

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591386

研究課題名(和文) 骨髄増殖性腫瘍における低酸素エピゲノム応答機序とその破綻の解明

研究課題名(英文) Hypoxia modulate epigenomic response in MPN cells

## 研究代表者

桐戸 敬太 (KIRITO, Keita)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：90306150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄増殖性腫瘍由来の細胞株を、低酸素環境下で培養することにより、DNAのグローバルなメチル化およびヒドロキシメチル化レベルが変化することを見出した。また、メチル化アレイ解析を行い、低酸素環境にてプロモーター領域のメチル化レベルが低下する候補遺伝子としてWnt5aを同定した。実際に低酸素環境下においてWnt-5aのmRNAおよびタンパクの発現が増加することを確認した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the role of hypoxia on epigenetic gene regulation in cells derived from myeloproliferative neoplasms having active mutant form of JAK2, JAK2V617F. After culture at hypoxic conditions, total level of methylated cytosine levels were changed in the cells. 5-hydroxy-methyl cytosine (5-hmC) levels were drastically decreased in SET-2 cells with normal TET2 function. In contrast, 5-hmC levels were not changed during treatment with hypoxia in HEL cells, which lack TET2 gene. We also found that methylation of promoter lesion of Wnt5a gene were decreased after hypoxia treatment. We also confirmed that hypoxia actually induced expression of Wnt5a both at mRNA and protein levels. Our observations suggested that hypoxia could regulate gene expression not only through activation of transcription factor, HIF, but also through modification of epigenomic machinery including TET2.

研究分野：血液内科学

キーワード：hypoxia TET2 Wnt5 JAK2V617F

### 1. 研究開始当初の背景

骨髄増殖性腫瘍の分子病態として、JAK2V617F 変異を初めとするドラバール変異に加え、TET2 や ASXL1 などの遺伝子発現のエピゲノム制御に関わる分子群の機能異常が関与していることが明らかになりつつあった。一方、我々は骨髄増殖性腫瘍について腫瘍微小環境、特に酸素濃度変化と低酸素応答について注目した研究を進めており、低酸素環境下では、過剰発現した活性酸素によりチロシンフォスファターゼ SHP-2 の機能が抑制され、結果的に JAK2V617F の機能が抑制されることを明らかにしていた (Mitsumori et al. Exp. Hematology 2014)。

### 2. 研究の目的

本研究課題においては、低酸素環境が骨髄増殖性腫瘍のエピゲノム応答にどのような影響を及ぼすかについて、明らかにすることを主目的とした。さらに、低酸素環境下でのエピゲノム応答を修飾することが、骨髄増殖性腫瘍の新たな治療方法の開発に応用させることができるかについても研究を展開させるかについても検討した。

### 3. 研究の方法

JAK2V617F 変異を有する骨髄増殖性腫瘍症例由来の細胞株 (HEL, SET-2)、および JAK2V617F を持たない白血病細胞株 (KASUMI-1) について、低酸素環境下で培養を行い、

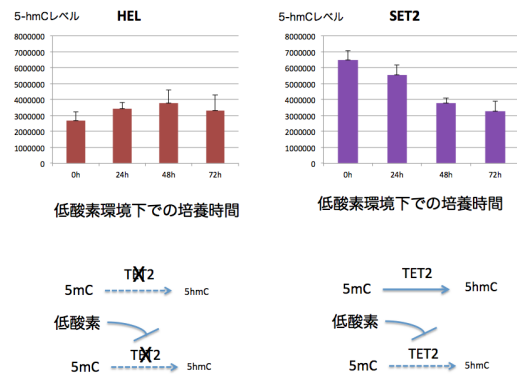
- (1) グローバルな遺伝子のメチル化およびヒドロキシメチル化レベルの変化
- (2) メチル化アッセイチップを用い、低酸素環境にてメチル化が変化する候補遺伝子同定
- (3) バイサルファイトシーケンスにより、候補遺伝子のプロモーター領域のメチル化変化の確認
- (4) 定量的 PCR およびウェスタンブロットにより候補遺伝子が低酸素環境下で実際に発現が変化するかについても検討した。

### 4. 研究成果

(1) 1%O<sub>2</sub> 環境下で 72 時間培養することにより、SET-2 および KASUMI-1 ではメチル化シトシン (5-mC)、5 ヒドロキシメチル化シトシン (5-hmC) とともに低下した。これに対して、HEL 細胞では 5-hmC の増加を認めた。すなわち、酸素レベルの変化はエピゲノム応答にも影響をおよぼしていることが証明された。

(2) TET2 は 5mC を 5hmC に変換する機能を有するが、MPN では比較的高率にこの遺伝子の機能喪失型変異を伴う。上記の細胞株のうち、HEL については、TET2 遺伝子が欠損しているとの報告がある。SET-2 については、我々が変異の有無を検討したが、正常であった。この両者について 5hmC のレベルを比較

すると、通常状態において HEL の 5-hmC レベルが低い事、低酸素環境下で、SET-2 の 5-hmC レベルの低下が認められた。TET2 は HIF 水酸化酵素と同様に二価鉄と酸素が活性化に必要であると考えられており、SET-2 において 5-hmC レベルが低下したことは、低酸素環境において TET2 の機能が抑制されたためと推察された。これに対して、HEL では低酸素環境での 5-hmC レベルには変化を認めていないが、この理由として、HEL 細胞は、もともと TET2 を発現していないためと予想された。(下図)



(3) それぞれの細胞株について、1%O<sub>2</sub> 環境下で 72 時間培養を行い、メチル化アレイ解析を行った。その結果、共通してメチル化が変化する遺伝子として、MGMT, Rho-B, CDKN2, PYROXD2, Wnt5 が候補として同定された。

(4) 同時に発現アレイ解析を行い、低酸素環境下で mRNA の発現レベルが変化する遺伝子についても解析、上記のメチル化アレイの結果と比較検討した。その結果、Wnt5a について、メチル化アレイではプロモーターのメチル化レベルが低下し、発現アレイでは低酸素環境にて mRNA の発現上昇がみられたことより、低酸素環境下でメチル化応答を受ける候補遺伝子としてさらなる解析を進めた。

(5) その結果、ウェスタンブロットにて、低酸素環境下では Wnt5a のタンパクレベルが上昇することを確認した。

(6) 一方、MGMT, Rho-B, CDKN2 および PYROXD2 遺伝子については、低酸素培養後の遺伝子のメチル化変化についてバイサルファイト法を用いて詳細な解析を行ったが、有意な変化は確認できなかった。

### 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 6 件)

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. 2014;5:4770.  
( 査読有 )

Yamamoto T, Nozaki Y, Mitsui H, Koshiishi M, Sueki Y, Kawashima I, Nakajima K, Mitsumori T, Shimada S, Kirito K. Cutaneous invasion of leukemia cells during blastic transformation in a post polycythemia vera myelofibrosis patient. International journal of hematology. 2014.  
( 査読有 )

Sueki Y, Nozaki Y, Kawashima I, Yamamoto T, Nakajima K, Mitumori T, Kirito K. Anaplastic large cell lymphoma with paraneoplastic neutrophilia: an association between IL-17 elevation and aggressive disease progression. International journal of hematology. 2014;99(6):773-6.  
( 査読有 )

Mitsumori T, Nozaki Y, Kawashima I, Yamamoto T, Shobu Y, Nakajima K, Morishita S, Komatsu N, Kirito K. Hypoxia inhibits JAK2V617F activation via suppression of SHP-2 function in myeloproliferative neoplasm cells. Experimental hematology. 2014;42(9):783-92 e1.  
( 査読有 )

Edahiro Y, Morishita S, Takahashi K, Hironaka Y, Yahata Y, Sunami Y, Shirane S, Tsutsui M, Noguchi M, Koike M, Imai K, Kirito K, Noda N, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Ohsaka A, Araki M, Komatsu N. JAK2V617F mutation status and allele burden in classical Ph-negative myeloproliferative neoplasms in Japan. International journal of hematology. 2014;99(5):625-34.  
( 査読有 )

Nozaki Y, Mitsumori T, Yamamoto T, Kawashima I, Shobu Y, Hamanaka S, Nakajima K, Komatsu N, Kirito K. Rituximab activates Syk and AKT in CD20-positive B cell lymphoma cells dependent on cell membrane cholesterol levels. Experimental hematology. 2013;41(8):687-96 e1.  
( 査読有 )

[学会発表](計 2 件)

Yoshimi, A Toya, T Nakagawa, M Kawazu, M Nannya, Y Ichikawa, M Arai, S Harada, H

Usuki, K Hayashi, Y Ito, E Kirito, K Nakajima, H Mano, H Kurokawa, M  
The Genetic Landscape Of FPD/AML Revealed CDC25C Mutation As a Driver That Promotes Malignant Transformation  
第 5 5 回米国血液学会、2013.12. New Orleans (米国)

Kawashima, I Kirito K  
Metformin Exerts Anti-Leukemic Effects Via Direct Inhibition Of Oncogenic Kinase Activity In Leukemia Cells Derived From Myeloproliferative Neoplasms  
第 5 5 回米国血液学会、2013.12. New Orleans (米国)

[図書](計 6 件)

桐戸敬太 他、医学書院  
今日の治療指針 2015 版、 2015、 651-653

桐戸敬太 他、医歯薬出版株式会社  
スタンダード検査血液学第 3 版  
2014、264-269

桐戸敬太 他、中外医学社  
EBM 血液疾患の治療 2015-2016  
2014、 191-197

桐戸敬太 他、 中外医学社  
新・カラーテキスト血液病学  
2013、 192-197

桐戸敬太 他、 中外医学社  
EBM 血液疾患の治療 2013-2014  
2012、 199-203

桐戸敬太 他、 先端医学社  
トロンボポエチン受容体作動薬のすべて  
2012、 32-41

[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  
山梨大学医学部血液腫瘍内科ホームページ  
(<http://www.yamanashi-hematology.com/>)  
において、研究成果の報告を行った。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

桐戸 敬太 (KIRITO, Keita)  
山梨大学・総合研究部・教授  
研究者番号： 90306150

(2)研究分担者

中 主 (NAKAJIMA, Kei)

山梨大学・医学部附属病院・医員

研究者番号： 20447709

三森 徹 (MITSUMORI, Toru)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号： 80377514

野崎 由美 (NOZAKI, Yumi)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号： 80530104

(3)連携研究者

なし