

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390252

研究課題名(和文) ヒストン脱メチル化酵素 Fbx110 の脱制御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 expression of histone demethylase Fbx110

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) 14,800,000 円、(間接経費) 4,440,000 円

研究成果の概要(和文)：我々は、造血幹細胞でヒストン脱メチル化酵素であるFbx110を高発現するトランスジェニックマウスを作製し、生後約1年で白血病を発症することを見いだした。また、骨髄移植の手法により、白血病は造血細胞の自律性増殖能の亢進によることを明らかとした。さらに、Fbx110 Tgマウスの造血幹細胞では細胞内輸送に関わるneuron specific gene 2 (Nsg2) 遺伝子が高発現しており、またミトコンドリアにおける酸化的リン酸化に関わる遺伝子の有意な発現上昇が認められた。我々の解析結果は、細胞内エネルギー代謝および細胞内輸送の見地から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)：We generated transgenic mice that overexpress Fbx110, a histone demethylase, in hematopoietic stem cells (HSCs), and found that the mice develop leukemia at about 1 year after birth. By bone marrow transplantation, we demonstrated that the leukemia was caused by enhanced HSC-intrinsic proliferative potentials. In addition, we found that neuron specific gene 2 (Nsg2), which encodes a protein involved in intracellular transport, was overexpressed and that genes involved in oxidative phosphorylation in mitochondria were significantly up-regulated. Our findings provide novel insights in the leukemogenic mechanisms from the viewpoint of energy metabolism and intracellular transport.

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

1. 研究開始当初の背景

第7番染色体長腕欠損(7q-)症候群は、化学療法後や放射線療法後に発症する造血器腫瘍において高頻度に認められる染色体異常である。我々はマイクロアレイ CGH 法を用いて、疾患責任候補遺伝子 titan を単離し、titan 欠損マウスは長期観察の結果血液細胞の異形成を伴って白血病を発症することを見いだした。

titan 欠損マウスの白血病発症には長期の潜伏期を必要とするところから、2 次的な遺伝子異常の関与が強く疑われた。そこで我々は titan 欠損マウスにレトロウイルスを用いた *in vivo* mutagenesis を行ない、協調遺伝子としてヒストン脱メチル化酵素をコードする Fbx110 を単離した。

Fbx110 は、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であり、近年造血器腫瘍を含めた細胞がん化に関与すると言う報告がなされている。しかし、その発現上昇が細胞増殖に関わると言う報告 (Tzatsos A. *et al.* PNAS 2009, He J. *et al.* Nat Struct Mol Biol. 2008, Koyama-Nasu R. *et al.* Nat Cell Biol. 2007) と、その発現低下が細胞増殖に関わると言う報告 (Suzuki A. *et al.* EMBO J. 2006) があり、Fbx110 の腫瘍化における役割については不明であった。

2. 研究の目的

我々は、Fbx110 の脱制御と造血器腫瘍発症機構との関連を明らかにする目的で、造血幹細胞特異的に目的遺伝子を発現する Sca1 プロモーターを用いた Fbx110 のトランスジェニック (Tg) マウスと、ヒストン脱メチル化酵素活性をコードする exon の一部を欠失した 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 は特に造血異常を認めなかったが、Fbx110 Tg マウスは生後約 1 年で白血病を発症した。この結果は、造血幹細胞における Fbx110 の過剰発現が正常の造血機構を攪乱し、白血病発症の原因となることを示している。しかし、Fbx110 の過剰発現がいかなる分子機構により腫瘍化に関与するかについては明らかではない。この申請では、我々が作製した Fbx110 Tg マウスを用いて、ヒストンメチル化・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) Fbx110 過剰発現および欠失による造血幹細胞におけるヒストンメチル化の変化の検討

Wild-type (WT) 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 を行なった。

2) Fbx110 Tg における白血病発症が細胞自律的 (cell-autonomous) であることの確認

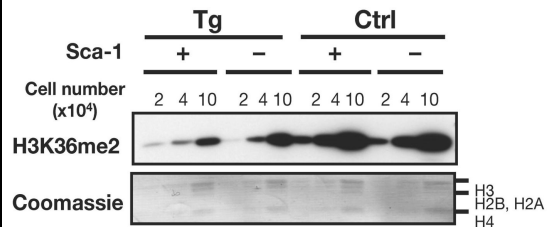
WT マウスと Fbx110 Tg マウスから造血幹細胞を単離し、放射線照射した同系マウスに移植することにより、白血病発症が細胞自律的であるかどうかを検討した。

3) Fbx110 過剰発現および欠失による造血幹細胞における遺伝子発現変化の検討

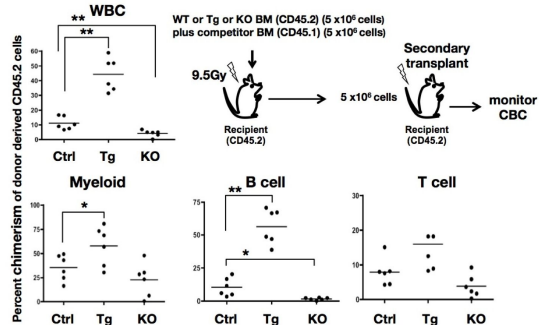
WT マウスと Fbx110 Tg マウスから造血幹細胞を単離し、RNA を抽出してトランスクリプトーム解析を行なった。また、得られた結果を GSEA (gene set enrichment analysis) を用いて遺伝子群として解析を行なった。

4. 研究成果

抗メチル化 H3K36 抗体を用いて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 (下図参照)。



また、Fbx110 Tg マウスから単離した造血幹細胞を用いた骨髓食では、1 回目の移植では有意な差は認められなかったが、2 回目の移植では、Fbx110 トランスジェニックマウス由来の骨髓細胞では有意なキメリズムの上昇を認めた。これらの結果は、造血幹細胞における Fbx110 の高発現は造血系列に増殖能を寄与することを示すと共に、Fbx110 トランスジェニックマウスに発症した白血病は造血細胞自体の増殖能の亢進によることを示している (下図参照)。



WT マウスと Fbx110 Tg マウスの造血幹細胞を用いたトランスクリプトーム解析では、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、ミトコンドリアにおける酸化リン酸化に関わる遺伝子群の有意な上昇が認められた (下図参照)。

これらの結果は、Fbx110 の脱制御により造血幹細胞において酸化的リン酸化経路が活性化し、それが Nsg2 の過剰発現と協調して白血病発症に関与していることを示している。我々の解析結果は、細胞内エネルギー代謝および細胞内輸送の見地から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。

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. Nishibe R, Watanabe W, Ueda T, Yamasaki N, Koller R, Wolff L, Honda Zi, Ohtsubo M, Honda H. CIZ1, a p21^{Cip1/Waf1}-interacting protein, functions as a tumor suppressor *in vivo*. **FEBS Lett.** 587: 1529-1535, 2013 **査読あり**
2. Nagai Y, Osawa K, Fukushima H, Tamura Y, Aoki K, Ohya K, Yasuda H, Hikiji H, Seta Y, Seo S, Kurokawa M, Kato S, Honda H, Nakamura I, Maki K, Jimi E. p130Cas plays important roles in osteoclastic bone resorption. **J Bone Miner Res.** 28(12): 2449-62, 2013 **査読あり**
3. Akimoto T, Okuhira K, Aizawa K, Wada S, Honda H, Fukubayashi T, Uchida T. Skeletal muscle adaptation 1 in response to mechanical stress in p130Cas^{-/-} mice. **Am J Physiol Cell Physiol** 304: C541-547, 2013
4. Nagamatsu G, Kosaka T, Saito S, Honda H, Takubo K, Kinoshita T, Akiyama H, Sudo T, Horimoto K, Oya M, Suda T. Induction of pluripotent stem cells from primordial germ cells by single reprogramming factors. **Stem Cells** 31, 479-487, 2013 **査読あり**
5. Ueda T, Sanada M, Matsui H, Yamasaki N, Honda Zi, Shih LY, Mori H, Inaba T, Ogawa S, Honda H. EED mutants impair polycomb repressive complex 2 in myelodysplastic syndrome and related neoplasms. **Leukemia** 26, 2557-2560, 2012 **査読あり**
6. Zhang X, Kinuko Hirose K, Akahane K, Kuroda I, Honna H, Kagami K, Goi K, Nakamura K, Kobayashi M, Yagita H, Kurosawa H, Look AT, Honda H, Inaba T, Nakazawa S, Sugita K, Endo M, Inukai T. Oncogenic fusion E2A-HLF sensitizes t(17;19)-positive acute lymphoblastic leukemia to TRAIL-mediated apoptosis by upregulating the expression of death receptors. **Leukemia** 26, 2483-2493, 2012 **査読あり**
7. Ozaki Y, Matsui H, Asou H, Nagamachi A, Aki D, Honda H, Yasunaga S, Takihara Y, Yamamoto T, Izumi S, Ohsugi M, Inaba T. Poly-ADP ribosylation of Miki by tankyrase-1 promotes centrosome maturation.

Mol Cell 47, 694-706, 2012 **査読あり**

8. Li Q, Guo H, Matsui H, Honda H, Inaba T, Sundberg JP, Sprecher E, Uitto J. Mouse Samd9l is not a functional paralogue of the human SAMD9, the gene mutated in normophosphataemic familial tumoral calcinosis. **Exp Dermatol** 21, 554-556, 2012 **査読あり**
9. Sugihara E, Shimizu T, Kojima K, Ohishi N, Kai K, Ishizawa J, Nagata K, Hashimoto N, Honda H, Kanno M, Miwa M, Okada S, Andreeff M, Saya H. Ink4a and Arf are crucial factors in the determination of the cell of origin and the therapeutic sensitivity of Myc-induced mouse lymphoid tumor. **Oncogene** 31, 2849-2861, 2012 **査読あり**
10. Seo S, Nakamoto T, Takeshita M, Lu J, Sato T, Suzuki T, Kamikubo Y, Ichikawa M, Noda M, Ogawa S, Honda H, Oda H, Kurokawa M. Cas-L regulates myeloid cell motility and suppresses progression of leukemia induced by p210Bcr/Abl. **Cancer Sci** 102, 2109-2117, 2011 **査読あり**
11. Jiang Q, Quaynor B, Sun A, Li Q, Matsui H, Honda H, Inaba T, Sprecher E, Uitto J. The Samd9L gene: transcriptional regulation and tissue-specific expression in mouse development. **J Invest Dermatol** 131, 1428-1434, 2011 **査読あり**
12. Honda H, Takubo K, Oda H, Kosaki K, Tazaki T, Yamasaki N, Miyazaki K, Moore KA, Honda Zi, Suda T, Lemischka IR. HEMP, an mbt domain-containing protein, plays essential roles in hematopoietic stem cell function and skeletal formation. **Proc Natl Acad Sci USA** 108, 2468-2473, 2011 **査読あり**

[学会発表] (計 10 件)

1. 上田 健, 真田 晶, 松井啓隆, 山崎憲政, 本田善一郎, 森 啓, LEE-YUNG SHIH, 稲葉俊哉, 小川誠司, 本田浩章. 「MDS で同定されたポリコローム複合体構成因子 EED の機能欠失型変異体の解析」第 74 回日本血液学会, 平成 24 年 10 月 19 日 京都
2. 上田健, 真田晶, 松井啓隆, 山崎憲政, 本田善一郎, 森啓, LEE-YUNG SHIH, 稲葉俊哉, 小川誠司, 本田浩章. 「骨髄異形成症候群におけるポリコローム複合体 PRC 構成因子 EDD の機能欠失型変異」第 73 回日本血液学会, 平成 23 年 10 月 15 日 名古屋
3. 長町安希子, 松井啓隆, 尾崎裕子, 山崎憲政, 小田秀明, 稲葉俊哉, 本田浩章. 「-7/7q-責任遺伝子候補 Samd9L」第 73 回日本血液学会, 平成 23 年 10 月 14 日 名古屋

[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)
研究者番号：60281292

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

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：