

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22118002

研究課題名（和文）造血細胞分化における染色体修飾と転写因子のクロストーク

研究課題名（英文）Crosstalk between chromosome modification and transcription factors in the differentiation of hematopoietic cells

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） 225,800,000 円

研究成果の概要（和文）：造血器腫瘍で高率に見つかるエピジェネティクス因子ASXL1変異がマウスにおいて骨髄異形成症候群の発症を誘導することを示した。その分子機構に関して変異型ASXL1がPRC2機能を抑制することによりHoxA9やmiR125aの発現を脱抑制することが細胞のトランスフォーメーション、細胞分化抑制に関与することを示した。さらに、ASXL1の種々の結合分子を同定し、正常造血細胞分化におけるASXL1の働きを研究している。また、細胞分化と細胞周期の関係を調べる目的でG0期に特異的に光るマーカーを開発した。当該マーカーを造血系細胞で発現するトランスジェニックマウスを樹立し解析している。

研究成果の概要（英文）： We have demonstrated that the mutation of ASXL1 an epigenetic factor induces a myelodysplastic syndromes-like disease in mouse using mouse bone marrow transplant models. Concerning the molecular mechanisms, we have identified that suppression of PRC2 functions lead to derepression of HoxA9 and miR125a, playing critical roles in cell transformation and suppression of cell differentiation. In addition, we have identified a series of ASXL1 binding proteins, and investigate the physiological roles of ASXL1 in normal hematopoiesis. We also developed a novel G0 marker which expresses mVenus fluorescent protein only in cells in the G0 phase. We have now established and started the characterization of the transgenic mice expressing this G0 marker in hematopoietic cells.

研究分野：血液学

キーワード：細胞分化 エピジェネティクス 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者の北村らは、造血細胞分化が逸脱する疾患である骨髄異系性症候群 (MDS) のマウスモデルを樹立して解析していた。

(2) 研究分担者の阪上は細胞周期を2分画して細胞を発色させる Fucci 技術を樹立していた。

2. 研究の目的

正常の細胞分化は造血細胞で観察されるように不可逆的に進行する。本研究の目的は、細胞分化の研究に適している造血細胞を利用して、染色体修飾、転写調節、細胞周期調節などの視点から細胞分化の分子機構を解明することである。

(1) MDS 患者では、エピジェネティック因子に多くの変異が見ついている。患者由来変異型 TET2、ASXL1、EZH2 を骨髄移植によってマウスに導入して MDS 様の病態が発症することを見いだしたので、これらの系を解析することによって造血細胞分化の破綻と MDS の発症について解析する。また ASXL1 および EZH2 に関しては変異型遺伝子のトランスジェニックマウスあるいはノックインマウスを作成して解析する。これらの研究を通じて造血細胞の分化を

(2) Fucci 細胞では G0 と G1 期を見分けることができない。そこで研究代表者の北村は G0 期の細胞を特異的に染色するプローブの開発を目指す。また、研究分担者の沢野らは Fucci 細胞を改良し、次世代型として、G1, S, G2 期をそれぞれ分離できるようプローブの開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 患者由来の変異 ASXL1 および EZH2 を発現した骨髄細胞を照射したマウスに移植し発症した MDS 様病気を調べることによ

って造血細胞分化の分子機構とその破綻を明らかにする。

(2) G0 期から G1 期に移る際に p27 は核外に移送されユビキチン化されて分解されることが知られている。この p27 のユビキチン化による分解を細胞が G0 期から出るマーカーとして捉え、p27 の degron を同定することによって p27 がユビキチン化されて分解されると同時にユビキチン化される蛍光プローブを作製することによって G0 マーカーとして使用する。

4. 研究成果

(1) ASXL1 とミエロイド系細胞分化の関係 MDS/CMML 患者で同定される典型的な C 未欠失変異型 ASXL1 (ASXL1-MT) を発現させたマウス骨髄細胞を照射したマウスに移植すると1-2年で汎血球減少、ミエロイド系細胞の形態異常を伴う典型的な MDS 様疾患を発症し、一部は白血病に移行した。これらの MDS 細胞では予想通り、ヒストン H3K27me3 の低下に伴い HoxA9/A10 の発現が脱抑制していた。一方、興味深いことに ASXL1-MT は HL60 あるいは 32D 細胞の ATRA あるいは G-CSF 刺激による好中球への分化を著しく抑制した。分化抑制の分子機構を調べる目的で造血細胞株 32D に ASXL1-MT を発現させ発現解析を行なったところ、Clec5a の発現低下が認められた。さらに ASXL1-MT による分化抑制は Clec5a によって回復すること、シグナルを送ることができない Clec5a では回復しないことから、ASXL1-MT による好中球分化抑制に少なくとも部分的には Clec5a 発現抑制が関与していることが明らかとなった。次に ASXL1-MT が Clec5a 発現抑制する分子機構について調べ、ASXL1-MT によって脱抑制した miRNA125a が Clec5a の発現を抑制することを明らかにした (Inoue et al. J Clin Invest,

2013)。さらに ASXL1-MT は活性型 Ras および変異 SETBP1 と協調して、急性白血病の発症を誘導することも明らかにした (Inoue et al. J Clin Invest, 2013; Leukemia, 2015)。また白血病移行の分子機構として TGFbeta 経路の抑制が関与していることが示唆された。

ASXL1 が結合する分子を LC-MS/MS 解析で調べたところ、BAP1、OGT、HCF1、USP7、UBR5 などを ASXL1 結合分子として同定した。このうち、USP7 は ASXL1 を脱ユビキチン化することが明らかとなった (Inoue et al. Leukemia in press)。ASXL1 をノックダウンしても ASXL1-MT 同様に好中球分化が抑制されることが明らかとなった。この際、H3K27me3 に加えて H3K4me3 も低下しており、ASXL1 が OGT および MLL5 と共同してヒストンの活性化マークである H3K4me3 修飾にも拘っていることが示唆された。

(2) 新しい G0 マーカーおよび Fucci マーカーの開発と解析 研究代表者の北村のグループは p27 の分解を利用した G0 マーカーを作成した。当初、p27 のうちユビキチン化される部分を同定し、その部分を蛍光蛋白質遺伝子 mVenus と融合する予定であったが、degron が同定できなかった。そこで p27 全長を使用することにしたが、p27 には細胞周期抑制作用があるので、機能欠失型 p27 としてサイクリンに結合できない p27K-、CDK1 に結合できない p27C-、両方に結合できない p27CK-と mVenus を結合した融合蛋白質を使用した。3 つの変異体のうち、p27K-mVenus が細胞が G0 期から G1 期に移行する時に分解されることが示唆されたので、詳細に調べた。p27K-mVenus を NIH3T3 細胞に導入して調べたところ、p27K-mVenus の発現は ki-67 の発現と exclusive であり、細胞周期に入っていない細胞で主に発現していることが明らかとなった。細胞を time lapse ビデオで追跡してみると、G0 期と early G1 期 (こちらは発現量は低い) で mVenus の蛍光が確認できた。

p27K-mVenus が発現している細胞分画をソーティングによって分取し、発現解析および GSEA (gene set enrichment analysis) を行なったところ、p27K-mVenus が発現している分画は LT-HSC (long term hemopoietic stem cells) および Quiescent cell の発現プロファイルと相関した。これらの結果は p27-mVenus が G0 マーカーとして利用できること、また幹細胞マーカーとして使用できる可能性を示した (Oki et al. Scientific Reports, 2014)。CAG プロモーターを利用して p27K-mVenus のトランスジェニックマウスを樹立したところ、筋肉細胞に主に発現が認められた。興味深いことに p27K-mVenus は Sca1 陽性、CD34 陽性の筋肉前駆細胞分画に発現が認められた。このトランスジェニックマウスでは造血系細胞での発現がほとんど認められなかったため、Rosa26 にノックインしたマウスで vav-Cre で造血系特異的に発現できるマウスを樹立し、解析中である。

研究分担者の沢野らは、以前 G0/G1 期と S/G2/M 期を見分ける Fucci 細胞を開発したが、今回はさらに S 期、G2 期、M 期を色分けできる新しい Fucci-2 を開発した。研究代表者の G0 マーカーと組み合わせることによって細胞周期をほぼ網羅できる系となり、細胞分化との関係など種々の研究に利用できることが期待できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Inoue, D., Nishimura, K., Kozuka-Hata, H., Oyama, M. and Kitamura, T. (2015) The stability of epigenetic factor ASXL1 is regulated through ubiquitination and USP7-mediated deubiquitination. **Leukemia** in press. 査読有 doi: 10.1038/leu.2015.90.
2. 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 Kitamura, T. (2015) SETBP1 mutations drive leukemic transformation in ASXL1-mutated MDS. **Leukemia** 29:847-857. 査読有 doi:10.1038/leu.2014.301
3. Nakahara, F., Kitaura, J., Nishida, C., Uchida, T., Togami, K., Inoue, D., Matsukawa, T., Enomoto, Y., Kawabata, K.C., Chen-Yi, L., Komeno, Y., Izawa, K., Oki, T., Nagae, G., Harada, Y., Harada, H., Otsu, M., Aburatani, H., Hattori, K., and Kitamura, T. (2014) Hes1 promotes blast crisis in chronic myelogenous leukemia through MMP-9 up-regulation in leukemic cells. **Blood** 123:3932-3942. 査読有 doi: 10.1182/blood-2013-01-476747
 4. Sashida, G., Harada, H., Matsui, H., Oshima, M., Yui, M., Harada, Y., Tanaka, S., Mochizuki-Kashio, M., Wang, C., Saraya, A., Muto, T., Hayasi, Y., Suzuki, K., Nakajima, H., Inaba, T., Koseki, H., Huang, G., Kitamura, T. and Iwama, A. (2014) Ezh2 loss promotes development of myelodysplastic syndrome but attenuates its predisposition to leukemic transformation. **Nat. Commun.** 5:5177. 査読有 doi: 10.1038/ncomms5177
 5. Oki, T., Nishimura, K., Kitaura, J., Togami, K., Maehara, A., Izawa, K., Sakaue-Sawano, A., Niida, A., Miyano, S., Aburatani, H., Kiyonari, H., Miyawaki, A. and Kitamura, T. (2014) A novel cell-cycle indicator, mVenus-p27K-, identifies quiescent cells and visualizes G0-G1 transition. **Scientific Reports** 4:4012. 査読有 doi: 10.1038/srep04012
 6. Inoue, D., Kitaura, J., Togami, K., Nishimura, K., Enomoto, Y., Uchida, T., Kagiya, Y., Kawabata, K.C., Nakahara, F., Izawa, K., Oki, T., Maehara, A., Isobe, M., Tsuchiya, A., Harada, Y., Harada, H., Ochiya, T., Aburatani, A., Kimura, H., Thol, F., Heuser, M., Levine, R.L., Abdel-Wahab, O. and Kitamura, T. (2013) Myelodysplastic syndromes are induced by histone methylation-altering ASXL1 mutations. **J. Clin. Invest.** 123:4627-4640. 査読有 doi: 10.1172/JC170739
 7. Nishimura, K., Oki, T., Kitaura, J., Kuninaka, S., Saya, H., Sakaue-Sawano, A., Miyawaki, A. and Kitamura, T. (2013) APCCDH1 targets MgcRacGAP for destruction in the late M phase. **PLOS One** 8:e63001. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0063001
 8. Lee, C., Hu, J., Ralls, S., Kitamura, T., Loh, Y.P., Yang, Y., Mukoyama, Y.S. and Ahn, S. (2012) The molecular profiles of neural stem cell niche in the adult subventricular zone. **PLoS One** 7:e50501. 査読有 doi: 10.1371/journal.
 9. Izawa, K., Yamanishi, Y., Maehara, A., Takahashi, M., Isobe, M., Ito, S., Kaitani, A., Matsukawa, T., Matsuoka, T., Nakahara, F., Oki, T., Kiyonari, H., Abe, T., Okumura, K., *Kitamura, T., and *Kitaura, J. (2012) LMIR3 negatively regulates mast cell activation and allergic responses by binding to extracellular ceramide. **Immunity** 37:827-839. 査読有 doi: 10.1016/j.immuni.2012.08.018
 10. Oki, T., Kitaura, J., Watanabe-Okochi, N., Nishimura, K., Maehara, A., Uchida, T., Komeno, Y., Nakahara, F., Harada, Y., Sonoki, T., Harada, H., and Kitamura, T. (2012) Aberrant expression of RasGRP1 cooperates with gain-of-function NOTCH1 mutations in T-cell leukemogenesis. **Leukemia** 26:1038-1045. 査読有 doi: 10.1038/leu.2011.328

[学会発表] (計5件)

1. K. Kawabata, D. Inoue and T. Kitamura.
『Molecular basis by which mutations of epigenetic factors induce MDS-like symptoms.』日米造血器腫瘍 2015年 3月16～18日 (ハワイ島、米国) 招待講演

2. 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 Epigenetics and Cancer, 2015年1月25～30日 (キーストン、米国) プレナリー
3. D. Inoue and T. Kitamura. 『MDS induced by ASXL1 mutations and its leukemic transformation by an additional SETBP1 mutation.』 日仏癌会議、2014年11月19日 - 21日 (京都) 招待講演
4. 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
5. T. Kitamura. 『Modeling hematological malignancies.』 Hematopoiesis meeting, 2014年4月24～25日 (런던、スエーデン) 招待講演

[図書] (計2件)

1. Kitamura, T., Inoue, D., Okochi-Watanabe, N., Kato, N., Komeno, Y., Lu, Y., Enomoto, Y., Doki, N., Uchida, T., Kagiya, Y., Togami, K., Kawabata, K.C., Nagase, R., Horikawa, S., Hayashi, Y., Saika, M., Fukuyama, T., Izawa, K., Oki, T., Nakahara, F., and Kitaura, J. (2014) The molecular basis of myeloid malignancies. **Proceedings of Japanese Academy, Series B** 90:389-404. 日本学士院
2. Kitamura, T. (2013) Genetic and epigenetic alterations in hematopoietic malignancies. **Int. J. Hematol.** 97:163-164. シュプリンガー・ジャパン株式会社

[産業財産権]

本研究費によって生じたものはない。

[その他]

- ・ アウトリーチ活動として、平成25年6月6日と26年5月22日に東大医科研

において一般向けの講演を「エピジェネティクスによって決まる細胞の運命：エピジェネティクスって何？」というタイトルで行なった。平成27年2月20日には名古屋においてサイエンスカフェを開催し、「エピジェネティクスって何？」というタイトルで一般向けの講演を行なった。

- ・ ホームページ

研究室 http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/clinical_oncol/result.html

領域 <http://www.riken.jp/cell-fate/>

6. 研究組織

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

研究分担者

阪上 朝子 (SAKAUE, Asako)
 独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員
 研究者番号: 90462689

研究分担者

山本 雅之 (YAMAMOTO, Masayuki)
 東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授
 研究者番号: 50166823
 (2012.10.24 辞退)

連携研究者

石川 文彦 (ISHIKAWA, Fumihiko)
 独立行政法人理化学研究所・その他部局等・

ユニットリーダー

研究者番号: 30403918

連携研究者

宮脇 敦史 (MIYAWAKI, Atsushi)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究

センター・チームリーダー

研究者番号: 80251445