

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 2 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791071

研究課題名（和文） ヒストンアセチル化酵素 Hb01 の造血における役割

研究課題名（英文） Role of histone acetyltransferase, Hb01, in hematopoiesis

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

ヒストンアセチル化酵素を介した遺伝子制御は血液細胞の増殖・分化に重要な役割を果たす。私達は、これまで、ヒストンアセチル化酵素 Hb01 とその活性化因子である Brd1 からなる蛋白質複合体が赤血球分化に働く事を明らかにした。本研究では、造血幹細胞及び T 細胞分化における複合体の役割を検討し、Brd1-Hb01 複合体による H3K14 のアセチル化が CD8 の遺伝子発現、さらには、T 細胞分化に重要な役割を果たす事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Recent progress has clearly demonstrated the significance of transcriptional regulation by histone acetyltransferase (HAT) s in the hematopoietic system. Our previous study showed that Hb01-Brd1 HAT complex is the major H3K14 HAT required for transcriptional activation of erythroid developmental regulator genes and is dispensable for erythroid differentiation. In this study, we show that Hb01-Brd1 HAT complex also has an important role in the induction of CD8 expression and thereby the T cell differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3, 200, 000	960, 000	4, 160, 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：T 細胞分化、造血幹細胞、クロマチン、転写制御

## 1. 研究開始当初の背景

ヒストンアセチル化酵素 (Histone acetyltransferase; HAT) は造血細胞の増殖・分化に重要な役割を果たす。HAT は、構造的類似性から 4 つのサブファミリー (GNAT ファミリー、p300/CBP ファミリー、MYST ファミリー、p160 ファミリー) に分類される。MYST ファミリーに属する HAT は、活性化因子である ING 蛋白質、仲介因子 (BRPF, JADE または

EPC) 及び機能未知の EAF6 から成る蛋白質複合体として機能する。MYST ファミリーは、TIP60、MOZ、MORF、MOF、HBO1 等から構成され、ノックアウトマウス等の解析から、幹細胞の未分化性維持における役割が注目されている。TIP60、MOZ 及び MORF は、それぞれ ES 細胞、造血幹細胞、神経幹細胞の自己複製に必須の分子である事が報告されている。しかし、HBO1 に関しては、ノックアウトマウスが胎生期の初期に致死となるため、その生物

学的な機能に関しては不明な点が多い。しかし、ショウジョウバエのホモログの解析や申請者らのこれまでの研究成果から正常発生に加えて、造血細胞の増殖・分化に重要な役割を果たすと考えられる。一方で、HATの制御に関しても不明な点が多い。BRPFファミリー蛋白質群は、BRPF1、BRD1 (別名 BRPF2)、BRFF3から構成され、plant homeodomain-linked (PHD) finger、Bromo ドメイン、prolinen-tryptophan-tryptophan- proline (PWWP) ドメイン等のヒストン・クロマチン結合に関わる機能ドメインを有する。これまでの報告から、BRPF1はMOZ、ING4 (または ING5) と複合体を形成し H3HAT (特に K14) として機能すると考えられている。一方で、HBO1は、JADE1、ING4/5 と複合体を形成し H4HAT (特に K5、8、12) として機能する。さらに、我々は、赤白血病細胞株 K562 を用いて BRD1 複合体の精製・同定及びにChIP-on-chip 解析等を行い、BRD1がHBO1、ING4と蛋白質複合体を形成し、この複合体中でBRD1がHBO1とING4の結合を仲介する事、この複合体が赤血球系転写因子 (GATA1、TAL1、STAT5A 等)のプロモーター領域に共局在する事、さらに、Brd1の過剰発現が K562 細胞の赤血球分化を促進し、その活性がHBO1との結合に依存する事を明らかにした。また、Brd1 遺伝子のノックアウトマウス (Brd1KO) は胎生 13 日前後に赤芽球の分化と生存の異常により致死であった。Brd1 欠損赤芽球では Gata1、Tal1 等赤血球系転写因子の発現の減弱しており、これらのプロモーター及びに細胞内の総 H3K14Ac レベルが特異的に著しく減少していた。さらに、Brd1 欠損赤芽球の表現系は Gata1 の強制発現により部分的にレスキューされた。また、Hbo1 をノックダウンした赤芽球では、Brd1 欠損赤芽球と同様に、分化異常及びに総 H3K14Ac レベルの低下が認められた。これらの結果は、仲介因子である Brd1 が H3Ac に必須であり、BRD1-HBO1 複合体による赤血球系転写因子プロモーター領域の H3K14Ac が、転写因子群の発現及びに赤血球分化に重要な役割を果たす事を示しており、これらの結果は、既に論文として報告済みである (雑誌論文 10)。一方で、Brd1KO では胎児肝中の造血幹細胞数の減少が認められた。また、移植実験において、Brd1 欠損造血幹細胞は骨髓球及びに B 細胞系統を再構築するものの、T 細胞系統では著しい再構築の低下が認められた。この様に、Brd1 は赤血球分化のみでなく、造血幹細胞や胸腺分化等、多彩な役割を果たしていると考えられる。しかし、Brd1KO が胎生致死となる事や造血以外の組織においても Brd1 欠損の影響が

認められる事などにより Brd1 の造血組織における機能は十分な解析がなされていない。

## 2. 研究の目的

上述のように、近年、MYST HAT は幹細胞における重要性が示唆されている。しかし、Hbo1 に関しては、その検討がなされていない。また、我々は、Hbo1 が Brd1 と複合体を形成し、赤血球分化に働く事を見出した。しかし、Brd1 欠損赤芽球では H3K14Ac が特異的に減少するのに対して Hbo1 をノックダウンした赤芽球では H3K14Ac に加えて H4Ac も減少する事を見出した。従って、HAT の機能発現には結合する仲介因子が必須の役割を果たしており、その特異性が高く、BRD1-HBO1 複合体は H3HAT として、既知の JADE1-HBO1 複合体が H4HAT として機能すると考えられる。これらの結果は、HBO1 は赤血球分化に加えて、より広範な機能を有する可能性を示唆している。このような観点から、本研究では、Hbo1 遺伝子の造血における役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究では、Hbo1 及びに Brd1 のコンディショナルノックアウトマウス (cKO) を作製し、これら遺伝子の造血組織における表現系解析を中心として行い、複合体の造血組織における役割を明らかにする。また、クロマチン免疫沈降法及びにマイクロアレイによる発現解析により標的遺伝子の同定と転写制御における Brd1-Hbo1 複合体の役割を明らかにする。

## 4. 研究成果

本研究では、作製した *Brd1<sup>f/f</sup>* マウスと *Tie2-Cre* マウスを交配し造血組織特異的なノックアウトマウスを作成し、その表現系解析を行った。一方で、Hbo1 コンディショナルノックアウトマウスの作成も合わせて行ったが、作成した Flox マウスが胚性致死となったため、本研究では *Brd1<sup>f/f</sup>; Tie2-Cre* の解析を中心として行った。

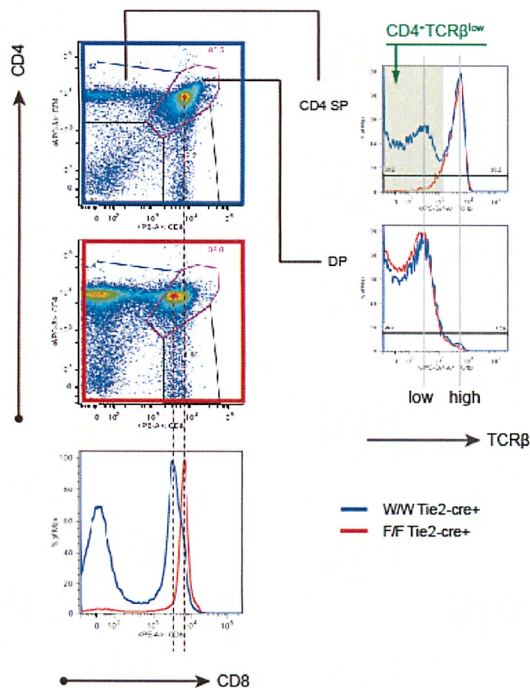
### (1) 造血幹細胞における Brd1 遺伝子の機能

*Brd1<sup>f/f</sup>; Tie2-Cre* 由来の骨髓細胞を用いて骨髓移植実験を行い、*Brd1<sup>f/f</sup>; Tie2-Cre* 造血幹細胞の生着率は T 細胞系統では著しく減少するものの、骨髓球及びに B 細胞系統ではコントロールマウス由来の骨髓細胞と同程度の生着率を示す事を見出した。また、骨髓中の造血幹細胞数には著しい減少は認められなかった。従って、*Brd1<sup>f/f</sup>; Tie2-Cre* 造血幹細胞では

造血幹細胞活性が維持されており、Brd1 遺伝子は造血幹細胞には必須では無いと考えられる。

## (2) 胸腺分化における Brd1 遺伝子の機能

上記の T 細胞系列での再構築異常の原因を明らかにするため、胸腺細胞のフローサイトメトリー解析を行った。この結果、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (DP) 細胞の減少と CD4<sup>+</sup> (CD4SP) 細胞の増加が認められ、増加した CD4SP については通常強発現しているはずの TCRβ の発現が弱い細胞集団 (CD4<sup>+</sup>TCRβ<sup>low</sup>) が著増しており、その TCRβ の発現レベルは野生型 DP と同程度であった。また、DP 及び CD8SP では野生型と比較し CD8 の発現が減弱する事を見出した (下図参照)。この CD4<sup>+</sup>TCRβ<sup>low</sup> は、1) Rag1 や Myb 等の DP 特異的遺伝子が発現している事、2) BrdU の取り込み実験の結果、増殖能を有する事等から、DP に類似の性質を持つと考えられた。この点を確認するため、次に、マイクロアレイ解析及び Agilent 社の解析ソフト GeneSpring を用いたクラスタリング解析を行い、CD4<sup>+</sup>TCRβ<sup>low</sup> が CD8 の発現しない DP である事を明らかにした。従って、*Brd1<sup>F/F</sup>;Tie2-Cre* マウスに認められる T 細胞分化異常は、主として CD8 遺伝子の転写の活性化不全に起因するものと考えられる。実際、今回観察された分化異常は、CD8 enhancer 欠



損マウスの表現型と類似するものであり、Runx1/3 や Ikaros、BAF 複合体構成因子 (Brg1 等) 等の CD8 enhancer の転写活性化に働く

因子の欠損マウスでも同様の表現型を示すことが報告されている。CD8 の活性化に関しては、BAF 複合体構成が CD8 enhancer に結合し局所的なクロマチン構造を弛緩し、次に、Runx 等の転写因子群が作用する事と考えられている。BAF 複合体のリクルート機構は明らかになっていないが、BAF 複合体の構成因子である BAF57 は、その Bromo ドメインを介して H3K14Ac に結合する事が報告されている。胸腺細胞を用いた生化学的な解析から、胸腺においても Brd1 は Hbo1 と結合しており、H3K14Ac レベルも Brd1 欠損 T 細胞で著減していることを見出している。従って、Brd1-Hbo1 複合体による H3K14 のアセチル化が BAF 複合体のリクルート、さらには、CD8 enhancer の活性化及び T 細胞分化の重要なステップである可能性を示唆している。実際、予備的なデータではあるが、Runx のパートナーである Cbfb、Brg57 等のクロマチン免疫沈降を行い、CD4<sup>+</sup>TCRβ<sup>low</sup> における、これら因子の CD8 enhancer 領域への結合が野生型 DP と比較し減弱する事を見出した。今後、これらデータを補強し、論文を投稿する予定である。

## 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 11 件)

- (1) Nakajima-Takagi, Y., Osawa, M., Oshima, M., Takagi, H., Miyagi, S., Endoh, M., Endo, T. A., Takayama, N., Eto, K., Toyoda, T., Koseki, H., Nakauchi, H. and Iwama, A. Role of SOX17 in hematopoietic development from human embryonic stem cells. *Blood* 2013; 121, 447-458. doi: 10.1182/blood-2012-05-431403. 査読有
- (2) Nakamura, S., Oshima, M., Yuan, J., Saraya, A., Miyagi, S., Konuma, T., Yamazaki, S., Osawa, M., Nakauchi, H., Koseki, H. and Iwama, A. Bmi1 confers resistance to oxidative stress on hematopoietic stem cells. *PLoS ONE* 2012; 7, e36209. doi: 10.1371/journal.pone.0036209. 査読有
- (3) 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* 2012; 130, 2557-2567. doi: 10.1002/ijc.26264. 査読有
- (4) Suzuki, E., Chiba, T., Zen, Y., Miyagi, S., Tada, M., Kanai, F., Imazeki, F., Miyazaki, M., Iwama, A. and Yokosuka, O. Aldehyde dehydrogenase 1 is associated with recurrence-free survival but not stem cell-like properties in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2012; 42, 1100-1111. doi: 10.1111/j.1872-034X. 査読有
- (5) Tanaka, S., Miyagi, S., Sashida, G., Chiba, T., Yuan, J., Mochizuki-Kashio, M., Suzuki, Y., Sugano, S., Nakaseko, C., Yokote, K., Koseki, H. and Iwama, A. Ezh2 augments leukemogenicity by reinforcing differentiation blockage in acute myeloid leukemia. *Blood* 2012; 120, 1107-1117. doi: 10.1182/blood-2011-11-394932. 査読有
- (6) Mariani, J., Favaro, R., Lancini, C., Vaccari, G., Ferri, AL., Bertolini, J., Tonoli, D., Latorre, E., Caccia, R., Ronchi, A., Ottolenghi, S., Miyagi, S., Okuda, A., Zappavigna, V. and Nicolis, SK. Emx2 is a dose-dependent negative regulator of Sox2 telencephalic enhancers. *Nucleic Acids Res* 2012; 40, 6461-6476. doi: 10.1093/nar/gks295. 査読有
- (7) 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* 2012; 209, 445-454. (\*equally contributed) doi: 10.1084/jem.20111709. 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.* 2011; 153, 589-598. doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08663.x. 査読有
- (9) 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 Fbx110 maintains self-renewing hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 2011; 39, 697-709. doi: 10.1016/j.exphem.2011.03.008. 査読有
- (10) 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 Hbol-Brd1/Brpf2 complex is responsible for global acetylation of H3K14 and required for fetal liver erythropoiesis. *Blood* 2011; 118, 2443-2453. (\*equally contributed) doi: 10.1182/blood-2011-01-331892. 査読有
- (11) 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* 2011; 118, 6553-6561. doi: 10.1182/blood-2011-03-340554. 査読有

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：