

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08368

研究課題名（和文）若年性骨髄単球性白血病におけるPTPN11遺伝子変異によるメチル化調節機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanism of methylation by PTPN11 mutation in juvenile myelomonocytic leukemia

研究代表者

松田 和之（Matsuda, Kazuyuki）

信州大学・学術研究院保健学系・教授

研究者番号：00647084

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：若年性骨髄単球性白血病（JMML）において高頻度に認められるPTPN11変異のメチル化への影響を明らかにすることを目的とした。PTPN11変異の有無のみ異なるJMML由来iPS細胞および、それらをゲノム改変により変異修復や変異導入したiPS細胞を用いて、CD34陽性細胞を分化誘導した。効率的なCD34陽性細胞への分化誘導と細胞からの高濃度のゲノムDNAの抽出が可能になり網羅的メチル化解析を行うことができた。その結果、PTPN11変異の有無によってメチル化率が増加あるいは減少する遺伝子群が明らかになった。PTPN11変異によるメチル化調節機構の解明には更なる検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

JMML由来のiPS細胞を用いた研究は、細胞株のないJMMLの病態解明に寄与できると考えられる。本研究ではPTPN11変異有無のみ異なるiPS細胞から分化誘導したCD34陽性細胞を使用した網羅的メチル化解析を行い、直接的にPTPN11変異の有無によるメチル化への影響について解析した。変異陽性（導入）細胞でメチル化率が増加する遺伝子群と変異陰性（修復）細胞でメチル化率が増加する遺伝子群を明らかになり、今後、これらの遺伝子の機能分類を行うと伴にPTPN11変異によるメチル化調節機構の解明を行うことで難治性のJMMLの新たな治療薬等の開発につながる可能性もある。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to clarify the effect of PTPN11 mutation, which is frequently observed in juvenile myelomonocytic leukemia (JMML), on methylation. CD34-positive cells were induced to differentiate using JMML-derived iPS cells that differ only in the presence or absence of the PTPN11 mutation, and iPS cells that were mutation-repaired or mutagenized by genomic modification. Efficient induction of differentiation into CD34-positive cells and extraction of high-concentration genomic DNA from the cells enabled us to perform comprehensive methylation analysis. The results revealed a group of genes whose methylation rate increased or decreased depending on the presence or absence of PTPN11 mutation. Further studies are needed to elucidate the mechanism of methylation regulation by PTPN11 mutation.

研究分野：血液疾患における遺伝子、染色体解析

キーワード：若年性骨髄単球性白血病 PTPN11 メチル化 iPS細胞 ゲノム改変

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

若年性骨髄単球性白血病 (JMML) では、RAS-MAPK シグナル経路に関わる遺伝子群の変異が認められる。最も頻度の高い *PTPN11* 変異陽性例は予後不良であるが、その原因は不明である。高メチル化群は *PTPN11* 変異陽性であり予後不良である。申請者は、*PTPN11* 変異が高メチル化を誘導し広範囲な遺伝子群の発現を変化させることで腫瘍細胞の生存に有利に働き、治療抵抗性や再発など予後不良な臨床像を呈すると仮説を立てた。我々は *PTPN11* 変異の有無のみ異なる JMML 由来 iPS 細胞を樹立し、それらをゲノム改変により変異修復や変異導入した iPS 細胞を作製した。直接的に *PTPN11* 変異によるメチル化への影響・機構を解析できる最適な研究試料を使用して研究が遂行できると考えた。これらの iPS 細胞から CD34 陽性細胞を分化誘導し、それらから抽出したゲノム DNA を使用し、網羅的なメチル化解析によりゲノムワイドなメチル化状態の比較を行うことを計画した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、*PTPN11* 変異によるメチル化への影響、調節機構を明らかにし、予後不良の原因のみならず、病因や特徴的臨床所見の分子基盤も明らかにすることであった。

### 3. 研究の方法

#### (1) 本研究に用いたゲノム改変 iPS 細胞の種類

本研究では、我々が樹立した 4 種類の iPS 細胞を使用した (文献 1)。4 種類の iPS 細胞は、JMML 患者由来の *PTPN11* 変異陽性 iPS 細胞 (以下、No.1)、JMML 患者由来の *PTPN11* 変異陰性 iPS 細胞 (以下、No.2)、No.1 の *PTPN11* 変異をゲノム編集により修復した *PTPN11* 変異修復 iPS 細胞 (以下、1-11)、No.2 に *PTPN11* 変異をゲノム編集により導入した *PTPN11* 変異導入 iPS 細胞 (以下、2-5) であった。*PTPN11* 変異のゲノム編集にはジンクフィンガーヌクレアーゼが用いた。また、いずれの細胞も *PTPN11* 変異以外のエクソン部分の変異が無いことが確認した (文献 1)。

#### (2) オンフィーダーによる iPS 細胞の培養

60 mm ディッシュに ReproCoat (REPROCELL) を用いて 37℃、一晩コーティングを行い、フィーダー細胞として mouse embryonic fibroblast (MEF, REPROCELL) を播種し、その上に No.1、1-11、No.2、2-5 をそれぞれ播種した。培養には basic fibroblast growth factor (bFGF, REPROCELL) を終濃度 5 ng/mL で添加した ReproStem (REPROCELL) を用いた。iPS 細胞は 37℃、5 %CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養し、7 日ごとに継代を行った。培養液は継代 2 日後から毎日交換した。また、継代前日の培養液交換と継代後には ReproStem に Y-27632, MF (FUJIFILM Wako) を終濃度 10 μM で添加した。

#### (3) iPS 細胞からの CD34 陽性細胞分化培養、細胞回収およびゲノム DNA 抽出

iPS 細胞からの CD34 陽性細胞分化培養：6 well プレートに StemSure® 0.1 w/v% Gelatin Solution (FUJIFILM Wako) を用いて 37℃、一晩コーティングを行い、マイトマイシン C 処理した AGM-S3 (AGM X Kyowa Kirin) をフィーダー細胞として播種した。マイトマイシン C 処理は、10 cm ディッシュで培養した AGM にマイトマイシン C (Sigma-Aldrich) を終濃度 10 ng/mL で添加し、37℃、5 %CO<sub>2</sub> インキュベーターで 3 時間インキュベートして行った。AGM 播種の翌日に、No.1、1-11、No.2、2-5 のコロニーをそれぞれ 30 コロニーずつピックアップして AGM を播種した 6 well プレートに播種し、37℃、5 %CO<sub>2</sub> インキュベーターで 2 週間培養した。iPS 細胞の CD34 分化培養の培養液には Human stem cell factor (SCF, Miltenyi Biotec)、HumanKine® recombinant human bone morphogenetic protein-4 protein (BMP-4, Proteintech)、Human vascular endothelial growth factor (121 aa) (VEGF, Miltenyi Biotec)、Human thrombopoietin (TPO, Miltenyi Biotec) をそれぞれ終濃度 50 ng/mL、40 ng/mL、10 ng/mL、10 ng/mL で添加した 10%FBS 含 Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM X Sigma-Aldrich) を用いて、培養液は 2 日に 1 回半量交換を行った。また、コロニーの播種当日のみに、Y-27632, MF を終濃度 10 μM で添加した。

CD34 陽性細胞回収：分化培養を行った後、細胞剥離液 (REPROCELL) を添加し、入念なピペティングにより細胞をほぐす操作を繰り返した。その後、Pre-Separation Filters (30 μm) (Miltenyi Biotec) を通し、CD34 MicroBead Kit UltraPure, human (Miltenyi Biotec) を用いて磁気分離による CD34 陽性細胞の回収を行った。

ゲノム DNA 抽出：回収した CD34 陽性細胞を QIAamp® DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) を用いてゲノム DNA を抽出した。

#### (4) 網羅的メチル化解析

抽出したゲノム DNA を用いて、DNA メチル化解析 (ビーズアレイ法) により網羅的メチル化解析を行った (TAKARA Bio へ解析委託)。解析対象になったヒトゲノムシトシンサイト (プローブ数) は 863,687 個であった。メチル化率の差は、*PTPN11* 変異陰性 iPS 細胞である No.2 の細胞でのメチル化率をコントロールとして、残りの 3 種類の細胞 (No.1、1-11、2-5) のメチル化率との差を求めて比較解析した。ビーズアレイ解析ソフトでは、その差分が 10 %以上であるものを

有意な変化として設定した。

(5) 個別の遺伝子(本報告では Bone morphogenetic protein 4, *BMP4* の結果を示した)を対象としたダイレクトシーケンス法によるメチル化解析

Bisulfite 処理および PCR: 抽出したゲノム DNA を EpiTect® Plus DNA Bisulfite Kit (QIAGEN) により Bisulfite 処理した。Bisulfite 処理を行ったゲノム DNA を用いて *BMP4* 特異的なプライマーを用いて PCR 増幅した。PCR 産物を 2.5 % アガロースゲルで電気泳動し、目的遺伝子のバンドを QIAEX® Gel Extraction Kit (150) (QIAGEN) でゲル抽出した。

TA クローニングおよび形質転換: ゲル抽出した *BMP4* の解析対象配列を用いて Target Clone™ -Plus- (TOYOBO) により TA クローニングを行い、One Shot™ INV F' Chemically Competent Cells (Thermo Fisher Scientific) を用いて形質転換を行った。形質転換した大腸菌を、アンピシリン添加 LB 寒天培地を用いて 37℃、一晚培養した。大腸菌コロニーを釣菌し、アンピシリン添加 LB 液体培地を用いて 37℃、一晚振盪してミニカルチャー培養した。培養した大腸菌から QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを抽出した。

ダイレクトシーケンス法: 抽出したプラスミドを用いてシーケンス解析を行った。シーケンスには BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) を使用した。

#### 4. 研究成果

##### (1) iPS 細胞からの CD34 陽性細胞分化培養法および DNA 抽出法の改良

本研究において、iPS 細胞から分化誘導した CD34 陽性細胞を用いた網羅的メチル化解析を実施する必要があったため、効率よく iPS 細胞から CD34 陽性細胞を分化誘導し、それらの細胞から高濃度のゲノム DNA を抽出する必要であった。そこで、CD34 陽性細胞分化誘導時に使用する 4 種類のサイトカインについて、改めて、添加順序、濃度、日数を検討した。添加順序と分化日数は従前(文献 1)とし、4 種類のサイトカイン濃度について全てのサイトカインについて 1.5 倍から 2 倍量を使用することで CD34 陽性細胞数が増えることを確認した。さらに、CD34 陽性細胞を剥離回収する際のピペット操作を繰り返すなどの操作上の細かい点まで調整することにより回収細胞数を増加させることができ、より細胞を分散化でき、その後の磁気ビーズを用いた細胞分離による回収細胞数が増加することが確認できた。その結果、高濃度のゲノム DNA を回収できるようになった(2021 年度から 2022 年度の成果)。

##### (2) 網羅的メチル化解析によるゲノムワイドメチル化状態の変化

上記の検討の結果、効率よく iPS 細胞から CD34 陽性細胞が分化誘導でき、かつ細胞剥離時の操作の工夫により高濃度のゲノム DNA を回収できたため、2022 年度末に網羅的メチル化解析(ビーズアレイ)委託解析することができた。CpG アイランド、遺伝子、およびプロンプ別のメチル化率の違いについて 4 種類の iPS 細胞由来 CD34 陽性細胞を対象にして比較解析を行った。網羅的メチル化解析の結果を図 1 に示した。

43 遺伝子において、*PTPN11* 変異を持たない細胞(1-11, No.2)と比較して *PTPN11* 変異を有する細胞(No.1 および 2-5)において高頻度にメチル化が認められた(図 1-A)。さらに、No.1 の *PTPN11* 変異を修復した 1-11 では No.1 と比較してメチル化率が低下し、No.2 に *PTPN11* 変異を導入した 2-5 では No.2 と比較してメチル化率が上昇した(図 1-A)。

また、103 遺伝子において、*PTPN11* 変異を有する細胞(No.1, 2-5)と比較して *PTPN11* 変異を持たない細胞(1-11 および No.2)において高頻度にメチル化が認められた(図 1-B)。さらに、No.1 の *PTPN11* 変異を修復した 1-11 では No.1 と比較してメチル化率が上昇し、No.2 に *PTPN11* 変異を導入した 2-5 では No.2 と比較してメチル化率が低下した(図 1-B)(2023 年度成果)。

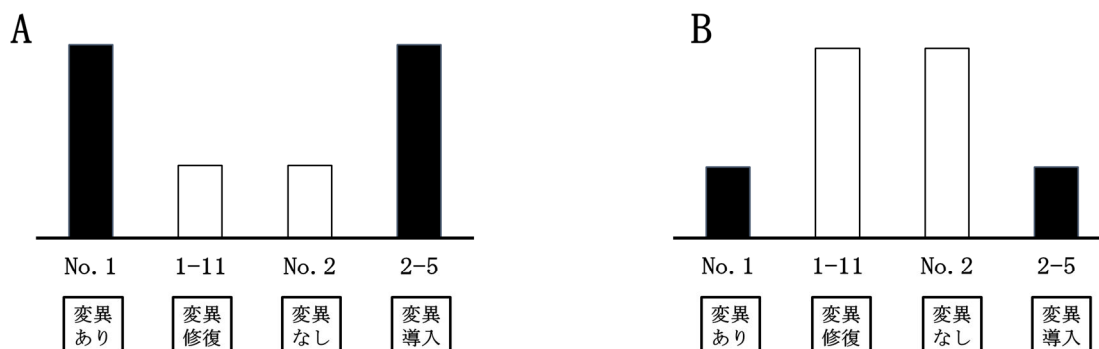


図1. 網羅的メチル化解析によるメチル化率変化の模式図

解析対象のヒトゲノムシトシンサイト(プローブ数): 863, 687個

メチル化率の差は、No. 2のメチル化率をコントロールとした。

A: 43遺伝子でNo. 1と2-5において高頻度にメチル化が認められ、変異の修復によりメチル化率が低下し、変異の導入によりメチル化率が上昇した。

B: 103遺伝子で1-11とNo. 2において高頻度にメチル化が認められ、変異の修復によりメチル化率が上昇し、変異の導入によりメチル化率が低下した。

(3) ダイレクトシーケンス法による *BMP4* メチル化状態の変化

網羅的メチル化解析の解析対象遺伝子の1つであった *BMP4* について、個別に Bisulfite 処理・ダイレクトシーケンス法によるメチル化解析を行った (CpG サイト 18 か所 (図2))。各 CpG サイトのメチル化の有無を図3に示した。各細胞における CpG サイト全体におけるメチル化 CpG サイトの割合から、*PTPN11* 変異陰性 iPS 細胞である No.2 を 1.0 としたときの相対値を求めた (図4)。求めた相対値は No.1 : 1.7、1-11 : 1.1、No.2 : 1.0、2-5 : 1.3 であった。

*PTPN11* 変異の有無で比較すると、*PTPN11* 変異陰性細胞 (No.2) に比べて *PTPN11* 変異陽性細胞 (No.1) でより高いメチル化率を示した (図4)。

ゲノム編集の有無で比較すると *PTPN11* 変異修復細胞 (1-11) では *PTPN11* 変異修復前の細胞 (No.1) と比較してメチル化率は低下した (図4)。一方、*PTPN11* 変異導入細胞 (2-5) では *PTPN11* 変異導入前の細胞 (No.2) と比較してメチル化率が上昇した (図4)。

```

TATTTTTGGAAGGTACGGCGACTAGTCGGTGCATGCTTTCT
                1 2          3
AGTACCTCCGCACCGTGGTCCCCAGGTGAGCCCCAGCGCTT
                4 5          6
CCCAGAGCTGGAGGCAGCGGCGTCCAGCTCCGACCGGCAG
                7 8          9 10
CTGCGGACTCGGGCGGTGCCTTCGGACCGGCC
                11 12 13      14 15
TGCTAGGCGAGGTCGGGCGGCTGGAGGGGAGGA
                16 17 18
    
```

図2. 解析対象とした *BMP4* 遺伝子プロモーター領域の CpG サイト

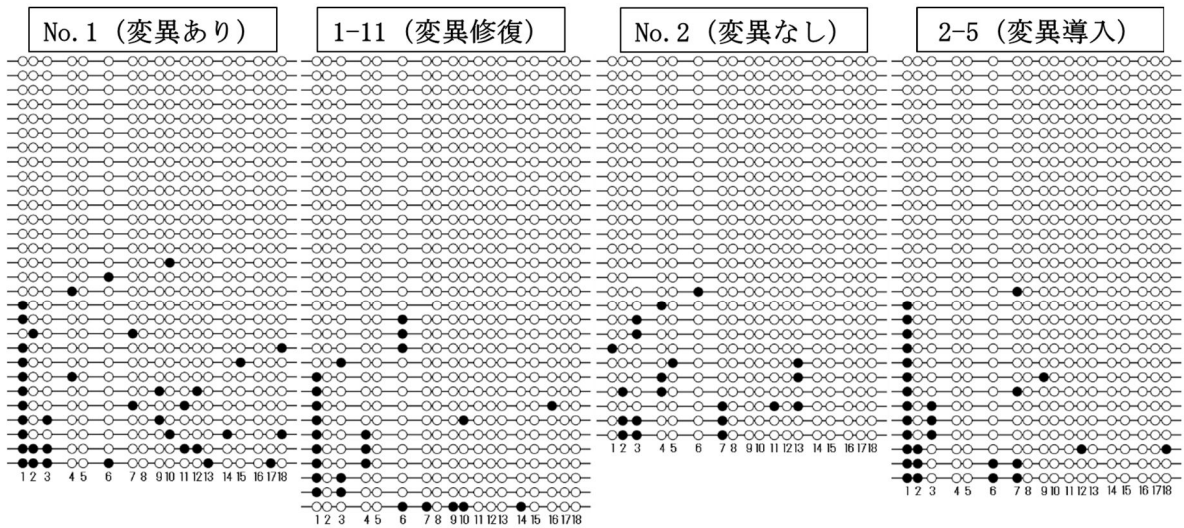


図3. *BMP4* 遺伝子各 CpG サイトのメチル化有無

○ : 非メチル化 CpG サイト  
● : メチル化 CpG サイト

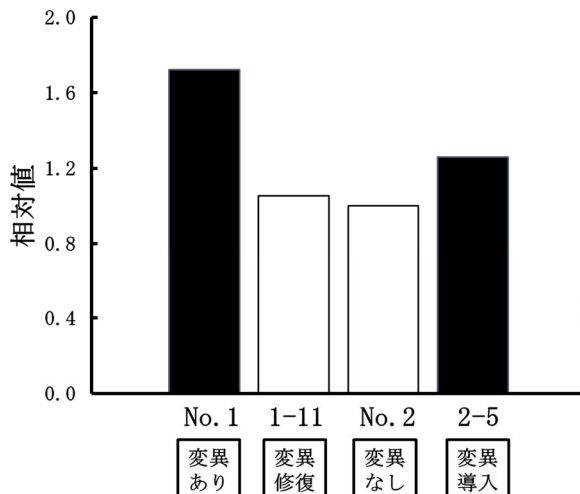


図4. *BMP4* 遺伝子メチル化率の相対値

各細胞における CpG サイト全体におけるメチル化 CpG サイトの割合から求めた、*PTPN11* 変異陰性 iPS 細胞である No.2 を 1.0 としたときの相対値を示した。

< 引用文献 >

1. Shigemura T, Matsuda K, Kurata T, Sakashita K, Okuno Y, Muramatsu H, Yue F, Ebihara Y, Tsuji K, Sasaki K, Nakahata T, Nakazawa Y, Koike K. Essential role of *PTPN11* mutation in enhanced haematopoietic differentiation potential of induced pluripotent stem cells of juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2019 Oct;187(2):163-173.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 百瀬 翠、駒村 将太郎、福地 麻衣佳、松田 和之
2. 発表標題 JMML由来iPS細胞を用いたPTPN11遺伝子変異とメチル化の関連性の解析
3. 学会等名 第69回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木奏子、松田和之、駒村将太郎
2. 発表標題 JMML由来iPS細胞を用いた 遺伝子変異とメチル化の関連性の解析
3. 学会等名 日本医療検査科学会 第53回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------