

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830081

研究課題名(和文) ヒストンメチル化制御の異常による白血病発症機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of leukemogenic mechanisms by deregulated histone methylation

研究代表者

山崎 憲政 (Yamasaki, Norimasa)

広島大学・技術センター・技術主任

研究者番号：70564136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々はヒストン脱メチル化酵素であるFbx110の造血幹細胞における高発現が白血病発症を誘導することを見いだした。この分子機構を解析する目的でFbx110を高発現する造血幹細胞を用いてRNA-seq解析を行い、細胞内輸送に関わるneuron specific gene 2 (Nsg2) 遺伝子および酸化リン酸化に関わる遺伝子群の発現が亢進していることを見いだした。さらに、ChIP解析によりこれらの遺伝子はFbx110の直接標的遺伝子であることを明らかとした。我々の結果は、ヒストンメチル化制御の異常による白血病発症機構に新しい知見をもたらしたものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：I found that overexpression of Fbx110, a histone demethylase, in hematopoietic stem cells induced leukemia. To elucidate the underlying molecular mechanisms, I isolated Fbx110-overexpressing hematopoietic stem cell and performed RNA-seq analysis. I found the enhanced expression patterns of neuron specific gene 2 (Nsg2) that is implicated in intracellular transport, and genes involved in oxidative phosphorylation. In addition, by ChIP analysis, I confirmed that these genes are direct targets of Fbx110. These results provide novel insights into the leukemogenic mechanisms from the viewpoint of intracellular transport and oxidative phosphorylation.

研究分野：分子生物学

キーワード：ヒストン脱メチル化酵素 Fbx110 トランスジェニックマウス 造血幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 白血病においては、数多くの特徴的な染色体異常が知られている。転座型の染色体異常については、ほとんどの転座関連遺伝子が単離され、その機能が解析されつつある。しかし、大きな染色体欠損を有する症例については、そこに存在する遺伝子の数が多数であるため、原因遺伝子の解明は困難であった。

第7番染色体長腕欠損(7q-)は、化学療法後や放射線療法後に発症する骨髄異形成症候群およびそこから派生する白血病で高頻度に認められる染色体異常である。我々は、上記の問題を解決する目的でゲノムプローブを作製し、マイクロアレイ CGH 法を用いて、7q- 責任候補遺伝子として Samd9L を単離した。さらに、我々は Samd9L 欠損マウスを作製し、このマウスは加齢に伴って血液細胞の異形成を生じ、そのうち数匹は白血病を発症することを見いだした。

(2) Samd9L 欠損マウスの造血異常には長期の潜伏期を必要とし、白血病発症には2次的な遺伝子異常の関与が想定される。この可能性を検討する目的で、Samd9L 欠損マウスにレトロウイルスを用いた retrovirus insertional mutagenesis を行なったところ、白血病発症の期間短縮と発症率の増加を認めた。ウイルス挿入部位を同定する目的で白血病細胞から抽出した DNA を用いてウイルス特異的なプライマーを用いたインバースPCRを行なったところ、興味あることにヒストン H3 の第36番目のリジン残基(H3K36)のメチル基を脱メチル化する酵素をコードする Fbx110 が同定された。Fbx110 の発現を検討したところ、白血病細胞において発現の上昇を認め、Samd9L 欠失は Fbx110 の発現増加と協調して白血病発症に関与している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

上記のように、Fbx110 はその発現上昇が白血病発症に関与している可能性が考えられる。そこで、我々は造血幹細胞で目的遺伝子を発現する Sca1 プロモーターを用いた Fbx110 トランスジェニック(Tg)マウス、およびヒストン脱メチル化酵素活性を欠失した Fbx110 のノックアウト(KO)マウスを作製した。長期観察の結果、Fbx110 KO マウスでは造血異常は認めなかったが、Fbx110 Tg マウスは全ての個体で白血病を発症した。この結果は、Fbx110 の造血幹細胞における発現上昇が白血病発症の原因となることを直接示している。しかし、Fbx110 の過剰発現がいかなる分子機構により造血幹細胞の増殖を促し、白血病発症に関与するかについては明らかではない。この研究では、我々が作製した Fbx110 の Fbx110 Tg マウスを用いて、ヒストン H3K36 脱メチル化の見地から造血細胞の維持機構およびその破綻による白血病発症機構について解明することを研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) 白血病細胞における Fbx110 の関与の確認

造血幹細胞および腫瘍臓器において Fbx110 の過剰発現の確認を行った。また、白血病細胞に対し各種抗体を用いた flow cytometry、JH および TCR プローブを用いた Southern blot により白血病の系統と monoclonality について、検討を行った。

(2) Fbx110 過剰発現によるヒストンメチル化の変化の検討

Fbx110 はヒストン H3K36 に対する脱メチル化酵素であり、Fbx110 Tg マウスの造血幹細胞では H3K36 のメチル化が低下していると想定される。このことを検証する目的で、コントロールマウスと Fbx110 Tg マウスから造血幹細胞を単離し、ヒストンを抽出してメチル化 H3K36 に対する抗体で Western blot を行った。

(3) RNA-seq を用いた Fbx110 過剰発現による遺伝子発現変化の解析

Fbx110 の過剰発現による H3K36 のメチル化の低下は、H3K36 メチル化により制御される遺伝子を脱制御し、その結果としての遺伝子発現異常が白血病発症に関与すると考えられる。Fbx110 の過剰発現による遺伝子発現変化を解析する目的で、コントロールマウスおよび Fbx110 Tg マウスから造血幹細胞を単離し、RNA を抽出して RNA-seq を行った。さらに、得られた結果について GSEA (gene set enrichment analysis) を行い、pathway 解析を行った。

(4) ChIP による Fbx110 直接標的の同定

RNA-seq は global な遺伝子変化を検出する系であり、どの遺伝子が Fbx110 の直接標的であるかについて検討する必要がある。コントロールマウスおよび Fbx110 Tg マウスから造血幹細胞を単離してホルマリンで架橋し、Fbx110 に対する抗体を用いて免疫沈降し、免疫沈降物から DNA を分離して次世代シーケンサーによりシーケンスを行い、Fbx110 がどの遺伝子のどの部分と結合しているかを解析した。この ChIP により同定された遺伝子と、上記の RNA-seq で同定された遺伝子とを比較することにより、Fbx110 の直接標的遺伝子を同定した。

(5) ヒト白血病検体における Fbx110 の発現変化の検討

Fbx110 の造血幹細胞における過剰発現はマウスにおいては白血病発症を誘導するが、実際のヒト白血病の発症に関与しているかについては不明である。この点を検証する目的で、ヒト白血病検体における Fbx110 の発現を検討した。

4. 研究成果

(1) 白血病細胞における Fbx110 の関与の確認

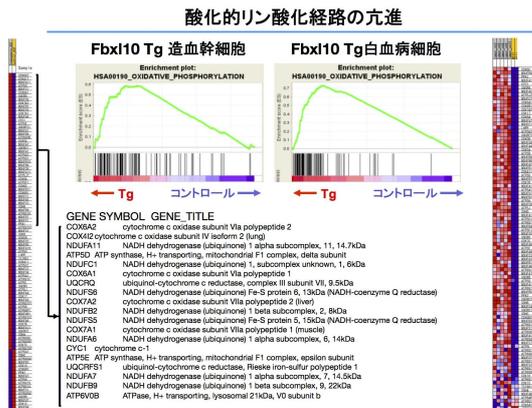
Fbx110 Tg マウスの造血幹細胞および白血病細胞において mRNA の発現解析とタグ抗体を用いたウエスタンブロットにより Fbx110 の高発現を確認した。また Lineage 解析の結果、腫瘍は myeloid または B-cell 性の腫瘍であることを明らかにした。

(2) Fbx110 過剰発現によるヒストンメチル化の変化の検討

Fbx110 はヒストン H3K36 に対する脱メチル化酵素である。抗メチル化 H3K36 抗体を用いたウエスタンブロットでは、Fbx110 Tg マウスの造血幹細胞ではヒストン H3K36 のメチル化が低下しており、Fbx110 高発現はヒストン H3K36 の低メチル化状態を介して白血病発症に関与していると考えられた。

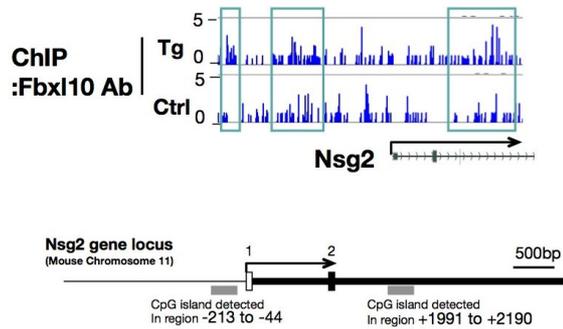
(3) RNA-seq を用いた Fbx110 による遺伝子発現変化の解析

コントロールマウスと Fbx110 Tg マウスの造血幹細胞を用いた RNA-seq では、Fbx110 Tg マウスの造血幹細胞で細胞内輸送に関わる neuron specific gene 2 (Nsg2) 遺伝子が高発現していることが明らかとなった。また、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) により解析したところ、酸化リン酸化に関わる遺伝子群の発現上昇が認められた。この酸化リン酸化は、Fbx110 Tg 白血病細胞でも亢進しており、白血病発症と維持の両方に関わっていると考えられた(下図参照)。



(4) ChIP による Fbx110 直接標的の同定

上記で発現亢進を認めた Nsg2 と酸化リン酸化に関わる遺伝子群について、コントロールマウスおよび Fbx110 マウスから造血幹細胞を単離し、抗 Fbx110 抗体を用いて ChIP 解析を行った。その結果、Nsg2 および酸化リン酸化経路に属する Ndufs6, Ndufb2, Uqcrcf1 に集積を認め、これらの遺伝子については Fbx110 の直接標的遺伝子であり、Fbx110 がその遺伝子座に結合することにより発現を誘導していると考えられた(下図参照)。



(5) ヒト白血病検体における Fbx110 の発現変化の検討

Cancer Genome Atlas (TCGA) database を用いて、ヒト白血病検体における HMP19 (ヒト Nsg2 ホモログ) と Fbx110 発現の相関について検討を行った。HMP19 はヒト白血病においてはほとんどの症例で発現を認めなかったが、発現を認める症例については Fbx110 も高発現しており、実際のヒト白血病症例においても両者は発現が相関していることが明らかとなった。

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3件)

(1) Ueda T, Nagamachi A, Takubo K, Yamasaki N, Matsui H, Kanai A, Nakata Y, Ikeda K, Konuma T, Oda H, Wolff L, Honda Z, WuX, Helin K, Iwama A, Suda T, Inaba T, Honda H. Fbx110 overexpression in murine hematopoietic stem cells induces leukemia involving metabolic activation and upregulation of Nsg2. *Blood* 査読有 2015;125 印刷中

(2) Nagamachi A, Nakata Y, Ueda T, Yamasaki N, Ebihara Y, Tsuji K, Honda Z, Takubo K, Suda T, Oda H, Inaba T, Honda H. Acquired deficiency of A20 results in rapid apoptosis, systemic inflammation, and abnormal hematopoietic stem cell function. *PLoS One*. 査読有 2014;9(1)e87425

(3) Nishibe R, Watanabe W, Ueda T, Yamasaki N, Koller R, Wolff L, Hoda Z, Ohtsubo M, Honda H. CIZ1, a p21 (Cip/Waf1)-interacting protein, functions as a tumor suppressor in vivo. *FEBS Lett*. 査読有 2013;587(10):1529-1535

[学会発表](計3件)

(1) Takeshi Ueda, Akiko Nagamachi, Yuichiro Nakata, Norimasa Yamasaki, Toshiya Inaba and Hiroaki Honda. Role of Fbx110, a histone demethylase, in MLL-AF9-induced leukemia. 第76回日本血液学会 平成26年11月2日 大阪

(2) Ken-ichiro Ikeda, Takeshi Ueda, Akiko Nagamachi, Norimasa Yamasaki, Yuichiro

Nakata, Toshiya Inaba and Hiroaki Honda
EED, a subunit of PRC2, plays an essential role
in maintenance of adult hematopoietic stem cells.
第76回日本血液学会 平成26年11月1日 大阪

(3) Yuichiro Nakata, Takeshi Ueda, Ken-ichiro
Ikeda, Norimasa Yamasaki and Hiroaki Honda
Essential roles of Jmjd3, a histone demethylase,
in normal hematopoiesis and leukemogenic
potential.
第76回日本血液学会, 平成26年11月1日 大阪

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山崎憲政 (YAMASAKI, Norimasa)
広島大学・技術センター・技術主任
研究者番号：70564136