

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 10 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390289

研究課題名（和文）

ポリコーム複合体による造血幹細胞の運命決定機構と白血病幹細胞制御機構の解明

研究課題名（英文）

Regulation of hematopoietic and leukemic stem cells by the polycomb complexes

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

研究成果の概要（和文）：

ポリコーム複合体が造血幹細胞の多能性の維持に重要な機能を有することが明らかとなった。また、ポリコーム複合体が一連の癌抑制遺伝子の発現抑制を介して白血病幹細胞の形質獲得に重要であるとともに、癌遺伝子の発現抑制を介して、癌抑制的に機能することも明らかとなり、ポリコーム複合体の多様な機能が確認された。

研究成果の概要（英文）：

We demonstrated that the polycomb complexes function in the maintenance of multipotency of hematopoietic cells. We also showed that the polycomb complexes oncogenic exert oncogenic as well as tumor suppressor function, depending on the cellular context.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2010 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2011 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：ポリコーム複合体、造血幹細胞、白血病幹細胞

1. 研究開始当初の背景

ポリコーム遺伝子 *Bmi1* に関し申請者らは以下のような研究成果をあげてきた実績があり、これをもとに本研究を計画した。

(1) *Bmi1* 遺伝子欠損マウスの解析から、*Bmi1* が造血幹細胞の自己複製の維持に必須であるとともに、*Bmi1* を強制発現することにより造血幹細胞を増幅しうることを示した (*Immunity* 21, 843, 2004)。*Bmi1* による造血幹細胞制御において重要な標的遺伝子が癌抑制遺伝子 *Ink4a/Arf* であり、造血幹細胞の機能異常は、*Ink4a* と *Arf* の両遺伝子を欠損し

た場合 (*Bmi1^{-/-}Ink4a-Arf^{-/-}*) に正常に回復することを見出した。 (*J Exp Med* 203, 2247, 2006)。また、*Bmi1* が肝細胞癌の癌幹細胞においても重要な自己複製分子として機能することを明らかにした (*Cancer Res* 68, 7742, 2008; *Gastroenterology* 133, 937, 2007)。

(2) 自己複製能を保持する *Bmi1^{-/-}Ink4a-Arf^{-/-}* 造血幹細胞の解析より、*Bmi1* 遺伝子欠損造血幹細胞・多能性前駆細胞において *EBF1*, *Pax5* 以降の B 細胞分化遺伝子の発現がドミノ的に脱抑制していることを見出した。*EBF1*, *Pax5* は B 細胞分化の極めて重要な転写因子

であり、正常レシピエントに移植した *Bmi1^{-/-}Ink4a-Arf^{-/-}* 造血幹細胞は明らかにリンパ球への分化が亢進しており、リンパ球分化においては B 細胞分化が亢進し、T 細胞分化が著明に抑制されていることが確認された。以上の知見は、*Bmi1* が *EBF1*, *Pax5* の発現抑制を介して造血幹細胞のリンパ球へのコミットメントを抑制的に制御していることを示している。興味深いことに、造血幹細胞数は減少しており、未分化性の維持にも障害がある可能性が考えられる。

2. 研究の目的

幹細胞を含めた細胞機能が、クロマチン機能制御を介した遺伝子発現のエピジェネティクスによって決定されることが理解され、その分子基盤が明らかになりつつある。ポリコーン群蛋白はヒストンの化学的修飾を介して標的遺伝子座の発現を抑制する。核内で複合体を形成し、*PRC1* と *PRC2* の 2 つの複合体に大別され、それぞれヒストン H2AK119 のモノユビキチン化と H3K27 トリメチル化の活性を有する。ポリコーン複合体は、組織幹細胞の自己複製能の維持に必須であるとともに、その発現亢進が発癌に関与することが明らかとなり、正常および癌の幹細胞の両面から注目されている。申請者らは *PRC1* の構成分子である *Bmi1* の造血幹細胞における機能解析を行い、その重要性を報告してきた。しかしながら、その機能に関しては未だ不明な点が多い。本研究においては、ポリコーン複合体による造血幹細胞および白血病幹細胞の制御機構の解明を通して、再生医療や癌幹細胞治療につながる研究成果を目指す。

3. 研究の方法

・ 未分化性維持における役割

前述のように、自己複製能を保持する *Bmi1^{-/-}Ink4a-Arf^{-/-}* 造血幹細胞によって再構築された造血においては、造血幹細胞・多能性前駆細胞のリンパ球への分化が亢進している。この際、造血幹細胞数は 1/3 程度に減少しており、リンパ球分化プログラムの活性化のために造血幹細胞の未分化性の維持に障害がある可能性が考えられ、この点を検証する。さらに、*Bmi1^{-/-}Ink4a-Arf^{-/-}* 造血幹細胞で再構築されたレシピエントマウスを長期的に観察すると、ほぼ全例が骨髄線維症にて死亡する。*Bmi1* 欠損細胞の骨髄球分化において、赤芽球・巨核球前駆細胞への分化が亢進し過剰な巨核球産生が起こっている予備的なデータが得られており、骨髄線維症の原因としてこの点を検証する。

・ 白血病幹細胞における *Bmi1* の標的遺伝子の同定

GMP を MLL-AF9 によって形質転換し、移植マウスにおける白血病発症を解析したとこ

ろ、*Bmi1^{-/-}GMP* は白血病を発症せず、*Bmi1^{-/-}Ink4a-Arf^{-/-} GMP* は発症するもののその効率は低い。これは、*Ink4a-Arf* 以外にも *Bmi1* が制御する重要な標的遺伝子があることを示している。そこで、形質転換した *Ink4a-Arf^{-/-} GMP* と *Bmi1^{-/-}Ink4a-Arf^{-/-} GMP* の白血病幹細胞分画を用いて cDNA マイクロアレイ解析を行い、*Bmi1* が制御する遺伝子群をリストアップした。これらの *Bmi1* 標的遺伝子群の中から、白血病幹細胞に重要な遺伝子を同定する。

・ *PRC2* 構成分子 *Ezh1/Ezh2* の造血幹細胞および白血病幹細胞における機能

ポリコーン複合体 (*PRC1*, *PRC2*) のうち *PRC2* も造血・白血病幹細胞において重要な機能を有すると想定される。*PRC2* の中心分子である *Ezh2* の遺伝子欠損マウスを用いて、*PRC2* の機能を検証する。

4. 研究成果

転写因子 *Ebf1*, *Pax5* の発現により B 細胞分化が最終決定される以前の未分化な造血細胞において、ポリコーン群蛋白 *Bmi1* が *Ebf1*, *Pax5* の発現抑制状態を維持することにより分化の多能性が維持されることが明らかとなった。すなわちクロマチン免疫沈降法 (ChIP) を用いた PcG の *Ebf1*, *Pax5* プロモーターへの局在と同プロモーターのヒストン修飾制御 (K4me3, K9Ace, K27me3, H2AK119) の詳細な解析から、ES 細胞に認められる bivalent domain 様ヒストン修飾による可逆的な遺伝子発現抑制と多能性維持が、造血幹細胞においても見られることを確認した (Cell Stem Cell 2010)。この現象が B 細胞系への分化に限らず造血幹細胞の分化全般に当てはまるものであるのか今後の検証課題である。

ポリコーン複合体 *PRC2* の構成分子である *Ezh2* 遺伝子をノックアウトしたマウスの解析から、ポリコーンによる造血幹細胞のエピジェネティック制御の様式が胎仔肝と骨髄において異なることが示された。すなわち、増幅期にある胎仔肝の造血幹細胞は *PRC2* 複合体の *Ezh2* への依存性が強く、*Ezh1* の関与は低い。一方静止期にある骨髄の造血幹細胞では *Ezh1* に加えて *Ezh1* と *PRC1* の機能が高まることが明らかとなった (Blood 2011)。また、ヒストン脱メチル化酵素の発現解析を造血系細胞において行った。その結果 *Fbxl10* (*H3K36me2* の脱メチル化酵素) の発現が未分化造血細胞に限局していることが明らかとなった。*Fbxl10* は *PRC1* と会合しうることが最近報告されたことから、造血幹細胞に重要な機能が予想された。そこで造血幹細胞への強制発現系を用いた解析を行い、*Fbxl10* が造血幹細胞の機能維持に関わることを確認した。この機能はヒストン *H3K36me2* の脱メチル化を介するものであり、*PRC1* 機能との

協調作用も示唆された(**Exp Hematol** 2011)。

白血病遺伝子による造血前駆細胞の白血病幹細胞へのリプログラミングは、自己複製能の再獲得という観点から、体細胞の多能性幹細胞へのリプログラムと非常に似た現象と言える。白血病幹細胞へのリプログラミング過程における *Bmi1* の役割を検討した結果、*Bmi1* による一連の癌抑制遺伝子の発現抑制が白血病幹細胞の形質獲得を完遂する上で重要であることが示された (**Leukemia** 2011)。また、*Ink4a/Arf* 欠損マウスにおいて同時に *Bmi1* を欠損させると致死性の骨髄線維症を誘発すること、その際 *Hmga2* のような癌遺伝子の発現が脱抑制することから、*Bmi1* が癌抑制遺伝子としても機能しうることを見出した (**J Exp Med**, 2012)。

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 23 件)

- ① Oguro H, Yuan J, Tanaka S, Miyagi S, Mochizuki-Kashio M, Ichikawa H, Yamazaki S, Koseki H, Nakauchi H, and Iwama A. Lethal myelofibrosis induced by *Bmi1*-deficient hematopoietic cells unveils a tumor suppressor function of the polycomb group genes. **J Exp Med** 209, 445-454, 2012. (査読有)
- ② Mochizuki-Kashio M, Mishima Y, Miyagi S, Negishi M, Saraya A, Konuma T, Shinga J, Koseki H, and Iwama A. Dependency on the polycomb protein Ezh2 distinguishes fetal from adult hematopoietic stem cells. **Blood** 118, 6553-6561, 2011. (査読有)
- ③ Yamazaki S, Ema H, Karlsson G, Yamaguchi T, Miyoshi H, Shioda S, Taketo MM, Karlsson S, Iwama A, and Nakauchi H. Non-myelinating Schwann cells in the mouse bone marrow niche maintain haematopoietic stem cell hibernation through TGF- β signaling. **Cell** 147, 1146-1158, 2011.(査読有)
- ④ Mishima Y, Miyagi S, Saraya A, Negishi M, Endoh M, Endo TA, Toyoda T, Shinga J, Katsumoto T, Chiba T, Yamaguchi N, Kitabayashi I, Koseki H, and Iwama A. The Hbo1-Brd1/Brpf2 complex is responsible for global acetylation of H3K14 and required for fetal liver erythropoiesis. **Blood** 118, 2443-2453, 2011. (査読有)
- ⑤ Chiba T, Suzuki E, Negishi M, Saraya A, Miyagi S, Konuma T, Tanaka S, Tada M, Kanai F, Imazeki F, Iwama A, and Yokosuka O. 3-deazaneplanocin is a promising therapeutic agent for the eradication of tumor-initiating hepatocellular carcinoma cells. **Int J Cancer** 2011 Jun 29. [Epub ahead of print].(査読有)
- ⑥ Yuan J, Takeuchi M, Negishi M, Oguro H, Ichikawa H, and Iwama A. *Bmi1* is essential for leukemic reprogramming of myeloid progenitor cells. **Leukemia** 25, 1335-1343, 2011. (査読有)
- ⑦ Konuma T, Nakamura S, Miyagi S, Negishi M, Chiba T, Oguro H, Yuan J, Mochizuki-Kashio M, Ichikawa H, Miyoshi H, Vidal M and Iwama A. Forced expression of the histone demethylase Fbxl10 maintains self-renewing hematopoietic stem cells. **Exp Hematol** 39, 697-709, 2011. (査読有)
- ⑧ Takeda Y, Nakaseko C, Tanaka H, Takeuchi M, Yui M, Saraya A, Miyagi S, Wang C, Tanaka S, Ohwada C, Sakaida E, Yamaguchi N, Yokote K, Hennighausen L, and Iwama A. Direct activation of STAT5 by ETV6-Lyn fusion protein promotes induction of myeloproliferative neoplasm with myelofibrosis. **Br J Haematol** 153, 589-598, 2011.(査読有)
- ⑨ Guo Y, Miyazaki M, Itoi M, Satoh R, Iwama A, Amagai T, Kawamoto H, Kanno M. Polycomb group gene *Bmi1* plays a role in the growth of

- thymic epithelial cells. **Eur J Immunol** 41, 1098-1107, 2011. (査読有)
- ⑩ Konuma T, Oguro H, and Iwama A. Role of polycomb group proteins in hematopoietic stem cells. (Review) **Dev Growth Differ** 52, 505-516, 2010.(査読有)
- ⑪ Negishi M, Saraya A, Mochizuki S, Helin K, Koseki H, and Iwama A. A novel zinc finger protein Zfp277 mediates transcriptional repression of the *Ink4a/Arf* locus through polycomb repressive complex 1. **PLoS ONE** 5: e12373, 2010. (査読有)
- ⑫ Chiba T, Seki A, Aoki R, Ichikawa H, Negishi M, Miyagi S, Oguro H, Saraya A, Kamiya A, Nakauchi H, Yokosuka O, and Iwama A. The polycomb-group gene *Bmi1* promotes hepatic stem cell expansion and tumorigenicity in both *Ink4a/Arf*-dependent and independent manners. **Hepatology** 52, 1111-1123, 2010.(査読有)
- ⑬ Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, Suzuki H, Ishikawa Y, Choi YL, Ueno T, Soda M, Hamada T, Haruta H, Takada S, Miyazaki Y, Kiyoi H, Ito E, Naoe T, Tomonaga M, Toyota M, Tajima S, Iwama A, and Mano H. Array-based genomic resequencing of human leukemia. **Oncogene** 24, 3723-3731, 2010.(査読有)
- ⑭ Sugawara T, Oguro H, Negishi M, Morita Y, Ichikawa H, Iseki T, Yokosuka O, Nakauchi H, Iwama A. FET family proto-oncogene *Fus* contributes to self-renewal of hematopoietic stem cells. **Exp Hematol.** 38, 696-706, 2010.(査読有)
- ⑮ Koizumi T, Negishi M, Nakamura S, Oguro H, Satoh K, Ichinose M, and Iwama A. Depletion of *Dnmt1*-associated protein 1 triggers DNA damage and compromises the proliferative capacity of hematopoietic stem cells. **Int J Hematol** 91, 611, 2010. (査読有)
- ⑯ Aoki R, Chiba T, Miyagi S, Negishi M, Konuma T, Taniguchi H, Ogawa M, Yokosuka O, and Iwama A. The polycomb-group gene product *Ezh2* regulates proliferation and differentiation of murine hepatic stem/progenitor cells. **J Hepatology** 52, 854-863, 2010. (査読有)
- ⑰ Oguro H, Yuan J, Ichikawa H, Ikawa T, Yamazaki S, Kawamoto H, Nakauchi H, and Iwama A. Poised lineage specification in multipotent hematopoietic stem and progenitor cells by the polycomb protein *Bmi1*. **Cell Stem Cell** 6, 279-286, 2010. (査読有)
- ⑱ Tanaka H, Takeuchi M, Takeda Y, Sakai S, Oda K, Abe D, Ohwada C, Ozawa S, Sakaida E, Shimizu N, Saito Y, Miyagi S, Iwama A, and Nakaseko C. Identification of a novel TEL-Lyn fusion gene in primary myelofibrosis. **Leukemia** 24, 197, 2010. (査読有)
- ⑲ Negishi M, Chiba T, Saraya A, Miyagi S, and Iwama A. DMAP1 is essential for the recruitment of *Pcna* to repair foci. **Genes Cells** 14, 1347-1357, 2009. (査読有)
- ⑳ Komatsu S, Takenobu H, Ozaki T, Ando K, Koida N, Suenaga Y, Ichikawa T, Hishiki T, Chiba T, Iwama A, Yoshida H, Ohnuma N, Nakagawara A and Kamijo T. *Plk1* regulates liver tumor cell death by phosphorylation of *TAp63*. **Oncogene** 28, 3631-3641, 2009.(査読有)
- ㉑ Xiao W, Hong H, Kawakami Y, Kato Y, Wu D, Yasudo H, Kimura A, Kuwabara H, Bertoli LF, Davis RS, Chau LA, Madrenas J, Hsia CC, Xenocostas A, Kipps TJ, Hennighausen L, ㉒ Tumor suppression by phospholipase C- β 3 via

SHP-1-mediated dephosphorylation of Stat5. **Cancer Cell** 16, 161-171, 2009. (査読有)

- ② Chiba T, Kamiya A, Yokosuka O, and Iwama A. Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma: recent progress and perspective. **Cancer letters**, 286, 145-153, 2009.(査読有)
- ③ Yonemitsu Y, Imazeki F, Chiba T, Fukai K, Nagai Y, Miyagi S, Arai M, Aoki R, Miyazaki M, Nakatani Y, Iwama A., Yokosuka O. Distinct expression of polycomb group proteins EZH2 and BMI1 in hepatocellular carcinoma. **Hum Pathology** 40, 1304-1311, 2009.(査読有)

[学会発表] (計 14 件)

- ① 岩間厚志 (2011) 関連分野セミナー「エピジェネティクス update」第 40 回日本免疫学会学術集会 11 月 27 日 (千葉)
- ② 岩間厚志 (2011) 教育講演「血液疾患と Epigenetics」第 96 回近畿血液学地方会 11 月 20 日 (大阪)
- ③ 岩間厚志 (2011) 教育講演「造血器腫瘍のエピゲノム」第 73 回日本血液学会総会 10 月 14 日 (名古屋)
- ④ 岩間厚志 (2011) 「ヒト造血幹細胞の体外増幅の可能性」第 21 回日本サイトメトリー学会学術集会会長シンポジウム「ヒト造血幹細胞に関する研究：最近の進歩」6 月 25 日 (京都)
- ⑤ 岩間厚志 (2011) 「造血幹細胞のエピジェネティクス」第 32 回日本炎症・再生医学会シンポジウム「疾患と再生における幹細胞生物学の新展開」6 月 2 日 (京都)
- ⑥ Iwama A. (2011) Polycomb complexes in normal and abnormal hematopoiesis. USA-Japan Cooperative Cancer Research Workshop, "Molecular targeted therapy for cancer stem cell" February 25-27, 2011, (Hayama)

- ⑦ 岩間厚志 (2011) ワークショップ「ヒト造血幹細胞の体外増幅の可能性」第 34 回日本造血細胞移植学会総会 2 月 24 日 (大阪)
- ⑧ Iwama A. (2010) Regulation of hematopoietic stem cells by the polycomb repressive complexes. International conference on stem cells and cancer (ICSCC-2010). December 11-14, (Pune, India)
- ⑨ 岩間厚志 (2010) Role of polycomb group proteins in the maintenance of self-renewal capacity and multipotency of hematopoietic stem cells. 第 33 回 MCS23 日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会シンポジウム「発生・分化におけるエピジェネティクス制御」12 月 7 日 (神戸)
- ⑩ 岩間厚志 (2010) 「新規標的分子としてのポリコム複合体」第 48 回日本癌治療学会学術集会シンポジウム「がん幹細胞医学からがん根治療法への発展」10 月 28 日～30 日 (京都)
- ⑪ Iwama A. (2010) Role of the polycomb proteins in normal and cancer stem cells. The 15th Samsung International Symposium on Molecular Medicine. "Cancer metastasis and cancer stem cell biology" October 8-9, (Seoul)
- ⑫ 岩間厚志 (2010) 「ポリコム複合体による造血幹細胞の多能性維持機構」第 9 回日本再生医療学会総会シンポジウム「エピジェネティクス研究」3 月 18 日～19 日 (広島)
- ⑬ 岩間厚志 (2009) 「新規標的分子としてのポリコム複合体」第 71 回日本血液学会シンポジウム「癌分子標的療法の新展開」10 月 23 日～25 日 (京都)

- ⑭ 岩間厚志 (2009) 「癌幹細胞のエピジェネティクスとポリコム遺伝子」第 68 回日本癌学会学術総会シンポジウム「がん幹細胞の生物学的特性の理解と治療」10 月 3 日 (横浜)

[図書] (計 5 件)

- ① 指田吾郎、岩間厚志 (2011) 「造血」疾患モデルマウス表現型解析指南 (山村研一、若菜茂晴編集) pp.248-253, 中山書店, 東京.
- ② 小沼貴晶、岩間厚志 (2011) 「白血病幹細胞の維持機構」実験医学増刊号 Vol29 No20 「がん幹細胞」(須田年生編集), pp. 87-95. 羊土社, 東京.
- ③ 大澤光次郎、大津真、岩間厚志 (2010) 「造血幹細胞と再生医療」実験医学1月増刊号 Vol28 No2 「再生医療の最前線2010～ES・iPS・組織幹細胞の特性の理解と分化誘導、創薬・臨床応用に向けた品質管理、安全性の基盤技術」(中辻憲夫、中内啓光監修), pp. 113-120. 羊土社, 東京.
- ④ 岩間厚志 (2009) 「造血系癌幹細胞 (白血病幹細胞)」 「炎症・再生医学辞典」(松島綱治、西脇徹編) pp.430-432, 朝倉書店, 東京 (2009)
- ⑤ 岩間厚志 (2009) 「白血病幹細胞」「造血器腫瘍アトラス」(阿部達生編) pp.37-43, 日本医事新報社, 東京 (2009)

[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

(2) 研究分担者

宮城 聡 (MIYAGI SATORU)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：20400997

(3) 連携研究者

小黒 秀行 (OGURO HIDEYUKI)
千葉大学・大学院医学研究院・博士研究員
研究者番号：なし
望月 (檜尾) 牧子 (MOCHIZUKI MAKIKO)
千葉大学・大学院医学研究院・博士研究員
研究者番号：なし