

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25年 6月 12日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22501020

研究課題名（和文）

非バイアス性ゲノムワイドアプローチを用いた新規ガン協同遺伝子の同定と解析

研究課題名（英文）

Identification and analysis of novel cancer-cooperating factors using non-biased genome-wide approach

研究代表者

内藤 拓 (NAITO TAKU)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：10568728

研究成果の概要（和文）：転写因子である Ikaros の変異はヒトやマウスにおいてリンパ腫を引き起こす。Ikaros によるリンパ腫抑制のメカニズムを明らかにするため、Ikaros 欠損細胞においてゲノムワイドに遺伝子発現、Ikaros の結合、およびヒストン修飾を調べた。その結果 Ikaros 変異ではその標的遺伝子座におけるヒストン修飾 H3K27me3 が顕著に低下していることが明らかとなった。Eed の遺伝子破壊により T 細胞特異的に H3K27me3 を消失させたところ、Eed 欠損 T 細胞は増殖刺激に対して野生型細胞と比較して細胞増殖が亢進していることが明らかとなった。このことから Ikaros 変異による TCR 下流遺伝子座での H3K27me3 の低下が増殖亢進やリンパ腫発症の一因であることが強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：Mutation of transcription factor causes T-cell lymphoma both in human and mouse. To reveal the molecular mechanism of lymphoma suppression by Ikaros, I determined the gene expression profile, and genome-wide distribution of Ikaros and various histone modifications. A number of Ikaros-target genes were found to have high level of H3K27 tri-methylation (H3K27me3), which abolish in Ikaros knockout cells. T-cell specific erasure of H3K27me3 by Eed knockout resulted in hyper-proliferation of T cells upon mitotic stimulation. Thus, it was strongly suggested that decrease of H3K27me3 at TCR-downstream genes is part of the cause of hyper-proliferation and lymphomagenesis in Ikaros mutant.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：T細胞分化、リンパ腫、エピジェネティクス、細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

Ikaros は造血幹細胞をはじめとした血球細胞、とりわけリンパ球系細胞に強く発現する

遺伝子発現調節因子である。Ikaros の変異や欠損は造血幹細胞、あるいはリンパ球系前駆細胞の減少や機能低下、B細胞の完全な欠損、

およびT細胞の過剰増殖、さらにはヘルパーT細胞系列への優先的な分化など、多岐にわたる異常を引き起こす。また Ikaros ドミナントネガティブ変異をヘテロに持つマウスはほぼ 100% T細胞性リンパ腫を発症する。興味深いことにヒトにおいてもリンパ腫において Ikaros 遺伝子の変異が高頻度に見られ、その頻度は BCR-ABL 転座を持つ T細胞性リンパ腫のサブタイプにおいては実に 80% を超えることが報告されている。したがって Ikaros は生物種を超えてリンパ腫発症抑制因子としてはたらく。Ikaros によるリンパ腫抑制機構として近年我々を含む幾つかのグループが、Notch1 遺伝子の異常な転写開始、および Notch シグナル伝達経路の下流遺伝子の両方の抑制によるものであることを明らかにした。Ikaros 変異マウスに Notch シグナル伝達経路のエフェクターである RBPJ の欠失を導入するとリンパ腫の発症が大幅に抑制されることから、Ikaros 変異によるリンパ腫発症には Notch 経路が重要な働きをしていることが明らかとなっていた。しかし Ikaros/RBPJ 二重変異マウスにおいても低頻度ながらリンパ腫が発症すること、また Notch 経路の活性化が関与しないと言われていたヒトの B細胞性リンパ腫においても Ikaros 変異が見られることから、Ikaros が Notch シグナル伝達系とは独立な経路によってもリンパ腫抑制を行っていることが示唆された。そのような経路を明らかにすることは、Ikaros 変異が関与する難治性リンパ腫の新たな治療法につながると期待された。

2. 研究の目的

本研究課題ではゲノムワイドな転写解析、およびクロマチン解析により得られたデータを元に、リンパ腫抑制に関与する Ikaros ターゲット経路を同定し、その分子生物学的な詳細を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 個々の Ikaros 標的遺伝子のリンパ腫発症における役割の解析
ゲノムワイドな遺伝子発現解析、および Ikaros の結合解析から、多数の Ikaros 標的遺伝子が同定された。これら遺伝子とその機能や発生段階における発現パターンなどによりさらに絞り込み、RNAi によるノックダウン、あるいは過剰発現を胸腺未熟 T 前駆細胞 (DN 細胞) においてレトロウィルスを利用して行い、胎児胸腺組織培養 (FTOC) による *in vitro* 分化系を用いて細胞増殖や T 細胞分化への影響を評価した。コントロールとしては Ikaros ノックダウンベクターを用いた。

(2) エピゲノム変化の Ikaros 変異表現型に対する寄与の検討
ゲノムワイドな解析は、Ikaros 標的遺伝子座

の多くが、遺伝子発現に抑制的に働くヒストン修飾であるヒストン H3 の 27 番目のリジン残基のトリメチル化 (H3K27me3) を高いレベルで保持していること、それが Ikaros 変異では Ikaros の相互作用因子である Mi-2 β の異常活性化により顕著に低下していることを明らかにした。そこでゲノムワイドな Ikaros 標的遺伝子座での H3K27me3 が細胞増殖や発ガンに及ぼす影響を検討するため、H3K27me3 を触媒する PRC2 複合体の必須サブユニットである Eed の T 細胞特異的遺伝子破壊マウスを作成し、その解析を行った。

4. 研究成果

(1) Ikaros 標的遺伝子の *in vitro* 分化系による評価

Ikaros ノックダウン RNAi ベクター、あるいはドミナントネガティブ型 Ikaros の過剰発現ベクターを DN 細胞に導入し FTOC により分化させたところ、Ikaros 変異マウスで見られる細胞増殖の亢進、および CD4 への優先的な分化が観察された。これにより実験系の妥当性が確認された。そこでゲノムワイド解析により同定された Ikaros 標的遺伝子をさらに絞り込み、約 40 の遺伝子についてノックダウン、あるいは過剰発現を行い、その細胞増殖、および T 細胞分化への影響について同様に評価した。しかし検討を行った Ikaros 標的遺伝子の単独でのノックダウン/過剰発現では Ikaros 変異で見られる表現型を再現しなかった。Ikaros は多様な標的遺伝子座を統合的に制御しているため、複数の遺伝子の制御異常が協調的に働いて過剰増殖やリンパ腫発症につながることが考えられる。したがって本アプローチとは逆のアプローチ、すなわち Ikaros 変異細胞において標的遺伝子をノックアウト/過剰発現する方法も今後検討していく必要があると思われる。

(2) H3K27me3 不全による細胞増殖の亢進
前述のように、Ikaros 変異によるリンパ腫発症には複数遺伝子の制御異常による複合的な影響の結果である可能性も考えられた。そこで (1) で述べたアプローチを補完するアプローチの一つとして、Eed 遺伝子の T 細胞特異的破壊マウスを作成し、その T 細胞分化、および増殖刺激に対する応答について検討した。具体的には T 細胞分化の胸腺 DN ステージで遺伝子組換えを起こす Lck-Cre、DP ステージで遺伝子組換えを起こす CD4-Cre を、Cre の標的配列である LoxP サイトではさんだ Eed 遺伝子と掛け合わせるにより DN、あるいは DP ステージで Eed 遺伝子を破壊した。Lck-Cre を用いた場合には DN から DP ステージへの移行、CD4-Cre を用いた場合には DP から SP ステージへの移行に顕著な阻害が観察された。いずれの系統を用いた条件的遺伝子破壊でも、Ikaros 変異で見られたような CD4+

ヘルパーT細胞への優先的な分化は見られなかった。末梢における成熟T細胞上のT細胞受容体(TCR)を抗CD3/CD28抗体を用いて活性化した場合、Eed欠損細胞は野生型と比較して細胞増殖が低下していた。Eedを含むPRC2複合体が核内でのH3K27メチル化とは別に適切なTCRシグナル伝達に必要であるという報告が過去になされており、これはそれに合致する結果である。しかしPMA/Ionomycinを用いてTCRを迂回する形で細胞を活性化した場合には、野生型と比較してEed欠損T細胞では細胞増殖が亢進していた。このような表現型はH3K27me3の低下を伴わないPRC2複合体の変異では見られなかったことから、H3K27me3の低下の影響であると考えられる。したがってIkaros変異体で見られる刺激に対する過剰増殖は、部分的にはIkaros標的遺伝子群でのH3K27me3レベルの低下によることが強く示唆された。Ikaros標的遺伝子にはTCR刺激後速やかに発現が上昇するimmediate early遺伝子が含まれるが、そのような遺伝子の多くはH3K27me3とともに遺伝子活性化にはたらくヒストン修飾であるH3K4me3にも富んでいる。このような遺伝子は定常状態ではH3K27me3が優位にはたらいて発現が抑制されているが、シグナルを受けるとH3K27me3が消失することにより発現が速やかに誘導されると考えられている。H3K27me3の低下はシグナル受容時における細胞活性化の閾値の低下につながることで予想され、これが細胞増殖の亢進につながったと考えられる。Ikaros変異による細胞増殖の亢進にも同様なメカニズムが働いていると考えられる。これまでH3K27me3レベルの上昇が発ガンあるいはガンの悪性化に関与するという報告は多数あるが、H3K27me3レベルの低下がそのように働く例はほとんど知られておらず、Eed変異マウスの解析はエピジェネティクスと発ガンの研究において概念の変更をもたらすと期待される。またPRC2複合体は抗がん剤の標的として研究されているが、その適用に関してさらなる検討が必要であることを強く示唆する。またEedの単純欠損ではTCRシグナルにも影響が出るため、H3K27me3によるシグナル応答亢進の影響が相殺されている可能性がある。今後はH3K27me3だけを特異的に阻害するEed変異マウスを作成することで、H3K27me3と発ガンの関係についてさらなる検討を行ってゆきたい。

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8件)

- ① Tanaka H*, Naito T*, Muroi S, Seo W,

Chihara R, Miyamoto C, Kominami R, Taniuchi I. (2013) Epigenetic Thpok silencing limits the time window to choose helper-lineage fate in the thymus. *EMBO J.* 32: 1183-94 doi: 10.1038/emboj.2013.47. (* equal contribution) 査読有り

- ② Naito T, Taniuchi I (2013) Roles of repressive epigenetic machinery in lineage decision of T cells. *Immunol.* 139: 151-7 doi: 10.1111/imm.12058. 査読有り

- ③ Zhang J*, Jackson AF*, Naito T*, Seavitt JR, Liu F, Dose F, Kashiwagi M, Yoshida T, Gounari F, Petrie H, Georgopoulos K. (2012) Harnessing of the Nucleosome Remodeling Deacetylase complex is required for lymphocyte development. *Nature Immunol* 13: 86-94 doi: 10.1038/ni.2150. (* equal contribution) 査読有り

- ④ Harker N, Garefalaki A, Menzel U, Ktistaki E, Naito T, Georgopoulos K, Kioussis D. (2011) Pre-TCR Signaling and CD8 Gene Bivalent Chromatin Resolution during Thymocyte Development. *J. Immunol.* 20: 719-33 doi: 10.4049/jimmunol.1003567. 査読有り

- ⑤ Naito T, Tanaka H, Naoe Y, Taniuchi I. (2011) Transcriptional control of T-cell development. *Int Immunol* 23: 661-8 doi: 10.1093/intimm/dxr078. 査読有り

- ⑥ 内藤拓 (2011) 転写因子Ikarosの変異による白血病発症のメカニズム 医学のあゆみ 237 1194-1198 査読無し

- ⑦ Naito, T.*, Taniuchi I. (2010) The network of transcription factors that underlie the CD4 versus CD8 lineage decision. *Int Immunol* 22: 791-6 doi: 10.1093/intimm/dxq436. (* corresponding author) 査読有り

- ⑧ Gomez-del Arco, P., Kashiwagi, M.*, Jackson, A. F.*, Naito, T.*, Zhang, J., Liu, F., Kee, B., Radtke, F., Redondo, J. M., Georgopoulos, K. (2010) Alternative promoter usage at the Notch1 locus supports ligand-independent signaling in T cell development and leukemogenesis. *Immunity.* 33: 685-98 doi: 10.1016/j.immuni.2010.11.008. (*equal contributions) 査読有り

[学会発表] (計9件)

- ① 内藤拓、室井佐和子、谷内一郎：細胞系

譜特異的な遺伝子サイレンサーの機能は周辺クロマチン環境に影響される。第 35 回日本分子生物学会年会（ワークショップ）「遺伝子サイレンシング：その進化的普遍性と多様性」、2012 年 12 月 14 日、福岡

- ② 直江吉則、**内藤拓**、久保久美子、土屋由加子、原恵子、古関明彦、谷内一郎：Cxcr5, ThPOK target gene, suppresses CD4+ helper T cell functions during CD8+cytotoxic T differentiation. 第 41 回日本免疫学会、2012 年 12 月 5 日、神戸
- ③ 谷内一郎、**内藤拓**、田中宏和、室井佐和子：ThPOK 遺伝子座のシス制御領域の相互作用の解析。第 22 回 Kyoto T Cell Conference、2012 年 7 月 6 日、京都
- ④ **Naito T**、Muroi S、Taniuchi I：The functions of lineage-specific silencers depend on surrounding chromatin environment. 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 14 日、横浜
- ⑤ **内藤拓**、室井佐和子、谷内一郎：T 細胞系譜特異的サイレンサーの互換性およびクロマチン環境依存性の検討。第 40 回日本免疫学会総会、2011 年 11 月 28 日、幕張
- ⑥ **内藤拓**、室井佐和子、谷内一郎：T 細胞系譜特異的サイレンサーの互換性およびクロマチン環境依存性の検討。第 21 回 Kyoto T Cell Conference、2011 年 6 月 10 日、京都
- ⑦ **Naito T**、Gomez del-Arco P、Taniuchi I、Georgopoulos K：Ikaros-regulated gene program in T cell differentiation and leukemogenesis. 第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 8 日、神戸
- ⑧ **Naito T**、Muroi S、Taniuchi I：Chromatin context-dependent modification of lineage specific silencer. 14th International Congress of Immunology、2010 年 8 月 24 日、神戸
- ⑨ 田中宏和、千原理沙、室井佐和子、宮本千鶴子、**内藤拓**、谷内一郎：ThPOK サイレンサーの機能制御機構の解明。第 20 回 Kyoto T Cell Conference、2010 年 6 月 4 日、京都

[図書] (計 1 件)

- ① **内藤拓** (2012) Ikaros ファミリータンパクと白血病 日本臨床 70 (増刊号 8) : 109-112
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23513821>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内藤 拓 (NAITO TAKU)
東邦大学・医学部・講師
研究者番号：10568728

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし