

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02544

研究課題名(和文)造血器腫瘍におけるポリコーム群複合体機能異常の病因論的意義の解明

研究課題名(英文) Pathological role of the dysregulated polycomb functions in hematological malignancies

研究代表者

岩間 厚志 (Iwama, Atsushi)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：70244126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,100,000円

研究成果の概要(和文)：ポリコーム群複合体はヒストン修飾を介して転写を抑制的に制御する。polycomb repressive complex 1 (PRC1)は造血幹細胞の維持に重要な機能を有するが、バリエーションPRC1複合体の存在が明らかとなり、その機能が注目されている。PRC1.1はRing1b, Pcgf1, Kdm2b, BcorからなるバリエーションPRC1複合体である。遺伝子欠損マウスの解析から、PRC1.1遺伝子欠損マウスに造血幹細胞の造血再生活性に異常はなく、骨髓球系への分化が増強されることから、PRC1.1は造血幹細胞の骨髓球への分化を抑制的に制御することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Polycomb-group (PcG) proteins catalyze repressive histone marks. Canonical polycomb repressive complex (PRC) 1 containing Pcgf4/Bmi1 has been implicated in the maintenance of hematopoietic stem cells (HSCs). We analyzed the role of non-canonical PRC1.1 consisting of Pcgf1, Kdm2b, Bcor and Ring1b using conditional knockout mice. We found that PRC1.1 was dispensable for self-renewal capacity of HSCs. Instead, PRC1.1 insufficiency enhanced commitment of hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) to myeloid lineage and induced myeloid-biased differentiation, eventually leading to the development of lethal myeloproliferative neoplasm (MPN). Comprehensive analyses revealed that master transcriptional factor genes for myeloid differentiation, such as Cebpa, were up-regulated following a reduction in H2AK119ub1 levels in PRC1.1-insufficient HSPCs, resulting in the premature activation of their targets. These results indicate that PRC1.1 negatively regulates myeloid commitment of HSPCs.

研究分野：血液内科学

キーワード：造血腫瘍 エピジェネティクス ポリコーム群複合体

1. 研究開始当初の背景

ポリコーム群複合体は幹細胞に共通の分子であり、癌幹細胞においても重要な機能を有する。一方で、PRC2 ポリコーム群複合体遺伝子の欠損や機能喪失型変異が同定され、その癌抑制遺伝子としての機能が注目されている。我々もこれまでに、マウスにおける PRC2 遺伝子の欠損により、骨髄異形成症候群 (MDS) 様の病態が実際に再現されることを明らかにしてきた。一方で、これまで主に解析されてきた canonical PRC1 に加えて、PRC1.1 は Ring1b, Pcgf1, Kdm2b, Bcor からなるバリエーション型 PRC1.1 複合体の存在が明らかとなり、その機能が注目されていた。

2. 研究の目的

本研究では、この MDS マウスモデルを用いて MDS 病態におけるポリコーム群複合体関連のエピゲノム異常の詳細を検証するとともに、新たに同定された non-canonical PRC1 ポリコーム群複合体のマウスモデルを用いて、その造血幹細胞制御に於ける機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

MDS モデルにおける DNA メチル化異常と DNA メチル化阻害剤の効果の検証

Ezh2^{Δ/Δ} マウス、*Tet2*^{KD/KD} マウス、*Tet2*^{KD/KD}*Ezh2*^{Δ/Δ} マウスから造血幹・前駆細胞 (Lineage⁻c-Kit⁺Sca-1⁺: LSK) を用いた Reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) とポリコーム修飾 (H3K27me3) の ChIP シークエンスを行い、MDS 病態形成・維持に関与するエピゲノム異常を理解する。

non-canonical PRC1 複合体の造血制御における機能解析

バリエーション PRC1 複合体の構成因子 Pcgf1, Kdm2b, Bcor の遺伝子欠損マウスの解析から、PRC1.1 遺伝子欠損マウスの造血を詳細に解析する。

4. 研究成果

MDS モデルにおける DNA メチル化異常と DNA メチル化阻害剤の効果の検証

MDS 患者において *EZH2* 等のポリコーム (PRC) 群関連遺伝子の機能喪失型変異と、DNA 脱メチル化に関わる *TET2* 遺伝子変異がしばしば共存する事が報告されている。当研究室では近年、*Tet2* と *Ezh2* の同時欠損マウスモデルを用いて解析を行い、それぞれの単独欠損マウスより早期に重症 MDS を発症することを証明した。本研究では、同マウスモデルを用い、*Tet2*、*Ezh2* 機能喪失による DNA メチル化異常とヒストン修飾変化の両観点から、MDS の病態進展メカニズムを解明することを目的とした。本研究では上述のマウスモデルの造血幹前駆細胞を用い、Reduced Representation

Bisulfite Sequence (RRBS) を行い、H3K27me3 のクロマチン免疫沈降シークエンス (ChIP-seq)、DNA マイクロアレイを併せ、網羅的解析を行った。RRBS の結果、同時欠損マウスは特異的な DNA メチル化プロファイルを示し、その遺伝子群は発現と負の相関を示す割合が高く、多くは造血に重要な転写因子であった。また、DNA 高メチル化をきたす遺伝子群の多くは *Ezh2* を含む PRC2 複合体の標的遺伝子であり、*Ezh2* と相同蛋白である *Ezh1* を含む PRC2 複合体の標的遺伝子と比べ DNA 高メチル化変化が強く、*Ezh2* 標的遺伝子は、*Ezh2* 欠損 MDS の病態形成過程において、エピゲノム修飾の切り替えが生じる主な標的遺伝子になると考えられた。一方、この MDS モデルマウスの造血幹細胞を二次移植したマウスに DNA メチル化阻害剤のひとつである decitabine (DAC) を投与し、同様に網羅的解析を行ったところ、DAC により DNA メチル化は広範に解除されたものの遺伝子発現の回復は一部に止まり、病態の治癒には不十分と考えられた。これらのことより、エピゲノム制御因子 *Tet2* と *Ezh2* の同時欠損は協調的にエピゲノムに作用し MDS の病態形成を進展させることが示され、本研究で用いたマウスモデルはヒトの MDS の病態形成過程をよく反映したものであることが証明された (Leukemia 2017)。

non-canonical PRC1 複合体の造血制御における機能解析

Pcgf1, Kdm2b と Bcor の遺伝子欠損マウスにおける造血解析から、PRC1.1 遺伝子欠損マウスにおいては造血幹細胞の造血再構築活性に異常はなく、むしろ骨髄球系への分化が増強されることが明らかとなった。したがって、PRC1.1 は造血幹細胞の骨髄球への分化を抑制的に制御する。この制御は感染ストレスなどの際に解除され、感染急性期の骨髄球の動員を可能にする。また、この PRC1.1 の機能は *Bmi1* の発現によっては回復しないことが確認された (論文投稿準備中)。

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)

Iwama A, Polycomb repressive complexes in hematological malignancies. (Review) **Blood** 130(1): 23-29, 2017. 査読有

Hasegawa N, Oshima M, Sashida G, Matsui H, Koide S, Saraya A, Wang C, Muto T, Takane K, Kaneda A, Shimoda K, Nakaseko C, Yokote K, Iwama A. Impact of combinatorial dysfunctions of *Tet2* and *Ezh2* on the epigenome in the pathogenesis of

myelodysplastic syndrome. **Leukemia** 31(4):861-871, 2017. 査読有

Sashida G, Iwama A. Multifaceted role of the polycomb-group gene *EZH2* in hematological malignancies. (Review) **Int J Hematol** 105(1):23-30, 2017 査読有

Sashida G, Wang S, Tomioka T, Oshima M, Kazumasa Aoyama K, Kanai A, Mochizuki-Kashio M, Harada H, Shimoda K, Iwama A. The loss of *Ezh2* cooperates with an active *JAK2* mutant in the pathogenesis of myelofibrosis and sensitizes tumor-initiating cells to bromodomain inhibition. **J Exp Med** 213(8):1459-1477, 2016. 査読有

Koide S, Oshima M, Takubo K, Yamazaki S, Nitta E, Saraya A, Aoyama K, Kato Y, Miyagi S, Nakajima-Takagi Y, Chiba T, Matsui H, Arai E, Suzuki Y, Kimura H, Nakauchi H, Suda T, Shinkai Y, and Iwama A. *Setdb1* maintains hematopoietic stem and progenitor cells by restricting the ectopic activation of non-hematopoietic genes. **Blood** 128(5):638-649, 2016. 査読有

Si S, Nakajima-Takagi Y, Aoyama K, Oshima M, Saraya A, Sugishita H, Nakayama M, Ishikura T, Koseki H, Iwama A. Loss of *Pcgf5* affects global H2A monoubiquitination but not the function of hematopoietic stem and progenitor cells. **PLoS One** 11(5):e0154561, 2016 査読有

Oshima M, Hasegawa N, Mochizuki-Kashio M, Muto T, Miyagi S, Koide S, Yabata S, Wendt G, Saraya A, Wang C, Shimoda K, Suzuki Y, Iwama A. *Ezh2* regulates the *Lin28/let-7* pathway to restrict activation of fetal gene signature in adult hematopoietic stem cells. **Exp Hematol** 44:282-296, 2016. 査読有

Mochizuki-Kashio M, Aoyama K, Sashida G, Oshima M, Tomioka T, Muto T, Wang C, and Iwama A. *Ezh2* loss in hematopoietic stem cells predisposes mice to develop heterogeneous malignancies in an *Ezh1*-dependent manner. **Blood** 126:1172-1183, 2015 査読有

〔学会発表〕(計 14 件)

Iwama A. "Role of PRC1.1, a non-canonical PRC1 complex in the lineage commitment of hematopoietic stem and progenitor cells" JSPS & National University of Singapore Joint 2nd symposium. New Horizons in Normal and Cancer Stem Cell Research. January 18-20,

2018 (Kumamoto University, Kumamoto)

Iwama A. "Pcgf1, a component of PRC1.1, functions as a tumor suppressor in myeloproliferative neoplasms. 2017 US-Japan Symposium on Normal/Malignant Hematopoiesis and Novel Therapies for Hematologic Malignancies. February 21-23, 2017 (Hilton Waikoloa Village, Hawaii, USA)

Iwama A. "Deregulated polycomb function in the pathogenesis of MDS" in Symposium "Clinical aspects and basic research of MDS: Current situation and future" The 78th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. October 13-15, 2016 (Pacifico Yokohama, Yokohama)

岩間厚志「造血幹細胞の加齢変化と造血器腫瘍」第89回日本生化学会大会シンポジウム「加齢にともなう幹細胞変化と疾患の分子基盤」2016年9月25日-27日(仙台国際センター・東北大学川内北キャンパス、宮城県仙台市)

Iwama A. "Deregulated polycomb-group gene functions in hematological malignancies" 5th JCA-AACR Special Joint Conference. July 13-15, 2016 (Tokyo Bay Maihama Hotel Club Resort, Urayasu, Chiba)

Iwama A. "Role of polycomb-group complexes in hematopoietic stem aging and disease" 1st International Symposium on Stem Cell Aging and Disease. June 29, 2016 (Ito Hall, the University of Tokyo, Tokyo)

Iwama A. "Role of non-canonical polycomb repressive complex 1 in fate decision of hematopoietic stem cells. Annual Meeting of International Society of Stem Cell Research June 22-25, 2016 San Francisco (USA)

岩間厚志「造血幹細胞のエージングと疾患」第68回日本細胞生物学会大会シンポジウム「ライフステージ・ライフイベントと幹細胞制御」2016年6月15日-17日(京都テルサ、京都市)

岩間厚志「造血腫瘍における分子標的としてのポリコム群遺伝子EZH1/2の機能」第20回日本がん分子標的治療学会学術集会ワークショップ「エピゲノム分子標的の最前線」2016年5月30日-6月1日(別府国際コンベンションセンター、大分県別府市)

Iwama A. "Polycomb repressive complex in hematological malignancies" 11th International Workshop on Molecular aspe

cts of myeloid stem cell development and leukemia. 2016.5.2-5.5 Cincinnati Children's Hospital Medical Center. Ohio, U.S.A.

岩間厚志「造血幹細胞におけるバリアントPRC1複合体の機能」第15回日本再生医療学会総会 2016年3月17日-19日(大阪国際会議場、大阪府大阪市)

岩間厚志「造血幹細胞におけるバリアントPRC1複合体の機能」第15回日本再生医療学会総会 2016年3月17日-19日(大阪市 リーガロイヤルホテル)

Iwama A. "Role of polycomb repressive complexes in hematopoiesis and disease" Kick-Off Symposium in Nagoya City University. February 29-March 1, 2016 (Nagoya City University Hospital, Nagoya)

岩間厚志「ポリコーン群ヒストン修飾異常と造血器腫瘍」平成27年度「個別レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ 2016年2月3日-4日(琵琶湖ホテル、滋賀県大津市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/molmed/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩間 厚志 (IWAMA, Atsushi)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：70244126

(2)研究分担者

仁田 英里子 (NITTA, Eriko)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：80401123