいて骨髄異形成を伴う造血腫瘍病態 (MDS, MDS/MPN) が長期観察後に発症することを明らかにしてきた (Mochizuki-Kashio M et.al., *Blood* 2015) (図1)。

図1



血液疾患におけるMMSET異常

機能獲得型変異:

t(4; 14)(p16; q32) IgH/MMSET
多発性骨髄腫 (Multiple Myeloma) 患者の15%

機能喪失型変異:

haplo-insufficiency of MMSET
Wolf-Hirschhorn症候群(4p-症候群)

H3K36me2/3 は H3K27me3 近傍のヒストン修飾でありながら、H3K27me3 と異なり、転写活性化領域をマークする。しかしながら PRC2 に結合する Pc1 分子の PHD ドメインが H3K36me3 に結合する等、何らかの関連が示唆されてきた。近年、ショウジョウバエで H3K36me2/3 とその触媒酵素である MMSET がインスレーターと協調して H3K27me3 修飾領域の拡大を防いでいるという知見が報告されている (Lhoumaud P et.al., *EMBO J.* 2014)。

2. 研究の目的

ヒストン H3 の 36 番目リジン残基のメチル化 (H3K36me1/2/3) 転移酵素の一つである MMSET は多発性骨髄腫、Wolf-Hirschhorn 症候群の原因遺伝子であるが、エピジェネティ

ック因子として HSC の機能にいかに関わるか、いまだ明らかにされていない。これまでの知見をもとに、MMset は H3K36me2/3 修飾を介して HSC の分化関連遺伝子上で発生する DNA ダメージ修復に関与することによって HSC の多分化能に機能している、と想定し、ヒストン修飾はどのように HSC の機能に寄与するか、その一端を理解することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

MMset は H3K36me2/3 修飾を介して HSC の分化関連遺伝子上で発生する DNA ダメージ修復に関与することによって HSC の多分化能に機能している、と想定し、以下の MMset 欠損 HSC の詳細なフェノタイプ の解明 に焦点を当てながら研究を進めていく。

4. 研究成果

造血特異的に Mmset を欠損できる Vav1-Cre;Mmset^{f1/f1} コンディショナルノックアウトマウスを育成し、生後8週で造血幹細胞 (HSC) 数等の造血解析を FACS を用いて実施したところ、コントロールマウスと比較して HSC の数が変わらない個体と増加している個体の2種類が認められ、少なくとも数の減少がみられないことを確認した (図2)。しかしながら、同じマウスから骨髄を摘出し骨髄移植を実施した結果、主にリンパ球系の骨髄再構築能が低下しており、HSC の機能低下が示唆された (図3)。

これまでの報告から、Mmset は H3K36me2/3 を介して DNA ダメージ修復に関与する可能性がある。また、HSC は DNA ダメージが入ると分化に比較して自己複製の効率を上げることが明らかになっており、Vav1-Cre;Mmset^{f1/f1} コンディショナルノックアウトマウスの HSC 数が増加していることは Mmset 欠損 HSC で DNA ダメージが増加している可能性を示唆している。

図2

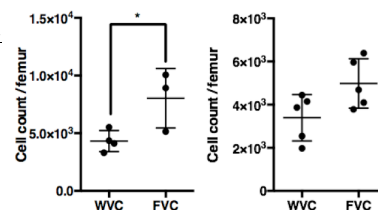
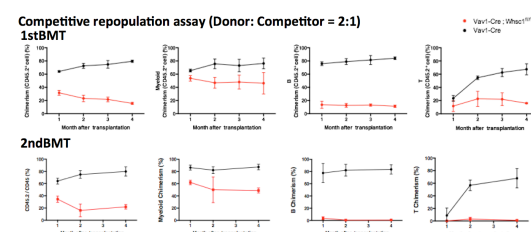


図3

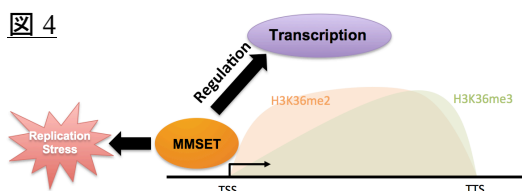


これらの情報を鑑み、DNA損傷修復関連遺伝子の発現を見るためにRNA-Seqを実施しようと計画した。RNA-Seqに使用するHSCのサンプリングは行なったが、実施、解析に至っていない。

2017年6月に研究協力者のCobaleda氏から我々のKOマウスを使用して、造血の解析を行った報告が出された。それによると、Whsc1欠損細胞でファンconi貧血 (Fanconi Anemia; FA) 関連因子の発現上昇がみられる。また、Whsc1欠損マウス線維芽細胞 (MEF) およびB細胞は複製フォーク数の減少および複製速度の減少がみられる。

これらの情報を合わせると、MmsetはHSCでDNA複製時に転写制御を介して複製ストレスを回避している可能性が示唆される(図4)。今後はFA分子との関連を鑑みながらMmsetのHSCでの役割および分子の役割そのものについても検討して行きたい。

図 4



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 2 件)

- ① Sashida G, Wang C, Tomioka T, Oshima M, Aoyama K, Kanai A, Mochizuki-Kashio M, Harada H, Shimoda K, and Iwama A. The loss of Ezh2 drives the pathogenesis of myelofibrosis and sensitizes tumor-initiating cells to bromodomain inhibition. J Exp Med. 査読有、25:213(8)、2016、1459-1477
DOI: 10.1084
- ② Oshima M, Hasegawa N, Mochizuki-Kashio M, Muto T, Miyagi S, Koide S, Yabata S, Wendt GR, Saraya A, Wang C, Shimoda K, Suzuki Y, Iwama A. Ezh2 regulates the Lin28/let-7 pathway to restrict activation of fetal gene signature in adult hematopoietic stem cells. Exp Hematol. 査読有、44(4)、2016、282- 296
DOI: 10.1016

[学会発表] (計 5 件)

- ① 望月(樫尾)牧子、横田貴文、藤木亮次、杉尾ジュリー、鈴木慈、前田亮、岩間厚志、浦聖恵、メチル化転移酵素

Nsd2の機能の解明、染色体ワークショップ、千葉県木更津市、2017年01月11日~ 2017年01月13日

- ② 望月(樫尾)牧子、岩間厚志、浦聖恵、ヒストンH3K36転移酵素Whsc1の造血幹細胞における機能の解明、転写サイクル班会議2016、宮城県、2016年09月05日~ 2016年09月07日
- ③ Makiko Mochizuki-Kashio, Kazumasa Aoyama, Goro Sashida, Motohiko Oshima, Changshan Wang, Atushi Iwama, Ezh2 loss in hematopoietic stem cells predisposes mice to develop heterogeneous malignancies in an Eh1-dependent manner、The 5th JCA-AACR Special Joint Conference、千葉県浦安市、2016年07月13日~ 2016年07月15日
- ④ 樫尾(望月)牧子、青山和正、指田吾郎、大島基彦、王長山、岩間厚志、Ezh2の機能欠損による造血器腫瘍の形成には造血幹・前駆細胞におけるEzh1の発現が必須である、麒麟塾、東京都、2016年07月07日~ 2016年07月07日
- ⑤ Makiko Mochizuki-Kashio, Kazumasa Aoyama, Goro Sashida, Motohiko Oshima, Changshan Wang, Atushi Iwama, Ezh2 loss in hematopoietic stem cells predisposes mice to develop heterogeneous malignancies in an Eh1-dependent manner、幹細胞シンポジウム、兵庫県淡路市、2016年05月21日~ 2016年05月22日

[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
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者
望月 牧子 (MOCHZUKI-KASHIO, Makiko)
千葉大学・大学院医学研究院・特任研究員
研究者番号：40751300

(2)研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
岩間 厚志 (IWAMA, Atsushi)
浦 聖恵 (URA, Kiyoe)