様　式　C－19、F－19、Z－19　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 28 年　6 月　2 日現在

機関番号：12601
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2014～2015
課題番号：26670465

研究課題名（和文）細胞運命と染色体マクロレベルにおける発現調節機構の機能的関係

研究課題名（英文）Functional relationship between cell fate decision and epigenetic control of gene expression of the chromosome

研究代表者
北村　俊雄（KITAMURA, TOSHIO）

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：20282527

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）：HL60はレチノイン酸で好中球に、Vitamin D3で単球に分化する。本研究ではHL60分化において経時的にRNAseqを行い、好中球および単球に分化する際に上昇してくる遺伝子を複数の遺伝子を同定した。しかしながら予想したようにこれらの遺伝子が染色体上の近傍に存在するということはなかった。そこで、HL60の分化におけるエピジェネティクスが果たす役割を調べるためにエピジェネティクス因子ASXL1のノックダウンを行い、細胞分化とヒストン修飾の関係を調べた。ASXL1ノックダウンはヒストンH3K4とH3K27のトリメチル化を低下させ、HL60の分化を阻害した。

研究成果の概要（英文）：A human leukemic cell line HL60 differentiates to granulocytes and monocytes in response to retinoic acid and vitamin D3 treatment, respectively. In this project, we performed RNAseq analysis serially, and searched genes whose expression increases during the differentiation processes. In the results, we have identified several such genes. However, in contrast to our prediction, these genes do not localize in the neighborhood of chromosomes. Therefore, to investigate the roles of epigenetics in the differentiation of HL60 cells, we next knocked down an epigenetic factor ASXL1 involved in histone modification and analyzed the relationship between cell differentiation and histone modification. We have found that ASXL1 knockdown decreases trimethylation of histone H3K4 and H3K27 leading to inhibition of the differentiation of HL60 cells.

研究分野：分子生物学・血液腫瘍学

キーワード：エピジェネティクス　細胞分化　ヒストン修飾　スプライシング

1．研究開始当初の背景

DNA メチル化解析や ChIP-シークエンスなどを利用して網羅的にヒストンと DNA の修飾を調べることが可能になり、エピジェネティクス研究は大きく進歩しつつある。最近、研究代表者らはマウスモデルを利用して、ポリコーム関連遺伝子 ASXL-1C 末欠失変異体が PRC2 複合体の機能を阻害することによって骨髄異形成症候群（MDS）の発症を誘導することを見いだした。その分子機構は、変異型 ASXL1 がヒストンメチル化酵素 EZH2 を抑制し、抑制修飾の代表的マークであるヒストン H3K27 のトリメチル化（H3K27me3）の低下を介して、HoxA9 や miR125 の発現の脱抑制を誘導することである（Inoue et al. J. Clin. Invest., 2013)。この際、HoxA9 だけではなく、HoxA5、HoxA7、HoxA10、HoxA11 など近傍の遺伝子のプロモーター領域の H3K27me3 も一様に低下し、これらの遺伝子の発現が上昇した。この結果は染色体上近傍に存在する遺伝子の発現が同様の調節を受ける可能性を示唆している。一方、研究分担者の稲葉、松井らは、MDS の染色体異常の１つとして知られている染色体 7q の欠失部位に存在する複数の遺伝子の haploinsufficiency（２つある遺伝子の１つが欠失すること）が MDS 発症に寄与することを明らかにした（Nagamachi et al. Cancer Cell, 2013)。この結果は、染色体近傍に存在する複数の遺伝子の欠失が造血細胞の分化増殖に異常をもたらし、MDS 発症を誘導することを示唆している。

上記の研究結果から、染色体上の近傍に存在する遺伝子群が特定の細胞機能に関与し、その発現も同様の調節を受けるという仮説を立てた。染色体上で転写が活性化される部位と不活化される部位の境界にはインシュレーターと呼ばれる区切り壁が存在すると考えられている。インシュレーターの実態は謎であったが、コヒーシン複合体と転写抑制因子 CTCF の関与が報告された（Wendt et al. Nature, 2008)。インシュレーターはゲノムに 13,000 カ所程度存在すると言われているが、我々が想定する染色体マクロレベルの調節機構との関係は不明である。

2．研究の目的

細胞の運命は染色体ヒストン修飾と転写因子によって調節される遺伝子発現によって規定される。ヒストンのメチル化やアセチル化などの修飾と DNA メチル化は転写因子と相まって、遺伝子発現制御において重要な働きをすることがこれまでの研究で明らかになった。しかしながら、多数の遺伝子の発現がどのようにコーディネートされ調節されるかに関しては未知の部分が多い。我々は以下に述べる最近の知見から、これらの染色体修飾が染色体のブロック単位で起こり、細胞運命や機能を統合的に規定しているという仮説にいたった。この仮説を検証するため、ヒト白血病細胞株 HL60 を好中球および単球に分化誘導した細胞で、DNA メチル化およびヒストン修飾を網羅的に解析し、細胞の運命や機能と染色体修飾の変化および遺伝子発現との関係を調べる。

3．研究の方法

HL60 でレチノイン酸（ATRA）あるいはビタミン D3（VitD3）で好中球あるいは単球への分化を誘導し、刺激３０分後、１時間、２時間、４時間、６時間、１２時間、２４時間、４８時間、７２時間後の RNA を抽出し、それぞれライブラリーを作成し、RNA seq を行い、刺激前の細胞と較べて発現が変化する遺伝子を同定した。同定した遺伝子については Q-PCR で発現変化を確認した。

次に HL60 において ASXL1 をノック

ダウンしてATRAで分化誘導をして、細胞分化を調べた。また、分化誘導前後でRNAseqおよびChIPseqを行なう。

４．研究成果

多くの分化関連遺伝子の発現上昇、幹細胞性に関与する遺伝子の発現低下が認められた。これらの遺伝子群は、好中球に分化するときに主に発現が上昇する遺伝子（FGR、C10orf54、BCL2A1など）、どちらでも上昇する遺伝子（SEMA6B、C/EBPβ、CD38など）、どちらでも低下する遺伝子（CD34、c-Kitなど）に分類できた。しかしながらこれらの遺伝子が染色体上の近傍に存在するということはなかった（図）。遺伝子発現変化が染色体のブロック毎に起こっているという明らかな証拠は得られなかった。今回の実験では単球分化特異的に発現が変化する遺伝子は同定できなかった。

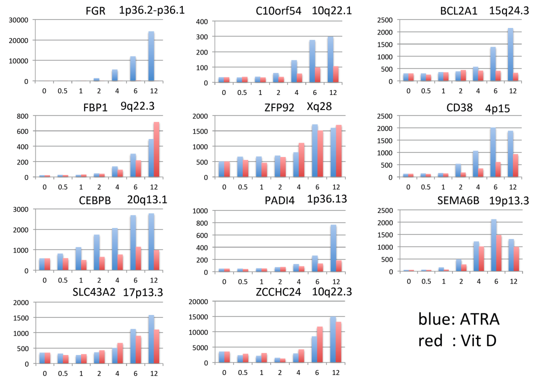

図 HL60分化で発現上昇する遺伝子とその遺伝子座

これらの遺伝子のなかで、分化誘導前には発現がほとんどなく、好中球および単球への分化誘導後に早期に発現が上昇してくる遺伝子として Sema6B に注目して研究を進めた。Sema6Bは神経細胞の成長に関与することが知られている遺伝子であるが、造血細胞分化に関与していることは今までに知られていない。我々は HL60 細胞の Sema5B 遺伝子座に蛍光蛋白質遺伝子 Azalea および mVenus をノックインすることにより、分化早期に蛍光色を発する細胞を樹立した。この細胞にさらに我々が以前樹立した G0 マーカーp27K-を導入することにより、細胞分化がどの細胞周期から起こるのかを同定することができる。

また、ASXL1をノックダウンしたHL60細胞では ATRA および Vit-D3 による分化誘導が抑制されるが、この際いかなる遺伝子発現変化が起こっているかを ATRA による分化誘導前後の遺伝子発現解析をRNAseqで行い、HL60の親株と比較した。またChIPseqも同時に行ない、遺伝子発現変化が染色体のブロック毎に起こっているという明らかな証拠は得られなかったが、興味深いことに分化誘導することによってスプライシング関連遺伝子の発現にスプライシング異常が起こること、ASXL1 ノックダウンによってこの傾向がさらに強くなる傾向が認められた。

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３件）

1. Inoue, D., Nishimura, K., Matsumoto, M., Nagase, R., Saika, M., Fujino, T., Nakayama, K-I. and <u>Kitamura, T.</u> (2016) Truncation mutants of ASXL1 observed in myeloid malignancies are expressed at detectable protein levels. **Exp. Hematol.** 44:172-176. 査読有 DOI: 10.1016/j.exphem.2015.11.011
2. Inoue, D., Nishimura, K., Kozuka-Hata, H., Oyama, M. and <u>Kitamura, T.</u> (2015) The stability of epigenetic factor ASXL1 is regulated through ubiquitination and USP7-mediated deubiquitination. **Leukemia** 29:2257-2260. 査読有 DOI: 10.1038/leu.2015.90
3. Inoue, D., Kitaura, J., Matsui, H., Hou, H-A, Chou, W-C, Nagamachi, A., Kawabata, K.C., Togami, K., Nagase, R., Horikawa, S., Saika, M., Micol, J-P., Hayashi, Y., Harada, Y., Harada, H., Inaba, T., Tien, H-F., Abdel-Wahab, O., and <u>Kitamura, T.</u> (2015) SETBP1 mutations drive leukemic transformation in ASXL1-murtated MDS. **Leukemia** 29:847-857. 査読有 DOI: 10.1038/leu. 2014.301

〔学会発表〕（計７件）

1. 井上大地・堀川小百合・松井啓隆・永瀬玲奈・斎賀真言・川畑公人・合山進・北村俊雄、『Novel roles of ASXL1 in epigenetic regulation』、THE ISEH 44th Annual Scientific Meeting. 2015 年９月１８日(国立京都国際会館・京都府・京都市）ポスター発表
2. T. Kitamura. 『Modeling the hematological malignancies in mice.』 43rd ISEH annual meeting. ２０１４年８月２１日～２４日（モントリオール・カナダ)、招待講演
3. 北村俊雄、『Molecular roles of ASXL1 mutations in inducing myelodysplastic syndromes.』日本癌学会、２０１４年９月２５日～２７日（神奈川県・横浜市・パシフィコ横浜）企画および講演
4. D.Inoue, J.Kitaura, K.Kawabata, H.Matsui, K.Togami, R.Nagase, S.Horikawa, T.Kitamura.『SETBP1 mutations drive leukemic transformation in ASXL1-mutated MDS』第７６回日本血液学会、２０１４年１０月３１日～１１月２日（大阪府・大阪市・大阪国際会議場)、口頭発表
5. D.Inoue, H.Matsui, HA.Hou, WC.Chou, A.Nagamachi, J.Kitaura, K.Kawabata, K.Togami, R.Nagase, S.Horikawa, M.Saika, JB.Micol, Y.Hayashi, Y.Harada, HF.Tien, O.Abdel-Wahab, T. Kitamura.『SETBP1 Mutations Drive Leukemic Transformation in ASXL1-Mutated MDS』The 56th American Society of Hematology annual meeting、２０１４年１２月８日（サンフランシスコ・アメリカ）口頭発表
6. D. Inoue, H. Matsui, T. Ochiya, F. Thol, M. Heuser, H-A How, W.C. Chou, J. Kitaura, R. Levine, H-F. Tien, O. Abdel-Wahab, T. Kitamura.『MDS induced by ASXL1 mutations and its leukemic transformation by an additional SETBP1 mutation』キーストンシンポジウム，２０１５年1月２５日～３０日（キーストン・米国）口頭発表
7. K. Kawabata, D. Inoue and T. Kitamura.『Molecular basis by which mutations of epigenetic factors induce MDS-like symptons.』日米造血器腫瘍セミナー　２０１５年3月１６−１８日（ハワイ島・米国）招待講演

〔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

６．研究組織
(1)研究代表者
北村　俊雄（KITAMURA, Toshio）
東京大学・医科学研究所・教授
研究者番号：20282527

(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

(3)研究分担者
松井　啓隆（MATSUI, Hirotaka）
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号： 60379849