

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08679

研究課題名(和文) 病態特異的ヒストンメチル化制御異常の造血器腫瘍における役割

研究課題名(英文) Context-dependent regulation of histone methylation in a subset of hematologic malignancies

研究代表者

上田 健 (UEDA, Takeshi)

近畿大学・医学部・准教授

研究者番号：60585149

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：KDM4B (Lysine demethylase 4B) はKDM4ヒストン脱メチル化酵素ファミリーに属するタンパク質であり、エピゲノム制御に機能する。私達は、成人急性骨髄性白血病(AML)の5-10%を占める8;21染色体転座AMLではKDM4Bが高発現していることに着目し、ヒト細胞株および遺伝子欠損マウスを用いて、KDM4Bの白血病における役割を解析した。その結果、KDM4Bはエピゲノム制御を介し、8;21染色体転座と協調して白血病の病態を促進させることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、ヒストン脱メチル化酵素KDM4Bが特定の染色体異常を有するAMLで発現上昇を認めることに着目し、本因子がクロマチンの構造変化を介して、AMLの病態を促進させることを示した。本研究により、AMLの病態に促進的に働くエピゲノム制御機構の一端が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Lysine demethylase 4B (KDM4B) acts as an epigenetic regulator that belongs to the KDM4 histone demethylase family comprising KDM4A - KDM4D. In this study, we found that KDM4B was highly expressed in cases with acute myeloid leukemia (AML) associated with chromosomal translocation 8;21 [t(8;21)], and investigated the role of this molecule in the disease pathogenesis of AML using human cell lines and a mouse model. As a result, KDM4B was shown to epigenetically promote AML cooperatively with the t(8;21)-fusion gene.

研究分野：医歯薬学

キーワード：エピジェネティクス

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1)Lysine Demethylase 4B (KDM4B)は、類似したドメイン構造を有する4つのメンバー (KDM4A~4D)より構成されるKDM4ヒストン脱メチル化酵素ファミリーに属するタンパク質である。このファミリー分子は、DNAメチル化と関連した転写抑制マークであるヒストンH3の9番目のリジン残基のジメチル化・トリメチル化(H3K9me<sub>2</sub>/me<sub>3</sub>)を脱メチル化し、転写を促進的に調節するとされる。またH3K36me<sub>2</sub>/me<sub>3</sub>、H1.4K26me<sub>2</sub>/me<sub>3</sub>もその基質となることが知られている。

(2)KDM4Bは肺癌、乳癌などの固形腫瘍で高発現が見られ、エピゲノム制御異常を介して、腫瘍の発症、進展に促進的に働くと報告されている。研究室では以前に、KDM4Bが乳癌細胞株においてエストロゲン依存的に発現誘導され、腫瘍の増殖を促進させることを見出した。また組織特異的Kdm4b欠損マウスを作製して、本マウスが乳腺発育異常を呈することを明らかにした(Kawazu et al. PLoS One 2011)。

(3)一方で、私達は急性骨髄性白血病 (AML)の遺伝子発現データベースを体系的に解析して、8;21染色体転座AML [t(8;21)陽性AML]ではKDM4Bが高発現していることを見出した。t(8;21)陽性AMLの疾患責任融合遺伝子AML1-ETOにおいては、転写因子AML1のDNA結合ドメインが保たれており、本融合遺伝子はAML1標的遺伝子の発現パターンを変えることにより、白血病発症の素地となる造血細胞の自己複製能の亢進と未分化性に寄与することが知られている。比較的若年者に多く、成人AMLの5-10%を占めるとされる。他の主要な染色体転座や複合的染色体異常、正常核型を有するAMLではKDM4Bの高発現は認められず、またKDM4A、KDM4C、KDM4Dの発現はAMLのタイプによらずほぼ同様のレベルで検出された。

### 2. 研究の目的

上記の背景から、本研究ではt(8;21)陽性AMLにおけるKDM4Bの機能的役割を明らかにすることを目的とする。ヒト白血病細胞株を用いてKDM4B高発現の意義を探索する。またKdm4bコンディショナルノックアウトマウスを用いて、造血におけるKdm4bの生理的機能、及びKdm4b欠失の疾患発症、進展への影響を解析する。

### 3. 研究の方法

#### (1)ヒト細胞株に対する増殖能の評価

各遺伝子に対して二種類の異なる標的配列が挿入されたshRNAベクターを、各々独立にヒトAML細胞株にレンチウイルスの手法を用いて導入し、遺伝子ノックダウンによってKDM4Bの発現を抑制した。対照には、スクランブル配列が挿入されたshRNAベクターを使用した。2週間の継続的な細胞培養を行い、細胞数を評価した。

#### (2)Kdm4bコンディショナルノックアウトマウスの作製

8週齢のMx1-cre/Kdm4b<sup>fllox/fllox</sup>マウスに、polyI:C (polyriboinosinic:polyribocytidylic acid)を腹腔内投与し、造血幹・前駆細胞で後天的にKdm4bを欠失したマウスを作製した(以下遺伝子欠損マウスと表記)。

#### (3)正常造血における機能解析

遺伝子欠損マウスと対照マウスから骨髓細胞を調製し、フローサイトメトリーを用いて細胞表面マーカーを解析した。また、造血コロニーアッセイによって、造血能に与える影響を評価した。さらに若齢および高齢マウスの末梢血白血球数の測定と造血分化マーカーの解析を行い、加齢への影響を評価した。

#### (4)造血器腫瘍発症における機能解析

AML1-ETO (以下AEと表記)cDNAまたは、AE遺伝子のスプライシングバリエントでマウスにおいて高い造腫瘍活性を示すAML1-ETO9a (以下AE9aと表記)cDNAを発現するベクターを、マウスc-Kit陽性骨髓細胞に導入し、コロニープレイングアッセイによって、造血コロニー形成能を評価した。さらに放射線照射マウスへの骨髓移植実験により個体レベルで検証を行った。

#### (5)遺伝子発現解析

細胞から RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて RNA シーケンスを行った。得られた遺伝子発現データを基にパスウェイ解析のひとつである Gene set enrichment analysis を行い、特定の機能をもつ遺伝子群の発現がどのように変動したかをノックダウン細胞株と対照細胞株、あるいは遺伝子欠損マウスと対照マウス由来の細胞とでそれぞれ比較解析した。

#### (6) エピゲノム解析

ATAC-seq (Assay for Transposase Accessible Chromatin sequencing) を行い、次世代シーケンサーを用いて、オープンクロマチン領域をゲノムワイドに検出した。特異的塩基配列からなるアダプターと高活性トランスポゼースより構成される人工複合体をオープンクロマチン領域に挿入させ、切り出された配列を包括的に解析した。

### 4. 研究成果

(1) 代表的なヒト t(8;21) 陽性 AML 細胞株 SKNO-1 と Kasumi-1 において KDM4B タンパク質の発現を比較したところ、SKNO-1 細胞ではより高いレベルで KDM4B を発現していることがわかった。実際に、SKNO-1 を用いて KDM4B を安定的にノックダウンすると、Kasumi-1 と比較して、顕著な細胞増殖抑制効果が観察された。t(8;21) 陽性 AML 細胞株の増殖は、AE の発現に依存することがこれまでに報告されている。遺伝子発現解析の結果、KDM4B の発現阻害によって、AE 標的遺伝子の発現が全般的に抑制されていることが示された。さらに、SKNO-1 細胞に対する ATAC-seq の結果を、既報の AML1-ETO の ChIP-seq の結果と比較したところ、AE タンパク質が動員されるゲノム領域のうち、クロマチン構造がオープンとなっている箇所が、KDM4B の発現阻害によって有意に減少することがわかった。これらは、KDM4B が、エピゲノム制御を介して AE 標的遺伝子の発現維持に寄与し、細胞増殖に促進的に働くことを示している。

(2) 遺伝子欠損マウスと対照マウス由来の造血細胞に関して、造血幹・前駆細胞の分化表面マーカー及び、造血コロニー形成能に明らかな違いは検出されなかった。また polyI:C 投与後 12 ヶ月の観察において、血球形態や血球数、末梢血分化マーカーに関して両群間で明らかな違いは観察されなかった。以上のことから定常状態においては、Kdm4b の欠損は、これらの解析で評価される造血機能に大きな影響を及ぼさないものと考えられた。

(3) マウス造血細胞に AE または AE9a を遺伝子導入して造血コロニーアッセイを行うと、複数回のコロニーリプレATINGにより、対照群では造血コロニー形成能が保たれていたのに対し、Kdm4b 欠損群ではコロニー形成能が有意に低下していた。遺伝子導入を行うと、Kdm4b 欠損群では対照群に比べて、未分化性を特徴付ける遺伝子群の発現が全般的に抑制されており、分化細胞型へと遺伝子発現パターンの偏りを認めることがわかった。さらに AE9a 導入細胞を用いて連続的骨髄移植実験を行ったところ、対照群のレシピエントは全例白血病を発症し致死となったのに対し、Kdm4b 欠損群の細胞を移植されたマウスは、疾患の発症が遅延し有意に高い生存率を示した。以上のマウスを用いた解析から、Kdm4b は t(8;21) 陽性 AML において、幹細胞性の維持に寄与し病態促進的な作用を示すと考えられた。

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 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ota K, Komuro A, Amano H, Kanai A, Ge K, Ueda T, Okada H.	4. 巻 9
2. 論文標題 High Fat Diet Triggers a Reduction in Body Fat Mass in Female Mice Deficient for Utx demethylase.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 10036
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-46445-9	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 Kang C, Saso K, Ota K, Kawazu M, Ueda T, Okada H.	4. 巻 23
2. 論文標題 JMJD2B/KDM4B inactivation in adipose tissues accelerates obesity and systemic metabolic abnormalities.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes Cells.	6. 最初と最後の頁 767-777
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12627	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakata Y, Ueda T, Nagamachi 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.	4. 巻 129
2. 論文標題 Acquired expression of CblQ367P in mice induces dysplastic myelopoiesis mimicking chronic myelomonocytic leukemia.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Blood.	6. 最初と最後の頁 2148-2160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/blood-2016-06-724658	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上田 健、古室暁義、天野恭志、岡田 斉
2. 発表標題 急性骨髄性白血病におけるエピゲノム調節因子の役割
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田 健、金井昭教、古室暁義、天野恭志、岡田 斉
2. 発表標題 8;21転座急性骨髄性白血病におけるエピゲノム調節因子の役割
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田 健、太田一成、古室暁義、天野恭志、岡田斉
2. 発表標題 急性骨髄性白血病におけるエピゲノム調節因子の役割
3. 学会等名 未来創薬医療イノベーションシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田 健、古室暁義、天野恭志、岡田 斉
2. 発表標題 急性骨髄性白血病において高発現するヒストン脱メチル化酵素の機能解析
3. 学会等名 第22回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上田 健、金井昭教、太田一成、古室暁義、天野恭志、岡田 斉
2. 発表標題 ヒストン脱メチル化酵素KDM4Bの急性骨髄性白血病における役割
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上田 健、金井昭教、太田一成、古室暁義、天野恭志、岡 尚宏、岡田 斉
2. 発表標題 急性骨髄性白血病におけるヒストン脱メチル化酵素KDM4Bの役割
3. 学会等名 第80回日本血液学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡田 斉、古室暁義、上田 健
2. 発表標題 マウスモデルを用いたDNA損傷応答制御による治療関連白血病発症抑制の試み
3. 学会等名 第21回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岡田 斉、古室暁義、上田 健、太田一成
2. 発表標題 ヒストン脱メチル化酵素の乳がん発症・進展における役割
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 上田健、金井昭教、太田一成、古室暁義、岡田 斉
2. 発表標題 8;21染色体転座白血病において高発現するヒストン脱メチル化酵素の機能的意義
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会、第90回 日本生化学会
4. 発表年 2017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
研究 分担 者	金井 昭教  (KANAI Akinori)  (60549567)	広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教    (15401)	