

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18418

研究課題名(和文)造血幹細胞機能および白血病発症におけるヒストン脱メチル化酵素JMJD3の機能解析

研究課題名(英文)JMJD3 plays essential roles in the maintenance of hematopoietic stem cells and leukemic stem cells.

研究代表者

山崎 憲政 (Yamasaki, Norimasa)

広島大学・技術センター・技術主任

研究者番号：70564136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：JMJD3はヒストンH3の第27番目のリジン(H3K27)を脱メチル化する酵素であり、ヒストン修飾を介した遺伝子発現の制御に関与するが、造血系における機能については不明な点が多い。研究代表者は、造血系におけるJMJD3の機能を明らかにする目的で、Jmjd3欠損マウスを作製した。JMJD3の欠損は定常状態の造血系には影響を与えなかったが、骨髄移植後の造血幹細胞またがん遺伝子を導入することによって得られる白血病幹細胞において、幹細胞機能の障害が認められた。JMJD3がH3K27の脱メチル化により細胞周期制御因子の発現を誘導し、増殖ストレス誘導後の幹細胞の細胞周期を制御していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：JMJD3 (Jumonji domain-containing 3) is a demethylase for histone H3 at Lys27 (H3K27) and contributes to various cellular processes including senescence, proliferation and differentiation. However, the roles of JMJD3 in normal hematopoiesis and leukemogenesis remain largely unknown. To address this issue, we generated conditional KO (cKO) mice for Jmjd3. Jmjd3-deficient mice did not show obvious hematopoietic abnormalities at steady state. However, under stress conditions, such as replicative stress by serial bone marrow transplantation and oncogenic stress by MLL-AF9-induced leukemia, Jmjd3-deficient hematopoietic stem and progenitor cells exhibited significant defects in the maintenance of stem cell activity. Cell cycle and gene set enrichment analyses revealed that Jmjd3-deficient HSCs exhibited excessive proliferation and loss of quiescence.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：JMJD3 造血幹細胞 白血病 エピジェネティクス ノックアウトマウス ヒストン脱メチル化酵素

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、造血器腫瘍である骨髄異形成症候群(MDS)症例において、ポリコム複合体2(PRC2)の構成因子であるEEDの機能抑制型変異を同定し、この変異を発現したマウスが腫瘍発症に対する感受性が高いことを明らかにした。併せて、EEDは造血幹細胞と骨髄造血微小環境との接着因子の発現を制御し、成体造血システムの恒常性の維持に必須であることも見出した。ヒストンH3の第27番目のトリメチル化されたリジン残基(H3K27me3)は遺伝子の転写を抑制するヒストン修飾であり、PRC2によって媒介される。同じくPRC2の構成因子の一つであるEZH2は様々な悪性腫瘍で高頻度に変異が認められており、H3K27me3の制御機構が造血細胞の運命決定に深く関与していることが伺える。

PRC2がH3K27をメチル化する一方で、H3K27を脱メチル化し、遺伝子の発現抑制を解除する酵素としてJMJD3とUTXの2種類が同定されており、H3K27me3を介した遺伝子発現の制御に関与している。しかし、これらの酵素による正常造血の維持機構や造血器腫瘍発症への関与については報告がほとんどされおらず、不明な点が多い。研究代表者はさらに造血系制御におけるH3K27me3の意義を包括的に明らかにする目的で、造血細胞優位かつ後天性にJMJD3を欠損可能な*Jmjd3*コンディショナルノックアウト(cKO)マウスを作製し、解析を行った。

解析の結果、JMJD3の欠損は定常状態の造血システムにほとんど影響を与えなかった。しかし、骨髄移植後の造血幹細胞(HSC)、また、がん遺伝子MLL-AF9を導入することによって得られる白血病幹細胞(LSC)において幹細胞性の維持に障害が認められた。

2. 研究の目的

上記のように、JMJD3は増殖ストレス誘導後のHSCとLSCの機能維持に重要な働きをしていると考えられる。本研究では、*Jmjd3* cKOマウスを用いて、JMJD3がどのような分子機構を介してこれら幹細胞の幹細胞活性を制御しているのか明らかにすることを目的とする。

また、臨床検体における発現解析で*Jmjd3*の発現量が造血器腫瘍で亢進していることを見出した。これらの結果から、JMJD3はloss of functionでは腫瘍抵抗性を、gain of functionで

は腫瘍感受性を付与していると推察される。そこで、研究代表者らは*Jmjd3*高発現マウスを作製し、*Jmjd3*の発現亢進と造血器腫瘍発症の関連性を明らかにするとともに、白血病細胞に対してJMJD3の阻害剤GSK-J4が増殖抑制に有効であるのか検討する。

得られた結果は、JMJD3による造血幹細胞活性維持機構の解明や、難治性であるMLL-AF9白血病に対する新規治療法の開発に応用されることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 次世代シーケンサーを駆使した遺伝子発現プロファイルの比較

コントロール及び*Jmjd3* cKOマウスの骨髄からHSCを単離し、次世代シーケンサーを用いたRNA-sequenceを行う。また、HSCにがん遺伝子MLL-AF9を導入した白血病細胞から単離したLSC分画についても同様にRNA-sequenceを行い、*Jmjd3*の欠損に伴い発現が変動した遺伝子群を網羅的に解析する。

(2) 標的遺伝子 locus におけるヒストン修飾

JMJD3はH3K27の脱メチル化を媒介し、遺伝子の発現を正に制御すると考えられる。従って、JMJD3の欠損に伴って発現が低下した遺伝子が標的遺伝子である可能性が高い。上記(1)で発現が低下した遺伝子群について、JMJD3の直接的な制御に関与しているのか検討する目的で、抗H3K27me3抗体を用いたChIP-PCRを行う。これら遺伝子の転写開始点上流のH3K27me3レベルを比較し、JMJD3の標的遺伝子を同定する。

(3) レトロウイルス発現系を用いた標的候補遺伝子の戻し実験

上記(2)で同定した標的遺伝子のcDNAを導入したレトロウイルスベクターを作製する。レトロウイルス発現系を利用し、*Jmjd3*欠損LSCにこの遺伝子を高発現させる。そして、レシピエントマウスに骨髄移植を行い、JMJD3欠損LSCの表現型の回復が認められるか検討し、標的責任遺伝子を同定する。

(4) *Jmjd3* 高発現マウスを用いた JMJD3 の機能解析

*Jmjd3*の発現亢進と造血器腫瘍発症の関連性を明らかにするため、研究代表者はRosa

stop cassetteを用いて*Jmjd3*高発現マウスを作製した。このマウスは、tamoxifenでCreリコンビナーゼの誘導をかけることで後天性にJMJD3を高発現する(図.1)。このマウスを用いて*Jmjd3*の高発現が造血系制御に与える影響について解明する。

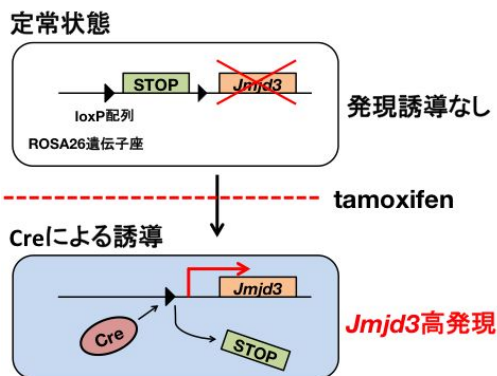


図.1 *Jmjd3*高発現マウスの作製

(5) ヒストン H3K27 脱メチル化酵素阻害剤 GSK-J4 による増殖抑制効果

MLL-AF9白血病細胞に対してコントロールの溶媒であるDMSOとヒストンH3K27脱メチル化酵素阻害剤GSK-J4を処理し、処理した白血病細胞をレシピエントマウスに骨髄移植する。レシピエントマウスが白血病発症に至る期間を測定し、この阻害剤が白血病細胞の増殖抑制に有効であるのか検討する。

4. 研究成果

(1) RNA-sequence の結果をもとに、GSEA (gene set enrichment analysis) によるパスウェイ解析を行った結果、*Jmjd3* 欠損 LSC はコントロール LSC と比較して、細胞周期を静止状態に維持する遺伝子群の発現が有意に低下していた。また、この現象は定常状態の HSC では認められなかったことから、増殖ストレス誘導後の幹細胞において、JMJD3 が細胞周期を制御していることが強く示唆された。

(2) 細胞周期関連遺伝子に注目してその発現変化を定量 PCR により解析した結果、*Jmjd3* 欠損 LSC ではコントロール LSC と比較して、CDK 阻害蛋白質 (cyclin-dependent kinase inhibitor, CDKI)である *p16^{INK4a}* と *p19^{ARF}* の発現量が低下していることが明らかとなった。さらに、JMJD3 の直接的な制御が関与しているのか検討する目的で抗 H3K27me3 抗体を用い

て ChIP-PCR を行った。その結果、JMJD3 の欠失に伴った *p16^{INK4a}* と *p19^{ARF}* の発現制御領域の H3K27me3 レベルの亢進が認められた。

(3) *p16^{INK4a}* cDNA を導入したレトロウイルスベクターを作製し、*Jmjd3* 欠損 LSC に感染させ、*p16^{INK4a}* 高発現細胞を樹立した。樹立した細胞をレシピエントマウスに骨髄移植し、白血病発症に至る期間を測定した。その結果、empty ベクターを感染させた *Jmjd3* 欠損 LSC と比較して、*p16^{INK4a}* 高発現 *Jmjd3* 欠損 LSC は、レシピエントマウスの白血病の発症に至る期間を短縮させた。

(4) 作製した *Jmjd3* 高発現マウスは、HSC の増加と加齢に伴う細胞異形を呈し、エピゲノム変化による造血障害が示唆された。LSC の起源は HSC や前駆細胞群であり、JMJD3 の高発現による自己複製能の亢進が HSC の白血病幹細胞化の引き金になる可能性がある。JMJD3 の高発現が HSC の自己複製能に与える影響について検討する目的で、コントロールおよび *Jmjd3* 高発現マウスから HSC を単離し、競合的骨髄移植を行った。移植されたレシピエントマウスの血液を継時的に採取し、末梢血中のドナー由来細胞のキメラ率を比較した結果、JMJD3 の高発現によって HSC の自己複製能が亢進することが明らかとなった。

(5) JMJD3 の治療標的としての有用性を評価する目的で、DMSO あるいは GSK-J4 を処理した白血病細胞をレシピエントマウスに骨髄移植した。白血病発症に至る期間を比較した結果、GSK-J4 の処理によって白血病発症の遅延化が認められた。

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5件)

(1) Nakata Y, Ueda T, Nagamchi A, Yamasaki N, Ikeda KI, Sera Y, Takubo K, Kanai A, Oda H, Sanada M, Ogawa S, Tsuji K, Ebihara Y, Wolff L, Honda ZI, Suda T, Inaba T, Honda H. Acquired expression of CblQ367P in mice induces dysplastic myelopoiesis mimicking chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 査読有 2017;129(15):2148-2160

(2) Ueda T, Nakata Y, Nagamachi A, Yamasaki N, Kanai A, Sera Y, Sasaki M, Matsui H, Honda ZI, Oda H, Wolff L, Inaba T, Honda H. Propagation of trimethylated H3K27 regulated by polycomb protein EED is required for embryogenesis, hematopoietic maintenance, and tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 査読有 2016;113(37):10370-10375

(3) Ikeda K, Ueda T, Yamasaki N, Nakata Y, Sera Y, Nagamachi A, Miyama T, Kobayashi H, Takubo K, Kanai A, Oda H, Wolff L, Honda Zi, Ichinohe T, Matsubara A, Suda T, Inaba T, Honda H. Maintenance of the functional integrity of mouse hematopoiesis by EED and promotion of leukemogenesis by EED haploinsufficiency. *Sci Rep*. 査読有 2016;6:29454

(4) Sera Y*, Yamasaki N*, Oda H, Nagamachi A, Wolff L, Inukai T, Tnaba T, Honda H. Identification of cooperative genes for E2A-PBX1 to develop acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Sci*. 査読有 2016;107(7):890-898

*These authors contributed equally to this work.

(5) Ueda T*, Nakata Y*, Yamasaki N*, Oda H, Sentani K, Kanai A, Onishi N, Ikeda K, Sera Y, Honda Zi, Tanaka K, Sata M, Ogawa S, Yasui W, Saya H, Takita J, Honda H. ALKR1275Q perturbs extracellular matrix, enhances cell invasion and leads to the development of neuroblastoma in cooperation with MYCN. *Oncogene*. 査読有 2016;35(34):4447-4458

*These authors contributed equally to this work.

〔学会発表〕(計3件)

(1) Yuichiro Nakata, Norimasa Yamasaki, Takeshi Ueda, Kenichiro Ikeda, Akiko Nagamachi, Toshiya Inaba and Hiroaki Honda. JMJD3 plays essential roles in the maintenance of hematopoietic stem cells and leukemic stem cells through the regulation of p16INK4a.第55回アメリカ血液学会 平成28年12月アメリカサンディエゴ

(2) Yasuyuki Sera, Takeshi Ueda, Yuichiro Nakata, Ken-ichiro Ikeda, Norimasa Yamasaki, Hideaki Oda, Akiko Nagamachi, Akinori Kanai, Toshio Suda, Keiyo Takubo, Hiroaki Honda. Roles of UTX, a histone H3K27 demethylase, in normal hematopoiesis and hematologic malignancies. 第78回日本血液学会 平成28年10月13日 横浜

(3) Yasuyuki Sera, Takeshi Ueda, Yuichiro Nakata, Ken-ichiro Ikeda, Norimasa Yamasaki, Hideaki Oda, Zen-ichiro Honda, Hiroaki Honda. Functional analysis of UTX, a histone H3K27

demethylase, in normal hematopoiesis and leukemogenesis. 第77回日本血液学会 平成27年10月18日 金沢

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 憲政 (YAMASAKI, Norimasa)

広島大学・技術センター・技術主任

研究者番号：70564136