

令和元年5月28日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06527

研究課題名（和文）S-アデノシルメチオニン合成阻害による骨髄赤芽球成熟促進機構の解明

研究課題名（英文）Identification of the mechanism by which SAM synthesis inhibition induces erythroblast maturation

研究代表者

加藤 浩貴 (Kato, Hiroki)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：50801677

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：貧血は世界で最も罹患率の高い疾患の一つである。特に血液疾患に伴う貧血は唯一の造血製剤であるエリスロポエチンに抵抗性で、新規貧血治療法の開発が望まれている。本研究では、遺伝子の発現制御に重要なエピゲノム修飾において重要な基質の合成阻害が赤血球の造血に重要であるという独自の知見に基づき、本基質の赤血球造血における機能の解明を行なった。その結果、本基質の合成阻害がエリスロポエチン非依存的な赤血球造血の促進を可能とする新たな貧血治療法になりうると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、エピゲノム修飾の基質が赤血球の造血に与える影響を様々な網羅的解析により明らかにすることに成功した。これにより、エピゲノム修飾が赤血球の造血時に果たす重要性の一端を解明することができた。即ち、赤血球はその成熟過程で大量のヘモグロビン合成や脱核などの劇的な変化を行うが、そこにエピゲノム修飾がどのような役割を果たしているか明らかにした。これは、複雑な赤血球成熟機構を理解する上で重要な進歩であると考えられ、本研究結果は新規の貧血治療薬の開発につながることで期待される。

研究成果の概要（英文）：Anemia, which is caused by the disorder of red blood cell production, is the diseases with the highest prevalence among all diseases in the world. Although erythropoietin is the only effective drug for anemia, most of the anemia patients from hematopoietic diseases are not fully responsive for erythropoietin. Epigenetic modification related substrates should have important roles in the regulations of hematopoiesis by regulating gene expressions and we have recently identified that one of these substrates have important roles in erythropoiesis. In this study, we have investigated the functions of the substrate in erythropoiesis and revealed that the substrate related metabolic processes can be one of the new therapeutic targets for anemia.

研究分野：造血

キーワード：赤血球造血 難治性貧血 エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

SAM (S アデノシルメチオニン) は ATP とメチオニンから SAM 合成酵素 MAT (メチオニアデノシルトランスフェラーゼ) の作用により合成され、主要なメチル基の供与体として DNA や RNA などの核酸やヒストンなどのタンパク質のメチル化修飾に必要である。一方で、これまでの知見から、造血組織は様々な造血細胞の活発な増殖や分化、成熟により維持され、その恒常性の維持には DNA や RNA、ヒストンなどのメチル化修飾が重要な役割を果たすということが知られている。同じゲノム情報を有した一つの造血幹細胞が徐々にその多分化能を失いながら、最終的には様々な機能を有する成熟血球に分化するためには、エピゲノム修飾による適切な遺伝子発現制御が重要であると考えられる。従って、SAM はエピゲノム修飾などを介して造血組織の恒常性維持に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。しかし、造血細胞での SAM の役割に関しては、これまでほとんど明らかになっていなかった。

貧血は世界で最も罹患率の高い疾患の一つであり、本邦においても、月経を有する女性の約一割が貧血であるなど、社会的にも克服すべき血液疾患の一つである。また、造血器腫瘍などに伴う難治性貧血はいまだに治療が困難な貧血であり、現在利用可能な唯一の造血剤であるエリスロポエニンにも反応性が低く、新たな治療法の開発が求められている。貧血に対する新たな治療法の開発には、赤血球造血がどのように制御されているか、その分子的なメカニズムを明らかにする必要がある。赤血球はその成熟過程で核の凝集や脱核などの劇的な変化を遂げるユニークな細胞であり、その成熟過程では DNA やヒストンなどのエピゲノム修飾が重要な役割を果たしている可能性が考えられるが、赤血球の成熟過程におけるエピゲノム修飾の重要性やエピゲノム修飾を具体的に調節する因子については未だ不明な点が多く残っている。また、エピゲノム修飾における重要な基質である SAM について、その赤血球造血における重要性はほとんど明らかになっていなかった。

研究代表者らはこれまでに、造血細胞での SAM の重要性を明らかにする為、マウスに SAM 合成阻害剤を投与する実験などを行い、SAM が赤血球の造血において重要な役割を果たしている可能性を示唆する所見を得ている。即ち、赤血球分化の変化に伴い、前駆細胞からの分化が促進した可能性を考えている。しかし、骨髄での赤血球造血において SAM が具体的にどのような役割を果たしているのかについては、未だほとんど明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究者らの独自の知見及びこれまでに実績のある各種網羅解析技術に基づき、SAM の合成阻害により骨髄で赤芽球の造血が変化する機構を解明することを目的とする。そこには、SAM によるエピゲノム調節機構が関わっている可能性が考えられるため、DNA やヒストンのメチル化変化に関する各種網羅解析 (バイサルファイトシーケンスやヒストン抗体による免疫沈降シーケンスなど) 及び遺伝子発現変化に関するトランスクリプトーム解析などを行い、SAM により調節される赤血球のエピゲノム変化とそれによる赤血球の造血変化の全体像を世界で初めて明らかにする。同時に、赤血球の成熟時に重要な分子的メカニズムや遺伝子などを同定することを目的の一つとする。本研究を通じて、赤芽球の造血時における SAM やエピゲノム修飾の重要性を明らかにする。新たな貧血治療法の開発の端緒となりうる標的分子の同定を目指す。

3. 研究の方法

(1) 赤芽球の造血段階による SAM 濃度変化の測定と SAM 合成酵素 MAT の役割の解明

赤芽球中の SAM は SAM 合成酵素 MAT の働きで調整されていると考えられるが、正常な赤芽球の分化時における SAM の濃度変化や MAT の働きについてはほとんど明らかとなっていないため本研究で解析する。即ち、野生型マウス骨髄から各分化段階にある赤芽球を分取する。MAT の発現変化については、細胞から RNA を抽出したのちに cDNA を合成し、qPCR 法で mRNA 発現変化を明らかにする。さらに、細胞からタンパク質を抽出しウエスタンブロット法でタンパク質量変化を明らかにする。また細胞内 SAM 量の変化については、質量分析装置を用いた解析により明らかにする。

(2) SAM の赤芽球の分化成熟制御機構における役割の解明

SAM 合成阻害剤投与による骨髄での赤血球造血の変化所見から、SAM が赤芽球細胞内でエピゲノム修飾変化や RNA のメチル化変化などに関して何らかの働きを行い、その結果として遺伝子発現変化が起きている可能性が考えられる。SAM の下流で、赤芽球の造血を調整する因子を明らかにするため、網羅的トランスクリプトーム解析で赤芽球の造血に関わる因子の候補を同定する。そのような候補が明らかになれば、貧血治療の新たな標的遺伝子となる可能性が考えられる。

(3) 赤芽球中の SAM 合成阻害によるエピゲノム修飾変化の測定

上記の如く、細胞内の SAM 濃度の変化が赤芽球のエピゲノム修飾変化をもたらす可能性が考えられるため、具体的にどのようなエピゲノム変化が起きるか明らかにする。まず、DNA のメチル化変化の有無を、コントロール投与群及び SAM 合成阻害剤投与群より赤芽球を分取後に DNA を抽出し、whole genome bisulfite sequencing (WGBS) を行い明らかにする。WGBS は広く一般的に使用されているゲノムワイドな DNA のメチル化に関する網羅的解析手法であり、研究代表者らはこれまでも本解析を行った実績がある。骨髄の赤芽球の DNA のメチル化はその成熟が進むのに伴い低下するとする有力な報告が既にされている。このことから、DNA のメチル化の変化が赤芽球の成熟の変化に関与している可能性が十分に考えられる。これまで、赤血球の成熟における DNA のメチル化変化の意義は十分明らかとなっておらず、本研究が赤芽球の成熟における DNA のメチル化変化の意義を明らかにする端緒となる可能性がある。DNA のメチル化変化に加えて、ヒストンのメチル化変化も赤芽球での遺伝子発現変化において重要な役割を果たしている可能性がある。そこで、赤芽球でのヒストンのメチル化変化を明らかにするため、上記と同様に赤芽球を分取し、代表的なヒストンのメチル化修飾 (H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3, H3K36me3 など) に対してウエスタンブロットにて変化の有無を確認し、必要に応じてクロマチン免疫沈降シーケンスにより網羅的な解析を追加していく。さらに、これまでに報告のある赤血球の造血に重要とされる各種転写因子 (GATA-1 など) のクロマチン免疫沈降シーケンス解析の結果なども統合し、赤血球の造血時における、転写因子とエピゲノム修飾変化の関係性やそこに SAM がどのように関わっているのか、その全体像を明らかにする。

4. 研究成果

まず、赤血球の造血過程での SAM 濃度の測定と SAM 合成酵素の遺伝子発現量の変化を解析した。その結果、赤血球の造血過程で SAM 合成量が変化し、それが SAM 合成酵素の発現変化に影響を受けることが明らかとなった。次に、骨髄の赤芽球の網羅的トランスクリプトーム解析を行った。その結果、SAM 合成が変化することで多くの遺伝子の発現変化が誘導され、その中には細胞分化、細胞増殖、エピゲノム修飾に関わる遺伝子が多く含まれていた。これらの遺伝子の発現変化が赤血球の造血を促している可能性が考えられた。さらに、網羅的な DNA のメチル化変化解析から、SAM 合成変化により DNA のメチル化がゲノム全体として変化する所見を見出した。また、代表的なヒストンのメチル化修飾に関するウエスタンブロット解析では、一部のメチル化修飾のみが特異的に変化している可能性が考えられた。変化の大きいヒストンメチル化修飾に対してクロマチン免疫沈降シークエンスを行なったところ、多くの遺伝子発現変化がヒストンのメチル化修飾変化により説明できる可能性とそこに転写因子が関わっている可能性が示唆された。従って、SAM 濃度の変化によるエピゲノム修飾変化が赤血球の造血に関与している可能性が強く考えられた。これらの機構が新規の貧血治療薬開発における新たな標的となりうると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

(全て査読あり)

1; Hiroki Kato, Ari Itoh-Nakadai, Mitsuyo Matsumoto, Yusho Ishii, Miki Watanabe-Matsui, Masatoshi Ikeda, Risa Ebina-Shibuya, Yuki Sato, Masahiro Kobayashi, Hironari Nishizawa, Katsushi Suzuki, Akihiko Muto, Tohru Fujiwara, Yasuhito Nannya, Luca Malcovati, Mario Cazzola, Seishi Ogawa, Hideo Harigae & Kazuhiko Igarashi, Infection perturbs Bach2- and Bach1-dependent erythroid lineage 'choice' to cause anemia, *Nature Immunology* 19 (10), pp1059-1070, 2018.

(DOI: 10.1038/s41590-018-0202-3)

2; Li J, Shima H, Nishizawa H, Ikeda M, Brydun A, Matsumoto M, Kato H, Saiki Y, Liu L, Watanabe-Matsui M, Iemura K, Tanaka K, Shiraki T, Igarashi K, Phosphorylation of BACH1 switches its function from transcription factor to mitotic chromosome regulator and promotes its interaction with HMMR, *Biochem Journal* 475 (5), pp981-1002, 2018.

(DOI: 10.1042/BCJ20170520)

3; Hasegawa S, Fujiwara T, Okitsu Y, Kato H, Sato Y, Fukuhara N, Onishi Y, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H, Effects of in vivo deletion of GATA2 in bone marrow stromal cells, *Experimental Hematology* 56, pp 31-45, 2017.

(DOI: 10.1016/j.exphem.2017.08.004)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

名称：造血促進剤

発明者：五十嵐和彦、加藤浩貴、石井悠翔、グエンチンロン、張替秀郎

権利者：国立大学法人東北大学

種類：特許

番号：特願 2018-032469

出願年：2018年2月26日

国内外の別：国内特許出願

名称：造血促進剤

発明者：五十嵐和彦、加藤浩貴、石井悠翔、グエンチンロン、張替秀郎

権利者：国立大学法人東北大学

種類：特許

番号：PCT/JP2019/007121

出願年：2019年2月25日

国内外の別：PCT 特許出願

〔その他〕

ホームページ等

東北大学 生物化学分野 <http://www.biochem.med.tohoku.ac.jp/index.php>

東北大学 血液・免疫病学分野 <http://www.rh.med.tohoku.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：松本光代

ローマ字氏名：Matsumoto Mitsuyo

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。