

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293227

研究課題名(和文) ヒストンH3K27メチル化脱制御による骨髄異形成症候群発症機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of pathogenic mechanisms of myelodysplastic syndrome by deregulation of histone H3K27

研究代表者

本田 浩章 (Honda, Hiroaki)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号：40245064

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：EEDはポリコム複合体2の構成要素であり、骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndrome, MDS)で変異を認める。我々はEedコンディショナルノックアウトヘテロ(Eed+/-)マウスを作製し、MDS様の造血形態異常を認めた。また、競合的骨髄移植でEed+/-造血幹細胞はコントロール細胞に比べて高いキメラ率を示し、レトロウイルス用いた挿入変異でEed+/-マウスはコントロールマウスに比較して高い白血病発症率を示した。これらの結果は、Eedヘテロ状態はMDSを誘導すると共に、造血幹細胞の増殖能を亢進させ白血病感受性を亢進させることを示している。

研究成果の概要(英文)：EED is a component of polycomb repressive complex 2 and is found to be mutated in samples of myelodysplastic syndrome (MDS). We generated conditional heterozygous mice for Eed (Eed+/-) and found that Eed+/- mice exhibited hematopoietic abnormalities resembling MDS. In addition, in a competitive repopulation assay, Eed+/- hematopoietic stem cells (HSCs) showed higher chimerism than control HSCs, and by retrovirus-mediated insertional mutagenesis, Eed+/- mice exhibited higher incidence of leukemia than control mice. These results indicate that heterozygosity of Eed induced MDS and rendered high susceptibility to leukemia by enhancing proliferative activity of HSCs.

研究分野：血液内科学

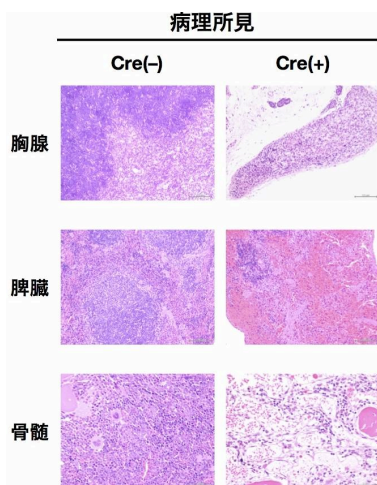
キーワード：ヒストン修飾 ポリコム複合体 EED コンディショナルノックアウトマウス 骨髄異形成症候群 白血病

1. 研究開始当初の背景

近年、造血細胞の維持・増殖・分化に、メチル化、アセチル化、ユビキチン化などのヒストン修飾が重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。我々は、骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndrome; MDS) およびその関連疾患において、ヒストン H3K27 のメチル化を司るポリコム複合体 (polycomb repressive complex 2; PRC2) の構成要素である EED (embryonic ectoderm development) 変異について解析を行なった。192 例の検体について *Eed* 遺伝子のエクソームシーケンシングを行ない、4 例にエクソン領域の一部欠失を、2 例にアミノ酸置換を伴う点突然変異 (Leu240Gln および Ile363Met) を認めた (Ueda T. et al., *Leukemia*, 2011)。さらに、これらの変異体を用いて PRC2 の機能解析を行ない、PRC2 複合体形成不全および H3K27 トリメチル化 (H3K27me3) レベル低下を認め、全ての変異体は機能低下型変異と考えられた (Ueda T. et al., *Leukemia*, 2011)。これらの結果は、EED 変異は PRC2 のヒストンメチル化活性を障害し、その結果生じる H3K27me3 の低下が MDS を含めた造血器腫瘍発症の原因となっていることを示している。

2. 研究の目的

上記の結果は、EED 機能は正常な造血細胞系の維持に重要であり、その機能欠失が MDS 発症の原因となることを示唆している。この仮説を検証する目的で、我々は造血系において後天性に誘導可能に EED を欠失するコンディショナルノックアウト (cKO) マウスを作製した。後天性に EED 機能を完全に欠失すると、造血細胞は急激な減少を来しマウスは造血不全により死亡することが明らかになった (下図参照、コントロールマウスを Cre(-)、Eed cKO マウスを Cre(+)で示す)。この結果は、EED は H3K27me3 状態を維持することにより造血細胞の生存に必須であることを示している。一方、我々が同定した EED 変異体は、全て正常 allele を残存していること



(Ueda T. et al., *Leukemia*, 2012)、EED はヘテロの状態にあると想定される。すなわち、EED は機能を全て欠失す

ると造血細胞は急激な減少を来すが、EED の発現が半分抑制されると分化異常と増殖能を獲得すると考えられる。この仮説を検証する目的で EED cKO ヘテロマウスを用いて、EED ヘテロ状態による造血系の変化について検討を行なった。

3. 研究の方法

1) EED cKO ヘテロマウスにおける MDS 発症の検討

EED cKO ヘテロマウスを長期 (1 年半~2 年) 飼育し、MDS の発症について観察を行なう。自然経過で MDS が認められない場合には、EED のヘテロ状態のみでは疾患発症には十分では無い可能性が考えられるため、レトロウイルスやアルキル化剤などによる *in vivo* mutagenesis を併用して疾患発症の有無を検討する。レトロウイルスを用いて疾患発症を認めた場合には、マウスの腫瘍細胞から DNA を抽出しウイルス特異的なプライマーを用いて PCR を行うことにより、EED ヘテロ状態と協調して機能する遺伝子の同定を行なう。

2) EED cKO ヘテロマウスにおける疾患発症が造血細胞自律的であることの検討

Eed cKO ヘテロマウスは、自然発症で、または *in vivo* mutagenesis による 2 次的な遺伝子変化と協調して MDS 発症に至ると予想される。これらのマウスにおいて EED の発現低下は全身の細胞において生じているため、疾患発症の原因が造血細胞に由来することを示すためには、骨髄移植により造血細胞のみに変異を誘導し、疾患が再現されるかどうかについて検討する必要がある。

この目的で、Ly5.2 系統の C57BL/6 マウス由来である Eed cKO ヘテロマウスの造血幹細胞を用いて、レシピエントマウスとしては Ly5.1 系統の C57BL/6 マウスを用いて骨髄移植を行なう。これらのマウスにおける末梢血のキメリズムを定期的に観察し、Eed cKO ヘテロマウス由来の造血細胞がコントロールマウス造血細胞と比較して有意な細胞増殖能を示すことを確認する。

3) EED ヘテロによる造血幹細胞における遺伝子発現変化の解析

EED cKO ヘテロマウスにおいて MDS 等の発症が認められた場合、造血幹細胞における EED 発現量の減少が下流の制御遺伝子の発現変化を誘起し、その結果として正常な増殖・分化制御を逸脱し疾患発症に至ると考えられる。

この基盤となる分子メカニズムを解析する目的で、コントロールマウスおよび EED cKO ヘテロマウスから造血幹細胞を単離し、RNA を抽出してトランスクリプトーム解析を行う。コントロール造血幹細胞と比較して EED cKO ヘテロ造血幹細胞で発現が変化している遺伝子を同定し、これらの遺

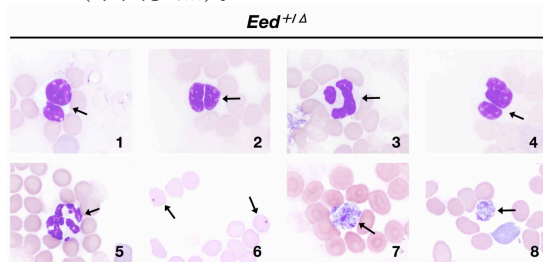
伝子について定量PCRを行い発現変化を確認する。

4) H3K27 脱メチル化酵素である JMJD3 および UTX cKO マウスの作製と、H3K27 メチル化脱制御による造血器腫瘍発症機構の総合的解析

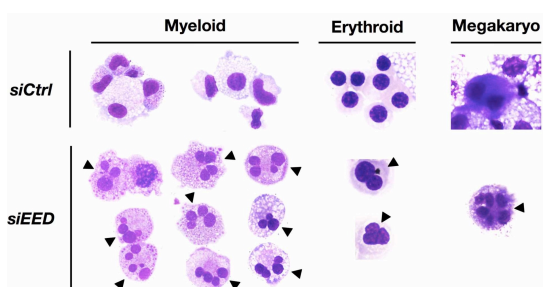
H3K27 のメチル化は、PRC2 により正に制御されていると共に、H3K27 特異的脱メチル化酵素である JMJD3 および UTX により負に制御されている。H3K27 メチル化による造血幹細胞の制御機構およびその逸脱による造血器腫瘍発症機構を明らかにするためには、これらの遺伝子操作マウスも作製し、H3K27 メチル化の亢進および抑制の両面から解析を行なうことが必要と考えられる。この目的のため、EED cKO に加えて JMJD3 cKO および UTX cKO マウスを作製し、造血細胞を中心にマウスの表現型を解析する。

4. 研究成果

EED cKO ヘテロ (*Eed*^{+/-}) マウス (を長期飼育し、定期的に造血系の解析を行なった。その結果、*Eed*^{+/-} マウスの一部に生後約一年で MDS 様の造血形態異常を呈するマウスが出現した。この結果は、EED の発現低下は MDS の誘因となりうることを示している (下図参照)。



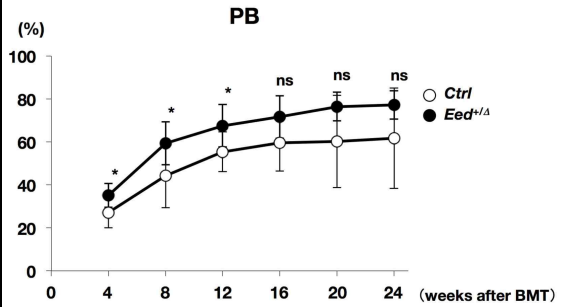
また、我々はヒト造血細胞における EED 発現と細胞形態異常との関連を検討する目的で、ヒト臍帯血由来 CD34+造血幹細胞に EED siRNA を導入し解析を行なった。*EED* siRNA 導入 CD34+造血幹細胞 (*siEED*) ではコントロール siRNA を導入した CD34+造血幹細胞 (*siCtrl*) に比較して Myeloid, Erythroid, Megakaryo の造血 3 系統で様々な形態異常を認め (下図参照)、マウスのみならずヒト造血幹細胞でも EED の発現低下は MDS を誘導することが明らかとなった。



次に、我々は *Eed*^{+/-} 造血幹細胞の増殖活性の変化について、骨髓再構築能の系を用いて検討を行なった。コントロールマウス

および *Eed*^{+/-} マウスの造血幹細胞を用いて競合的骨髓移植を行なったところ、*Eed*^{+/-} 造血幹細胞は移植早期においてコントロール造血幹細胞に比べて有意に高いキメラ率を示した (下図参照)。

この結果は、EED ヘテロ状態は MDS と共に造血幹細胞の増殖も誘導することを示している。さらに我々は *Eed*^{+/-} マウスの腫



瘍感受性を検討する目的で、コントロールマウスおよび *Eed*^{+/-} マウスにレトロウイルスである MOL4070A を感染させ、造血器腫瘍の発症について検討した。その結果、MOL4070A を感染させたコントロールマウスは 15 匹中 1 匹のみが白血病を発症したのに対し、MOL4070A を感染させた *Eed*^{+/-} マウスは 11 匹中 8 匹が白血病を発症した。発症した白血病は骨髓球系に加えて T リンパ球系であり、ヒト造血器腫瘍で *Eed* 変異が報告されている白血病のタイプに一致した。さらに我々は *Eed* ヘテロ状態と協調して白血病発症に関与する遺伝子を単離する目的で、MOL4070A を感染させた *Eed*^{+/-} マウス白血病検体 DNA を用いてウイルス挿入部位の検討を行なった。その結果、これまで白血病関連遺伝子として報告されている転写因子 *Evi1* (Ecotropic virus integration 1) が同定され、その高発現が確認された。*Eed* ヘテロ状態における *Evi1* 高発現の協調作用を検索する目的で、我々はコントロールと *Eed*^{+/-} 造血幹細胞にレトロウイルスを用いて *Evi1* を発現させ移植を行ない、白血病発症について観察を行なった。その結果 *Evi1* 高発現コントロール造血幹細胞を移植したマウスに比べて *Evi1* 高発現 *Eed*^{+/-} 造血幹細胞を移植したマウスははるかに高い確率で白血病を発症し、*in vivo* でも *Eed* ヘテロ状態と *Evi1* 高発現との協調作用が確認された。

上記の結果は、*Eed* ヘテロ状態は MDS を誘導すると共に白血病感受性を亢進させ、実際に白血病関連遺伝子の発現異常と協調して白血病発症に寄与していることを示している。この分子機構を明らかにする目的で、我々はコントロールマウスと *Eed*^{+/-} マウスから造血幹細胞を単離し、RNA を抽出してトランスクリプトーム解析を行なった。パスウェイ解析では有意な集積は認めなかったが、*Junb*, *Bcl11b*, *Tcf3* (E2A), and *Sfp1* (PU.1) など白血病で発現低下が報告されている遺伝子群についてコントロール造血幹

細胞に比較して *Eed*^{+/-} 造血幹細胞で発現が有意に低下しており、これらの遺伝子群の発現抑制が MDS および白血病感受性亢進に関与している可能性が示唆された。

現在、*Eed* cKO マウスについて更なる解析を行なうと共に、ヒストン H3K27 に対する脱メチル化酵素である JMJD3 と UTX の cKO マウスを作製し、解析を行なっている。

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 16 件)

1. Ueda T, Nakata Y, Nagamachi A, Yamasaki N, Kanai A, Sera Y, Sasaki M, Matsui H, Honda ZI, Oda H, Wolff L, Inaba T, Honda H. Propagation of trimethylated H3K27 regulated by polycomb protein EED is required for embryogenesis, hematopoietic maintenance, and tumor suppression. **Proc Natl Acad Sci USA** 113(37):10370-10375. doi: 10.1073/pnas.1600070113, 2016 査読あり
2. Ikeda K, Ueda T, Yamasaki N, Nakata Y, Sera Y, Nagamachi A, Miyama T, Kobayashi H, Takubo K, Kanai A, Oda H, Wolff L, Honda ZI, Ichinohe T, Matsubara A, Suda T, Inaba T, Honda H. Maintenance of the functional integrity of mouse hematopoiesis by EED and promotion of leukemogenesis by EED haploinsufficiency. **Sci Rep** 6:29454. doi: 10.1038/srep29454, 2016 査読あり
3. Kanda M, Yamanaka H, Kojo S, Usui Y, Honda H, Sotomaru Y, Harada M, Taniguchi M, Suzuki N, Atsumi T, Wada H, Baghdadi M, Seino K. Transcriptional regulator Bhlhe40 works as a cofactor of T-bet in the regulation of IFN- γ production in *i*NKT cell. **Proc Natl Acad Sci USA** 113(24):E3394-3402. doi: 10.1073/pnas.1604178113, 2016 査読あり
4. Sera Y, Yamasaki N, Oda H, Nagamachi A, Wolff L, Inukai T, Inaba T, Honda H. Identification of cooperative genes for E2A-PBX1 to develop acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Sci** 107(7):890-898. doi: 10.1111/cas.12945, 2016 査読あり
5. Ozawa M, Fukuda T, Nakamoto R, Honda H, Yoshida N. The histone demethylase FBXL10 regulates the proliferation of spermatogonia and ensures long-term sustainable spermatogenesis in mice. **Biol Reprod** 94(4):92. doi: 10.1095/biolreprod.115.135988, 2016 査読あり
6. Ueda T, Nakata Y, Yamasaki N, Oda H, Sentani K, Kanai A, Onishi N, Ikeda K, Sera Y, Honda ZI, Tanaka K, Sata M, Ogawa S, Yasui W, Saya H, Takita J, Honda H. ALK^{R1275Q} perturbs extracellular matrix, enhances cell invasion, and leads to the development of neuroblastoma in cooperation with MYCN. **Oncogene** 35(34):4447-58, doi: 10.1038/onc.2015.519, 2016 査読あり
7. Abedini A, Zamberlam G, Lapointe E, Tourigny C, Boyer A, Paquet M, Hayashi K, Honda H, Kikuchi A, Price C, Boerboom D. WNT5a is required for normal ovarian follicle development and antagonizes gonadotropin responsiveness in granulosa cells by suppressing canonical WNT signaling. **FASEB J** 30(4):1534-1547, doi: 10.1096/fj.15-280313, 2016 査読あり
8. Nakatsu Y, Iwashita M, Sakoda H, Ono H, Nagata K, Matsunaga Y, Fukushima T, Fujishiro M, Kushiya A, Kamata H, Takahashi SI, Katagiri H, Honda H, Kiyonari H, Uchida T, Asano T. Prolyl Isomerase Pin1 Negatively Regulates AMPK by Associating with the CBS Domain in the γ -subunit. **J Biol Chem** 290(40): 24255-24266, doi: 10.1074/jbc.M115.658559, 2015 査読あり
9. Akira Sato A, Kayama A, Shojima K, Matsumoto S, Koyama H, Minami Y, Nojima S, Morii E, Honda H, Takeda K, Kikuchi A. The Wnt5a-Ror2 axis promotes the signaling circuit between interleukin-12 and interferon- γ in colitis. **Sci Rep** 5:10536. doi: 10.1038/srep10536, 2015 査読あり
10. Wada T, Koyama D, Kikuchi J, Honda H, Furukawa Y. Overexpression of the shortest isoform of histone demethylase LSD1 primes hematopoietic stem/progenitor cells for malignant transformation. **Blood** 125(24): 3731-3746. doi: 10.1182/blood-2014-11-610907, 2015 査読あり
11. Ueda T, Nagamachi A, Takubo K, Yamasaki N, Matsui H, Kanai A, Nakata Y, Ikeda K, Konuma T, Oda H, Wolff L, Honda ZI, 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** 125(22): 3437-3446. doi: 10.1182/blood-2014-03-562694, 2015 査読あり
12. Honda H, Nagamachi A, Inaba T. -7/7q- syndrome in myeloid-lineage hematopoietic malignancies: attempts to understand this complex disease entity. **Oncogene** (review) 34(19): 2413-2425, doi: 10.1038/onc.2014.196, 2015 査読あり
13. Sato T, Goyama S, Kataoka K, Nasu R, Tsuruta-Kishino T, Kagoya Y, Nukina A,

- Kumagai K, Kubota N, Nakagawa M, Arai S, Yoshimi A, Honda H, Kadowaki T, Kurokawa M. Evil Defines Leukemia-initiating Capacity and Tyrosine Kinase Inhibitor Resistance in Chronic Myeloid Leukemia. **Oncogene** 33(42): 5028-5038, doi: 10.1038/onc.2014.108, 2014 査読あり
14. Kobayashi CI, Takubo K, Kobayashi H, Nakamura-Ishizu A, Honda H, Kataoka K, Kumano K, Akiyama H, Sudo T, Kurokawa M, Suda T. The IL-2/CD25 Axis Maintains Distinct Subsets of Chronic Myeloid Leukemia-Initiating Cells. **Blood** 123(16): 2540-2549, 2014 査読あり
15. Honda H, Inaba T. A long lasting puzzle for -7/7q- syndrome. **Oncotarget** (review) 5(1): 7-8, 2014 査読あり
16. Nagamachi A, Nakata Y, Ueda T, Yamasaki N, Ebihara Y, Tsuji K, Honda ZI, 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** 9(1):e87425, 2014 査読あり

[学会発表] (計 8 件)

1. 本田浩章 AML の分子機構 第 78 回日本血液学会総会 平成 28 年 10 月 13 日 横浜
2. Hiroaki Honda Analysis of pathogenic mechanisms and development of therapeutic approaches using mouse cancer models 第 75 回日本癌学会総会 平成 28 年 10 月 7 日 横浜
3. 池田健一郎、上田健、長町安希子、山崎憲政、中田雄一郎、世良康如、小島浩平、稲葉俊哉、本田浩章 Jmjd3 コンディショナルノックインマウスにおける白血病感受性亢進機構の解析 第 75 回日本癌学会総会 平成 28 年 10 月 7 日 横浜
4. Yasuyuki Sera, Takeshi Ueda, Yuichiro Nakata, Ken-ichiro Ikeda, Norimasa Yamasaki, Hideaki Oda, Zen-ichiro Honda, Hiroaki Honda Functional analysis of UTX, a histone demethylase for H3K27, in normal hematopoiesis and hematologic malignancies 第 77 回日本血液学会総会 平成 27 年 10 月 15 日 金沢
5. Kenichiro Ikeda, Takeshi Ueda, Akiko Nagamachi, Norimasa Yamasaki, Yuichiro Nakata, Toshiya Inaba, Hiroaki Honda Haploinsufficiency of Eed enhances to tumor susceptibility and develop leukemia with overexpression of Ev1 第 74 回日本癌学会総会 平成 27 年 10 月 9 日 名古屋
6. Takeshi Ueda, Akiko Nagamachi, Yuichiro

Nakata, Norimasa Yamasaki, Toshiya Inaba, Hiroaki Honda Role of Fbxl10, a histone demethylase, in MLL-AF9-induced leukemia 第 76 回日本血液学会総会 平成 26 年 11 月 2 日 大阪

7. 池田健一郎, 上田健, 長町安希子, 山崎憲政, 中田雄一郎, 稲葉俊哉, 本田浩章 EED, a subunit of PRC2, plays an essential role in maintenance of adult hematopoietic stem cells 第 76 回日本血液学会総会 平成 26 年 11 月 1 日 大阪
8. Hiroaki Honda Analysis of leukemogenic mechanisms by deregulated methylation of histone H3K27 第 73 回日本癌学会総会 平成 26 年 9 月 27 日 横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/sosai/top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本田 浩章 (HONDA HIROAKI)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授
研究者番号：40245064

(2) 研究分担者

稲葉 俊哉 (INABA TOSHIYA)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授
研究者番号：60281292

(H26 年度のみ研究分担者)

上田 健 (UEDA TAKESHI)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教
研究者番号：60585149

(H26 年度～H27 年度 研究分担者)

本田 善一郎 (HONDA ZEN-ICHIRO)
お茶の水女子大学・保健管理センター・教授
研究者番号：70238814

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号：

(4) 研究協力者
()