

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670469

研究課題名(和文) O-GlcNAc転移酵素による造血幹細胞機能のエピゲノム制御機構

研究課題名(英文) Epigenetic Regulation of hematopoietic stem cells by O-GlcNAc transferase

研究代表者

中島 秀明 (NAKAJIMA, Hideaki)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30217723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：O結合型 -N-アセチルグルコサミン(O-GlcNAc)転移酵素(OGT)は、タンパク質のセリン・スレオニン残基にO-GlcNAc基を付加する酵素であり、ヒストンなどのエピゲノム修飾に重要である。本研究では、OGTの造血系における生理的役割を造血系特異的OGTノックアウトマウスを用いて解析した。胎仔肝特異的OGTノックアウトマウスを用いた実験では、OGT欠失胎仔肝細胞は細胞数が著減し、またコロニー形成能を失っていた。またOGT欠失胎仔肝由来造血幹細胞は幹細胞機能を完全に失っていた。以上より、OGTは胎仔造血系において必須の役割を担っていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：O-linked- N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) transferase (OGT) is a critical enzyme that catalyzes O-GlcNAcylation of Ser/Thr residues of various proteins. This study examined the physiological role of OGT in hematopoietic system using OGT conditional knockout mice. OGT-deficient fetal liver cells were severely decreased in number and lost colony-forming activity in methylcellulose culture. Moreover, self-renewal and long-term repopulating capacity of OGT-deficient fetal liver hematopoietic stem cells were severely impaired in transplantation assays. These results indicated that OGT played a critical role in fetal liver hematopoiesis.

研究分野：血液学

キーワード：O結合型 -N-アセチルグルコサミン転移酵素 糖鎖修飾 造血幹細胞 造血前駆細胞 胎仔肝

1. 研究開始当初の背景

0 結合型 *O*-N-アセチルグルコサミン (*O*-GlcNAc) 転移酵素 (*O*-linked β -N-acetylglucosamine transferase; OGT) は、タンパク質のセリン・スレオニン残基に *O*-GlcNAc 基を付加する酵素である。このようなタンパク質の糖鎖修飾は、リン酸化と並ぶタンパク質修飾として、細胞応答を制御するシグナル伝達系で極めて重要な役割を果たしている。実際、セリン・スレオニン残基の *O*-GlcNAc 化は同じ部位のリン酸化と拮抗することが知られており、タンパク質のリン酸化シグナルと密接に関連している。生理学的には、*O*-GlcNAc 化制御の異常は癌や2型糖尿病、アルツハイマー病といった様々な疾患と密接に関係することが知られている。

TET2はDNAの脱メチル化に重要な酵素であり、その変異は造血幹細胞(HSC)機能の異常をきたし造血器腫瘍の発生につながる事が報告されている。実際TET2は、骨髄異形成症候群・白血病・骨髄増殖性腫瘍などの10~50%と極めて高頻度に変異をおこしていることが知られている。しかし最近、TET2がOGTと結合し複合体を形成していることが報告され、DNA脱メチル化以外にもヒストン修飾などのエピゲノム制御に関与している可能性が提唱された。TET2はOGTに結合することでその酵素活性を上昇させ、OGTの基質の一つであるヒストン2B(H2B)の*O*-GlcNAc化を促進する。さらにTET2は、OGTを遺伝子の転写開始部位にリクルートすることも報告された。このようにTET/OGT複合体は、標的遺伝子のプロモーター上でH2Bの*O*-GlcNAc化やDNA脱メチル化を介して遺伝子の転写を複合的に制御している可能性が明らかとなった。

2. 研究の目的

本研究ではOGTノックアウトマウスを用いて、1)OGTがHSC機能制御や血球分化に果たしている生理的役割、2)OGT機能異常と腫瘍発症の関係、3)TET2の下流因子としてのOGTの役割、を明らかにすることを目標にする。

3. 研究の方法

OGTのコンディショナルノックアウトマウス(cKO)を用い、Vav-Creで造血系特異的にOGTを欠失させ、HSC機能や血球分化などを詳細に解析する。

(1)OGT cKO 胎仔肝造血細胞の各種細胞分画・細胞機能解析

造血系特異的にOGTを欠失させるため、OGT cKOマウスをVav-Cre Tgと交配し、OGT cKO x Vav-Cre Tgマウスを作成する。このマウスを用いて、以下の解析を施行する。なお解析はOGT^{flox/flox}、OGT^{flox/+}、OGT^{+/+}マウスについて行う。

胎仔肝造血細胞の基本解析：胎仔肝細胞を分離し、細胞数をカウントする。またコロニーアッセイを施行し、各種前駆細胞の定量を行う。

HSC/HPC分画の解析：胎仔肝細胞を採取し、CD34、Flt3、CD150、CD48、c-Kit、Sca-1、Lineageマーカーで染色、HSC分画であるCD34-Flt3-LSK、CD150+CD48-LSK、HPC分画であるLSK、CD34+Flt3+LSK分画などの解析をFACSで行う。またCD34、FcγR、LSK染色により、共通骨髄前駆細胞(CMP)、骨髄単球前駆細胞(GMP)、巨核球赤芽球前駆細胞(MEP)分画の解析を行う。さらにHSC/HPC分画については、細胞周期・アポトーシス解析もあわせて施行する。

(2) OGT cKO HSCの骨髄再構築能の解析

OGTのHSC機能(長期骨髄再建能、自己複製能)に与える影響を明らかにするため、OGT cKOマウスHSCの骨髄移植実験を行う。

Vav-CreTgではHSCを含む造血系で広範に遺伝子を欠失させることができる。そこで、OGT^{flox/flox}、OGT^{flox/+}、OGT^{+/+} x Vav-Cre Tgマウスについて、胎仔肝からCD150+CD48-LSK、CD34-Flt3-LSKをソーティングし、致死量放射線照射したLy5.1レシピエントマウスに移植する。移植後、経時的にドナー細胞の末梢血キメリズムを評価し、長期骨髄再建能を判定する。また12週ごとにレシピエントマウスの骨髄細胞を別のマウスに継代移植し、HSCの自己複製能を検討する。同様の解析を、HPC分画であるLSK、前駆細胞であるCMP/GMP/MEPを用いて行う。

4. 研究成果

Vav-Creトランスジェニックマウスとの交配により胎仔肝造血細胞で特異的にOGTを欠失させたマウス(OGT-cKO/Vav-Cre Tg)は胎生致死であり、胎生16.5日ではノックアウトは存在しなかった。胎生14.5日(E14.5)胎仔肝(FL)の解析では、OGT欠失FLの細胞数は野生型に比べて有意に減少しており、コロニー形成能が著しく障害されていた。さらに、E14.5FLより精製・分離した造血幹細胞(HSC)を致死量放射線照射したレシピエントマウスに移植したところ、OGT欠失HSCは骨髄再建能を完全に失っていることが明らかとなった。

以上より、OGTは胎生期造血、特にFL-HSCにおいて必須の役割を担っ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12件)

1. Sakurai M, Kasahara H, Yoshida K,

- Yoshimi A, Kunimoto H, Watanabe N, Shiraiishi Y, Chiba K, Tanaka H, Harada Y, Harada H, Kawakita T, Kurokawa M, Miyano S, Takahashi S, Ogawa S, Okamoto S, Nakajima H: Genetic basis of myeloid transformation in familial platelet disorder/ acute myeloid leukemia patients with haploinsufficient *RUNX1* allele. *Blood Cancer Journal* (査読あり), 2016 Feb 5;6:e392. doi: 10.1038/bcj.2015.81.
2. Chin DW, Sakurai M, Nah GS, Du L, Jacob B, Yokomizo T, Matsumura T, Suda T, Huang G, Fu XY, Ito Y, Nakajima H, Osato M; *RUNX1* haploinsufficiency results in granulocyte colony-stimulating factor hypersensitivity. *Blood Cancer J.* (査読あり) 2016 Jan 8;6:e379. doi: 10.1038/bcj.2015.105.
 3. Yoshimi A, Toya T, Nannya Y, Takaoka K, Kirito K, Ito E, Nakajima H, Hayashi Y, Takahashi T, Moriya-Saito A, Suzuki K, Harada H, Komatsu N, Usuki K, Ichikawa M, Kurokawa M: Spectrum of clinical and genetic features of patients with inherited platelet disorder with suspected predisposition to haematological malignancies: a nationwide survey in Japan. *Ann Oncol.* (査読あり) 27(5):887-95, 2016. doi: 10.1093/annonc/mdw066..
 4. Numata A, Fujisawa S, Itabashi M, Ishii Y, Yamamoto W, Motohashi K, Matsumoto K, Hagihara M, Nakajima H: Favorable prognosis in Philadelphia chromosome -positive B-cell acute lymphoblastic leukemia patients following hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Transplant.* (査読あり) 30(5):485-6, 2016. doi: 10.1111/ctr.12702.
 5. Shihashi G, Yagi T, Suzuki S, Seki M, Kohashi S, Ueda T, Kameyama K, Kusunoki S, Nakajima H, Okamoto S, Suzuki N; Immune-mediated neuropathy with anti-disialosyl IgM antibodies in diffuse large B-cell lymphoma: case report and review of literature. *Intern Med.* (査読あり) 54:1647-51, 2015. doi: 10.2169/internalmedicine.54.4451.
 6. Matsumoto K, Takayama N, Aisa Y, Ueno H, Hagihara M, Watanabe K, Nakaya A, Chen K, Shimizu T, Tsukada Y, Yamada Y, Nakazato T, Ishida A, Miyakawa Y, Yokoyama K, Nakajima H, Masuda Y, Yano T, Okamoto S - Keio BRB Study Group; Bendamustine plus Rituximab in Japanese Patients with Relapsed or Refractory Indolent B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma and Mantle-cell Lymphoma previously treated with Rituximab - BRB Study -. *Int J Hematol.* (査読あり) 101:554-62, 2015 doi: 10.1007/s12185-015-1767-3.
 7. Sakurai M, Mori T, Karigane D, Tozawa K, Matsuki E, Shimizu T, Yokoyama K, Nakajima H, Kanda Y, Okamoto S; Unfavorable outcome of chronic myelogenous leukemia in adolescent and young adults treated with tyrosine kinase inhibitors. *Int J Hematol.* (査読あり) 102(3):342-8, 2015. doi: 10.1007/s12185-015-1840-y.
 8. Kunimoto H, Fukuchi Y, Sakurai M, Takubo K, Okamoto S, Nakajima H: *Tet2*-mutated myeloid progenitors possess aberrant *in vitro* self-renewal capacity. *Blood*(査読あり), 123:2897-9, 2014. doi: 10.1182/blood-2014-01-552471.
 9. Sakurai M, Kunimoto H, Watanabe N, Fukuchi Y, Yuasa S, Yamazaki S, Nishimura T, Sadahira K, Fukuda K, Okano H, Nakauchi H, Morita Y, Matsumura I, Kudo K, Ito E, Ebihara Y, Tsuji K, Harada Y, Harada H, Okamoto S, Nakajima H: Impaired hematopoietic differentiation of *RUNX1*-mutated induced pluripotent stem cells derived from FPD/AML patients. *Leukemia*(査読あり), 28(12):2344-54, 2014. doi: 10.1038/leu.2014.136.
 10. Yoshimi A, Toya T, Kawazu M, Ueno T, Tsukamoto A, Iizuka H, Nakagawa M, Nannya Y, Arai S, Harada H, Usuki K, Hayashi Y, Ito E, Kirito K, Nakajima H, Ichikawa M, Mano H, Kurokawa M; Recurrent *CDC25C* mutations drive malignant transformation in FPD/AML. *Nature Communications*(査読あり), Aug 27;5:4770, 2014. doi: 10.1038/ncomms5770.
 11. Nakajima H, Kunimoto H: *TET2* as an epigenetic master regulator for normal and malignant hematopoiesis (review). *Cancer Science* (査読あり), 105:1093-9, 2014. doi: 10.1111/cas.12484.
 12. Sadahira K, Sagawa M, Nakazato M, Uchida H, Ikeda Y, Okamoto S, Nakajima H*, Kizaki M; Gossypol induces apoptosis in multiple myeloma cells by inhibition of interleukin-6 signaling and Bcl-2/Mcl-1 pathway. *Int J Oncol.* (査読あり), 45:2278-86, 2014. doi: 10.3892/ijo.2014.2652.
- [学会発表](計9件)
1. Hiroko Sakurai, Yuka Harada, Hirotaka Matsui, Hideaki Nakajima, Toshio Kitamura, Norio Komatsu, Hironori Harada: Dysregulation of

- RUNX1 Plays a Critical Role in the Progression of Myelodysplastic Syndromes. 57th Annual Meeting of American Society of Hematology, Poster Session. (Dec 7, 2015), Orlando, USA
2. Hideaki Nakajima : Application of iPS cells derived from congenital MDS/AML syndrome for studying molecular mechanism of hematopoietic differentiation and hematologic malignancies. 第77回日本血液学会総会 口演(2015年10月18日), 石川県立音楽堂(金沢)
 3. 相馬俊介, 福地由美, 岡本真一郎, 中島秀明 : A critical role for O-GlcNAcylation in murine fetal liver and adult hematopoiesis. 第77回日本血液学会総会 口演(2015年10月17日), 石川県立音楽堂(金沢)
 4. 橋田里妙, 森毅彦, 加藤淳, 清水隆之, 中島秀明, 岡本真一郎 : Characteristics of Japanese patients with CLL: A retrospective analysis of single institution 第77回日本血液学会総会 ポスター(2015年10月17日), 石川県立音楽堂(金沢)
 5. Taku Kikuchi, Takehiko Mori, Takaaki Toyama, Masatoshi Sakurai, Norisato Hashimoto, Sumiko Kohashi, Jun Kato, Takayuki Shimizu, Hideaki Nakajima, Shinichiro Okamoto: Retrospective analysis of the localized ocular adnexal MALT lymphoma. 第77回日本血液学会総会 ポスター(2015年10月17日), 石川県立音楽堂(金沢)
 6. 遠矢嵩, 吉見昭秀, 高岡賢輔, 南谷泰仁, 桐戸敬太, 伊藤悦朗, 中島秀明, 林泰秀, 高橋強志, 齋藤明子, 鈴木憲史, 原田浩徳, 小松則夫, 臼杵憲祐, 市川幹, 黒川峰夫 : Nationwide epidemiological survey of familial platelet disorder in Japan. 第77回日本血液学会総会 ポスター(2015年10月17日), 石川県立音楽堂(金沢)
 7. 櫻井政寿, 笠原秀範, 雁金大樹, 橋田里妙, 山根裕介, 清水隆之, 森毅彦, 中島秀明, 岡本真一郎 : Comparison of PET with Ga scintigraphy as a tool for the initial clinical staging of DLBCL. 第77回日本血液学会総会 ポスター(2015年10月17日), 石川県立音楽堂(金沢)
 8. Akihide Yoshimi, Takashi Toya, Masahito Kawazu, Toshihide Ueno, Ayato Tsukamoto, Hiromitsu Iizuka, Masahiro Nakagawa, Yasuhito

- Nannya, Shunya Arai, Motoshi Ichikawa, Hironori Harada, Kensuke Usuki, Yasuhide Hayashi, Etsuro Ito, Keita Kirito, Hideaki Nakajima, Hiroyuki Mano, Mineo Kurokawa: Recurrent *CDC25C* mutations drive malignant transformation in FPD/AML. AACR (April 7, 2014), Chicago, USA
9. Hironori Harada, Yuka Harada, Daichi Inoue, Ye Ding, Goro Sashida, Atsushi Iwama, Hideaki Nakajima, Junji Tanaka, Norio Komatsu, Toshio Kitamura: C-terminal truncation type of RUNX1 mutants induce MDS/AML via gain-of-function mechanisms. 43th Annual Scientific Meeting of International Society of Experimental Hematology (ISEH), Oral Session (Aug 23, 2014), Montreal, Canada.

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者
中島 秀明 (NAKAJIMA, Hideaki)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号 : 30217723

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

