

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19206

研究課題名(和文)白血物のTET2変異と病態検査に向けた基礎研究

研究課題名(英文)Characterization of missense mutations in TET2 gene in leukemia

研究代表者

山形 一行(YAMAGATA, Kazuyuki)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：60455912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：白血物において見られるTET2遺伝子の高頻度の体細胞変異の意義を明らかにし、臨床応用につなげることが本研究の目的である。本研究は特に変異が多数見つかる機能未知のCRドメインの機能を探ることに焦点を絞り、解析を進めた。その結果、TET2の機能未知のCRドメインがヒストンH3のリジン36番のモノ、ジメチルを認識するドメインであることを発見した。白血物で見られる体細胞変異を導入すると、この認識機構が攪乱することも確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は白血物で高頻度に体細胞変異の起こるTET2の機能未知ドメインがDNA配列変異を超えた意義(エピジェネティクス変異という)、すなわちヒストン修飾を読む機能を持つことを明らかにした。さらに体細胞変異がヒストン修飾の認識を変えることを示した。これらは学術的に興味深いのみならず、白血物に対する創薬について新しいターゲットを提示したという点で応用面でも重要である。

研究成果の概要(英文)：Missense mutations in Ten-eleven translocation 2 (TET2) gene are frequently found in leukaemia patients. Although mutations span the entire coding region, they tend to cluster in the C-terminal enzymatic domain and a cysteine-rich (CR) domain of unknown function. Herein, we found the CR domain binds chromatin preferentially at the histone H3 tail by recognising H3 lysine 36 mono- and dimethylation (H3K36me1/2). Importantly, missense mutations in the CR domain perturbed TET2 recruitment to the target locus and its enzymatic activities. Our findings identify a novel H3K36me recognition domain and uncover a critical link between histone modification and DNA hydroxylation in leukaemogenesis.

研究分野：生化学

キーワード：エピジェネティクス TET2 白血物 体細胞変異 生化学 EP4遺伝子

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA メチル化の異常は広範なガンに見られる現象である。この現象を裏付けるが如く、DNA 脱メチル化に関わる DNA ハイドロキシメチル化酵素 TET1 の発見(Tahiliani *et al. Science* 2009)とほぼ同時期に多発性骨髄腫の複数のコホートからファミリー遺伝子である *TET2* の高頻度な体細胞変異が発見された(Langemeijer *et al. Nature Genetics* 2009, Delhommeau *et al. N. Engl. J. Med.* 2009 など多数)。その後、急性白血病、慢性骨髄単球性白血病、骨髄増殖性腫瘍など、様々な白血病で同様の変異が高頻度に見つかっている(報告多数)。これにより、白血病発症において *TET2* による DNA のハイドロキシメチル化の制御が極めて重要な役割を果たしていることが強く示唆された。その後国内外の様々なグループが独立して *Tet2* 遺伝子改変マウスを作出し、表現型の微妙な違いはあるがどれも骨髄系前駆細胞が増加し前癌性クローンの蓄積が認められ、*TET2* の機能欠落が白血病態発症に極めて重要な役割を果たしていることが確認された(Moran-Crusio *et al. Cancer Cell* 2011, Kunimoto *et al. Sci Rep* 2012, *Blood* 2014 など多数)。さらに臨床的には「まだ」白血病態を呈していない中高齢者においても *TET2* の体細胞変異が発見された(Besque *et al. Nature genetics* 2012)ことから本遺伝子の変異は白血病進展の非常に早い時期に生じることが強く示唆され、その変異の検出は白血病的発症前に病変を察知する有用な白血病診断マーカーとして臨床応用が進みつつある。報告により差はあるものの *TET2* の変異頻度は様々なタイプの白血病で 10~50%の割合で変異が生じている (総説:Bacher *et al. Ann Hematol* 2010)。 *TET2* の変異はその遺伝子の全領域で発見されているが、その中でも 2 つのドメインでの変異のホットスポットの存在が明らかにされつつある。一つは酵素ドメインで、この領域の変異が酵素活性の弱体化、もしくは失活に繋がるということが明らかにされている(図 1、Ko *et al. Nature* 2010)。一方、本申請が臨床検査を視野に入れた機能解析を提案するシステイン残基に富む CR 領域も多数の変異が報告されている。ところが、その変異の意義についても、そもそもこの領域がどのような機能を有しているのかも、未だ明らかにされていない。

現在世界中の大学・企業で *TET2* 変異のスクリーニング系が研究されているが、肝心の「変異が *TET2* の機能にどう影響するか、どういう薬剤が有効か」といった情報は根本的に不足している。そのため、*TET2* 変異の検出系だけでなく、CR 変異に有効な薬剤のスクリーニング系、病理サンプルの解析・診断に有用な抗体製剤の開発などの潜在的需要が強く見込まれている。基礎分野においても、CR ドメインをはじめとする *TET2* そのものの機能について不明な点が多く、それが病理検査などの臨床検査開発における足かせとなっていた。

2. 研究の目的

DNA ハイドロキシメチル化酵素 *TET2* は DNA 脱メチル化触媒に関与し、その体細胞変異は広範な白血病で認められる。*TET2* 変異は酵素活性ドメインと機能未知の CR ドメインに集中している。そこで本申請は *TET2* 変異を病理検査・診断に応用することを目標とし、特に機能未知の CR ドメインの生理・病理学的な意義を明らかにする。その第一歩として CR ドメインの機能と変異の意義に焦点を当て、生化学・分子生物学・細胞生物学的手法を駆使し、白血病発症への分子機構の解明を目指す。計画遂行により得られる *TET2* 変異を標的とする病理検査、創薬に有用な実験系を樹立する本申請は、白血病の早期診断・新規薬剤の開発など、将来の白血病患者様への恩恵を目標に臨床応用を指向した基礎研究である。

申請者の予備検討により CR ドメインは *TET2* の機能維持に必須であり、その変異は *TET2* の機能異常を惹起することを明らかにした。そこで本申請では変異のホットスポットのうち酵素活性ドメインと比較して低分子量で創薬や検査の分野で扱いやすいと期待される CR ドメイン

に焦点を当て、CR そのものの機能とその変異の意義を生化学的・細胞生物学的なアプローチで解明を目指し、CR ドメインの変異に対する評価系・病理診断・分子標的薬の開発の可能性を探る。そのため TET2 の CR 変異の影響について、『①酵素活性、②局在、③ヒストンとの相互作用、④遺伝子発現、⑤細胞機能』の5つのパートに分け、それぞれ実験系を開発し、CR 変異の意義の解明に取り組む。臨床検査にも応用可能な実験系を申請者自らが開発することで、基礎・応用の双方から CR 変異の意義の解明を目指す

3. 研究の方法

TET2 の機能未知の CR ドメインの機能と白血病での変異の意義について、各計画に必要な実験系を樹立しながら生化学・分子生物学・免疫組織化学・細胞生物学の手法を駆使して解析する。そのため、2016年度は CR ドメインの変異が TET2 の酵素活性、細胞内局在に及ぼす影響を明らかにする。2017年度は CR ドメインの生化学的、及びゲノムワイドでの機能を解析する。2018年度は TET2 の CR ドメインの変異が血液幹細胞の分化に対する影響を確認すると共に、専門誌での公表を目指す。学内のリエゾンオフィスと協議の上、開発した実験系について必要に応じて特許出願の準備を行う。

2016 度

1. **野生型及び変異型 TET2 が酵素活性に及ぼす影響の解析:**野生型、及び変異型 TET2 の細胞内での酵素活性を測定するため、**全長 TET2 タンパク質の精製法を確立する**。患者由来変異型は CR 変異に加え酵素活性ドメイン変異を導入したものを作出する。酵素活性は抗ハイドロキシメチル(hmC)化抗体による Dot blot 及び免疫染色法で評価する。また正確に hmC を定量する為、研究協力者の木村博信博士(Otani *et al*, *PLoS One* 2013)らが開発した手法を共同で行う。続いて、基質として細胞から抽出したゲノム DNA、メチル化シトシンを含むオリゴヌクレオチドを用いて、生化学的に精製した野生型及び変異型 TET2 酵素が試験管内での活性を反応後 Dot blot 及び学内共同施設の質量分析機で酵素活性を確認する。
2. **野生型及び変異型 TET2 が細胞内の局在に及ぼす影響の解析:**TET ファミリーは核局在を示すことが複数報告されている(申請者も確認済)。本項では TET2 の変異(特に CR 変異)の細胞内局在への影響を免疫染色法及び生化学的分画法、ライブセルイメージングを駆使して確認する。事前検討では3種類の市販抗 TET2 抗体は過剰発現の TET2 に対しウェスタンブロットや免疫沈降に適さなかった。そこで本計画では更に多種の抗体を試すと共に、抗原用の TET2 ペプチドを合成あるいは大腸菌から精製し、ポリクローナル・モノクローナル双方の**良質な抗 TET2 抗体の作出を目指す**。TET2 の局在を学内共同施設の共焦点レーザー顕微鏡で観察を試みると共に、1.で作出した発現ベクターを用いて変異型 TET2 の局在を確認する。

2017 年度

1. **TET2 の CR 変異のヒストンに対する相互作用への影響:** 予備検討の結果、CR ドメインはヒストン修飾そのものを認識し、その変異はクロマチン画分への局在を減弱させる。そこで CR ドメインそのものの機能を探るため、学内の小林聡教授の協力の下 GST タグを付けた CR タンパクを大腸菌から精製し、ヒストン、ヌクレオソーム、ヒストンペプチドライブラリーとの結合をウェスタンブロットと Biacore を用いた等温滴定型熱量測定(ITC)で確認する。CR ドメインはシステインに富む領域の為精製難度が高い可能性も考慮し、システインの酸化を専門とする研究協力者の同志社大学の齊藤芳郎准教授(現:東北大学 教授)とも密接に連携し、本計画の基盤となる CR ドメインタンパクの精製系を確立する。
2. **TET2 の CR 変異の標的遺伝子座への影響:** 本項目で TET2 の変異による遺伝子発現の異常を

捉え、診断マーカーとしての可否を検討する。その為、まず研究協力者の東京工業大学の木村宏教授が開発したヒストン修飾に対するモノクローナル抗体(Kimura *et al*, *Cell Struct Funct*. 2008)を用い、ヒストン修飾と TET2 の遺伝子座上の局在が一致するかクロマチン免疫沈降法 (ChIP)で確認する。創薬等支援技術基盤プラットフォームコンソーシアムメンバーの東京大学の白髭克彦教授に協力を仰ぎ、次世代シーケンサーを用いたクロマチン免疫沈降法(ChIP)-Seq解析でゲノムワイドに確認することで TET2 標的遺伝子座を同定する。その後、TET2 に変異のある血球系の細胞株、2016 年度に作出した CR 変異 TET2 発現ベクターを用い、同定した遺伝子座への CR 変異の影響を確認する。また、TET2 の変異の標的遺伝子座への影響を qPCR により標的遺伝子の発現も確認すると共に、筑波大学大徳浩照講師と共同して同定した遺伝子座のプロモーター領域への寄与をレポーターアッセイで確認する。

2018 年度

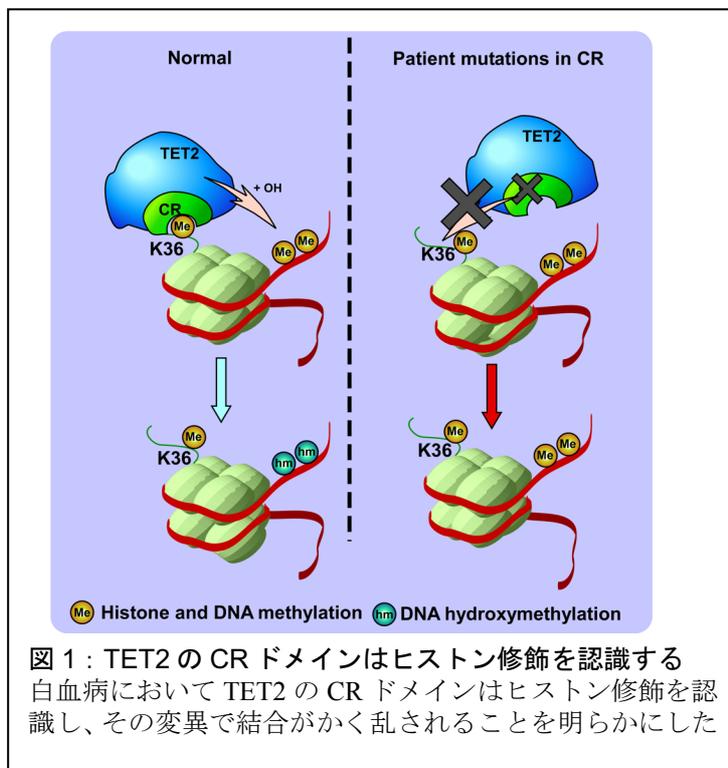
1.TET2 の CR 変異が細胞生物学的機能に及ぼす影響: 2016 年度、2017 年度に明らかになった表現型を HL-60 などの TET2 が発現している血球系細胞株、あるいはマウスから調製した造血幹細胞において CRISPR で変異をノックインし、細胞生物学的な機能を学内共同施設の FACS 解析で評価する。2016 年度に作出した抗 TET2 抗体により 2017 年度に同定した標的遺伝子座への TET2 のリクルートを HL-60 あるいは造血幹細胞で確認する。また上記細胞を *in vitro* で分化させ、血球系細胞の増殖能、分化能への影響を評価すると共に、ギムザ染色などを駆使して細胞の形態の詳細も確認する。各種変異株の利用が臨床での薬剤選択に有用か合わせて確認する。

4. 研究成果

本研究は初年度である 2016 年度に予想以上に進展し、TET2 の機能未知の CR ドメインがヒストン H3 のリジン 36 番のモノ、ジメチルを認識するドメインであることを発見した(図 1)。白血病で見られる体細胞変異を導入すると、この認識機構が攪乱することも確認した (Yamagata K. and Kobayashi A.; *J Biochem* (2017))。本研究結果を学術論文、招待講演、学会などで発表するに至り、高い評価を得た。また、本研究はオープンアクセスにすることで科研費にて得られた成果が誰にでもアクセスできるように配慮した。

2016 年度に想定以上に研究が進展したため、2017 年度に千葉大学に移

ってからは TET2 のゲノムワイドな標的遺伝子の探索と H3K36 メチルの関係について、次世代シーケンサーを用いて解析を進めた。千葉大学の先生方と連携し、少しずつではあるが Bioinformatics 解析を導入した。一連の解析から、TET2 の遺伝子上の局在の特徴について情報を蓄え、EP4 遺伝子上で重要な役割を果たしていることが示唆された。その後の解析から、EP4



遺伝子の発現制御に関して徳島大学の藤野教授と共同して EP4 遺伝子の発現抑制機構を明らかにした(図 2: Seira N. and Yamagata K. et al; Pharmacol Res Perspect. 2018)。これは、本研究が明らかにした結果の一部が大腸がん細胞株でも拡張できることを示すものである。

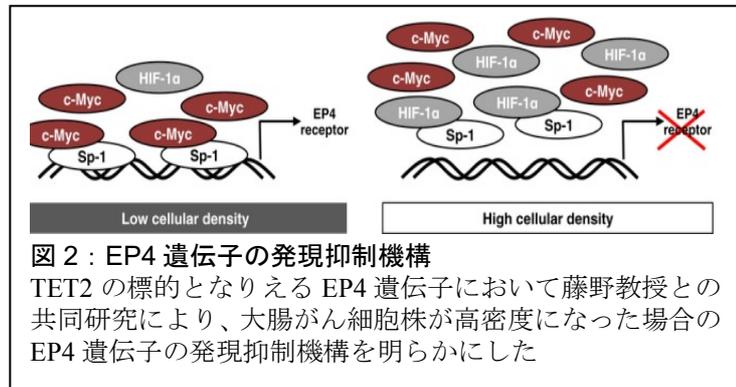


図 2 : EP4 遺伝子の発現抑制機構

TET2 の標的となりえる EP4 遺伝子において藤野教授との共同研究により、大腸がん細胞株が高密度になった場合の EP4 遺伝子の発現抑制機構を明らかにした

本来 2018 年度に国際学会での発表を経て本研究を終了する予定であったが、2018 年度に適切な国際学会が無かったため研究期間を延長した。2018 年度から行った千葉大学内での共同研究で Bioinformatics 解析をおこなった結果、多数の non-coding RNA を見出した。また、当該研究を 2019 年度まで延長し、千葉大学大学院医学研究院の田中知明教授と共同研究を開始した結果、ミトコンドリアゲノムを簡便にシーケンスする方法論を開発する事ができた (Yao Y. et al. Scientific Report 2019)。さらに、抗癌剤によって誘導される多数のノンコーディング RNA を同定し、ヒト ES 細胞での分化能に寄与している可能性を見出し、国際学会で発表を行った (Tamura A. and Yamagata K. et al. Human Frontier Science Program, 2019.07. 筑波)。

今後、2020 年度科研費に採択された基盤研究(C) (がんとヒト幹細胞で共に機能する長鎖非コード RNA 作用機序解明と難治癌における役割) で更に解明を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yao Yue, Nishimura Motoi, Murayama Kei, Kuranobu Naomi, Tojo Satomi, Beppu Minako, Ishige Takayuki, Itoga Sakae, Tsuchida Sachio, Mori Masato, Takayanagi Masaki, Yokoyama Masataka, Yamagata Kazuyuki, Kishita Yoshihito, Okazaki Yasushi, Nomura Fumio, Matsushita Kazuyuki, Tanaka Tomoaki	4. 巻 9
2. 論文標題 A simple method for sequencing the whole human mitochondrial genome directly from samples and its application to genetic testing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-53449-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Naofumi Seira Kazuyuki Yamagata Keijo Fukushima Yumi Araki Naoki Kurata Naoki Yanagisawa Masato Mashimo Hiroyuki Nakamura John W. Regan Toshihiko Murayama Hiromichi Fujino	4. 巻 6
2. 論文標題 Cellular density dependent increases in HIF 1 compete with c Myc to down regulate human EP4 receptor promoter activity through Sp 1 binding region	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pharmacology Research & Perspectives	6. 最初と最後の頁 e00441-55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1002/prp2.441	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamagata, K., and Kobayashi, A.	4. 巻 4
2. 論文標題 The cysteine-rich domain of TET2 binds preferentially to mono- and dimethylated histone H3K36	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Biochem.	6. 最初と最後の頁 327-330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvx004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 4件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ai TAMURA, Kazuyuki YAMAGATA and Tomoaki TANAKA
2. 発表標題 Identification and characterization of p53-inducible long noncoding RNAs in human embryonic stem cells
3. 学会等名 19th HFSP Awardees Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山形 一行
2. 発表標題 ヒトES細胞におけるがん抑制遺伝子p53誘導性 長鎖非コードRNAの同定とその解析
3. 学会等名 The 6th Cancer Epigenomics Symposium & Seminar in Hematologic Malignancies and Epigenetics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山形 一行
2. 発表標題 Identification and characterization of p53-inducible long noncoding RNAs in human embryonic stem cells
3. 学会等名 第92回 日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山形 一行、清良 尚史、福島 圭穂、荒木 裕美、倉田 直希、柳澤 直樹、間下 雅士、中村 浩之、REGAN W. John、村山 俊彦、藤野 裕道
2. 発表標題 HIF-1a and c-Myc oppositely regulate human EP4 receptor promoter activity in human colon cancer HCA-7 cells
3. 学会等名 第92回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山形一行
2. 発表標題 エピジェネティクス研究の最前線～白血病で頻繁に遺伝子変異の起こるTET2の機能未知ドメインの新機能の発見～
3. 学会等名 ABCDEFフォーラム2018 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 笠原 潤也、Kazuyuki YAMAGATA, Hiroyuki NAKAMURA, Toshihiro MURAYAMA
2. 発表標題 SrcIによるグルコシルセラミド合成酵素活性化機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会 第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山形 一行
2. 発表標題 Omics時代のデータの付き合い方 これまでとこれから
3. 学会等名 ROIS-DS-JOINT共同研究集会「若手カンファレンス：がん研究とデータサイエンスのコミュニケーション」(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuyuki YAMAGATA
2. 発表標題 「UJA 留学のすゝめ 2017 日本の科学技術を推進するネットワーク構築」
3. 学会等名 ConBio2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山形 一行
2. 発表標題 白血病で高頻度に変異の起こる TET2 の CR ドメインは histoneH3K36me を認識する
3. 学会等名 第 16 回 生命科学研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山形 一行、木村宏、小林聡、Yang SHI
2. 発表標題 "Cysteine rich domain of TET2 protein as a reader of histone H3 K36 mono and di methylation"
3. 学会等名 第89回日本生化学会大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 山形 一行、勝岡史城、木村宏、山本雅之、小林聡、Yang SHI
2. 発表標題 「白血病で高頻度に変異の起こるTET2のCRドメインはヒストンメチル化修飾を認識する」
3. 学会等名 学術研究支援基盤形成 先端モデル動物支援 若手支援技術講習会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 山形一行、木村宏、小林聡、Yang SHI
2. 発表標題 白血病で高頻度に変異の起こるTET2のCRドメインはhistoneH3K36meを認識する
3. 学会等名 第4回がん代謝研究会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----