

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09929

研究課題名(和文) CEBPA遺伝子3' UTRメチル化を伴うMyeloid-T白血病の分子基盤の解明

研究課題名(英文) A regulatory element in the 3 prime untranslated region of CEBPA is associated with myeloid/NK/T-cell leukemia

研究代表者

岩永 栄作 (Iwanaga, Eisaku)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：90743675

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)：データベース解析でCEBPAの3'-非翻訳領域(UTR)にメチル化可変領域(DMR)を同定した。CEBPA発現陽性細胞株はCEBPA 3'-UTRメチル化陰性、発現陰性細胞株はメチル化陽性だった。231例のAML症例解析で3'-UTRメチル化陽性例はCEBPA発現が低下しCD7/CD56陽性の未熟骨髄/NK/T細胞型だった。分子生物学的手法でCEBPA 3'-UTR DMRがIKZF1の結合によりCEBPA内因性プロモーターからの転写活性を増強することを示した。以上はCEBPA 3'-UTR DMRが骨髄/NK/T細胞系統の白血病発生に関連するCEBPAの活性化調節配列であることを示す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CEBPA-3' UTRメチル化型のCD7/CD56陽性Myeloid/NK/T白血病は簡便な検出法も含め我々が初めて報告する病型である。今回同定した一群はNOTCH1変異陰性やCD56陽性が特徴的でありMyeloid-T白血病の中でもさらにNKもしくは樹状細胞系への分化傾向を持った白血病である可能性があり新しい疾患概念の候補として興味深い。CEBPA遺伝子の3'非翻訳領域(UTR)がCEBPAに対する調節因子として作用しリンパ系転写因子IKZF1が結合することを明らかにした。このように骨髄性白血病においてもリンパ系の転写因子が白血化に関与していることは新たな治療戦略を作るうえで参考になりうる。

研究成果の概要(英文)：We focused on another differentially methylated region (DMR) of CEBPA and identified a novel control element. Using databases, we identified a conserved DMR in the CEBPA 3'-untranslated region (UTR). Myeloid cell lines with elevated CEBPA expression were negative for CEBPA 3'-UTR methylation. The 3'-UTR was methylated, and CEBPA expression was strongly suppressed, in non-myeloid cell lines. Methylation analysis of 231 AML cases showed that hypermethylation of the 3'-UTR was associated with AML that had a myeloid/NK/T-cell phenotype, down-regulated CEBPA, and immature CD7/CD56 positive phenotype. Furthermore, we discovered that the CEBPA 3'-UTR DMR could enhance transcription from the CEBPA native promoter. In vitro experiments identified IKZF1 binding sites in the 3'-UTR that are responsible for this increased transcription of CEBPA. These results indicate that the CEBPA 3'-UTR DMR is a positive regulatory element of CEBPA related to myeloid/NK/T-cell lineage leukemogenesis.

研究分野：血液内科学

キーワード：急性白血病 CEBPA DMR IKZF1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

CEBPA はミエロイド系分化に必須の転写因子でありヒト急性骨髄性白血病 (AML) で高頻度に遺伝子異常がみられる。そのプロモーターメチル化は T 細胞マーカー (TCR,LCK) の発現を特徴とする未熟な myeloid-T 細胞白血病に関連するが、プロモーターメチル化非依存の CEBPA 発現低下症例が存在し、その原因は不明であった。我々はデータベース解析を利用し CEBPA の発現低下にかかわる制御領域を同定しようと試みた。

#### 2. 研究の目的

AML 発症に関与する CEBPA の新規の制御領域を同定する。さらにその制御領域の機能を解析する。さらに制御領域のエピジェネティック変化と臨床病態との関連を解析する。

#### 3. 研究の方法

CEBPA の新しいメチル化可変制御領域を同定するために、公共データベースの細胞株データ (発現: U133plus2 microarray, メチル化: reduced representation of bisulfite sequence) 臨床臨床サンプルにおいては TCGA AML データセット (発現: RNA-seq、メチル化: Infinium HumanMethylation450 アレイ) を取得し methylKit もしくは RnBeads ソフトウェアで解析した。メチル化解析にはバイサルファイトシーケンス法と MSP (methylation-specific PCR) を用いた。転写因子候補の検出には TFBIND、CisIDR、PROMO ソフトウェアを用いた。3'UTR の転写調節活性の証明にはルシフェラーゼアッセイを用いた。IKZF1 の CEBPA-3'UTR への結合の証明には GST-IKZF1 を用いた EMSA、IKZF1 抗体-ChIP-PCR、および IKZF1 に対するノックダウンを U937 細胞を用いて解析した。

#### 4. 研究成果

Bioinformatics 解析により CEBPA の 3'UTR に CEBPA 発現と相関する DMR を同定した (図 1A)。3'UTR メチル化の有無は CEBPA 発現と明確に相関した (図 1B、図 2)。AML 231 例の解析では 6 例が 3'UTR メチル化陽性であり FAB M0 かつ CD7/56 陽性の myeloid-NK/T の形質を呈した (表 1、表 2)。レポーターアッセイ (図 3ABC) ではこの 3'UTR DMR は CEBPA 自身に対して正の調節活性を持ち EMSA (図 3D) および ChIP アッセイ (図 3E) および IKZF1 ノックダウン (図 3F) により主要な結合因子が IKZF1 であることが証明された。

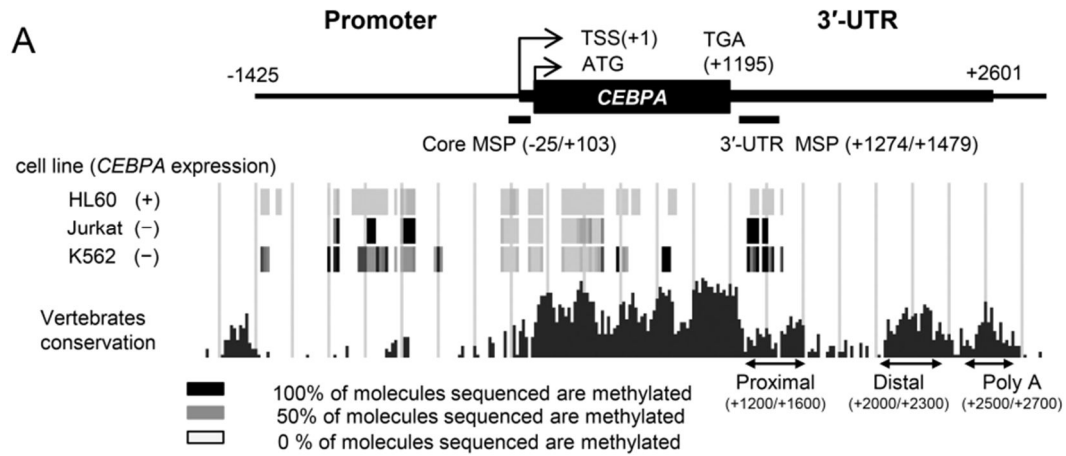


図 1 A. *CEBPA* の 3'UTR に同定された DMR

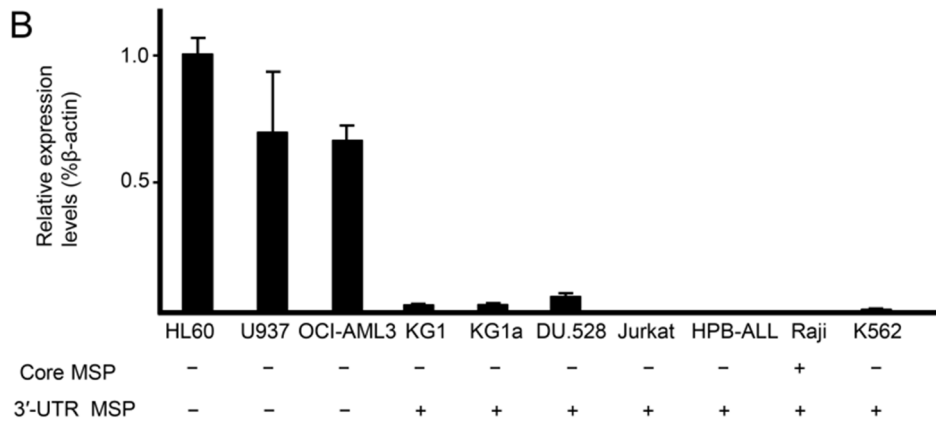


図 1B. 細胞株での *CEBPA* プロモーターおよび 3'UTR メチル化と *CEBPA* 発現の関連

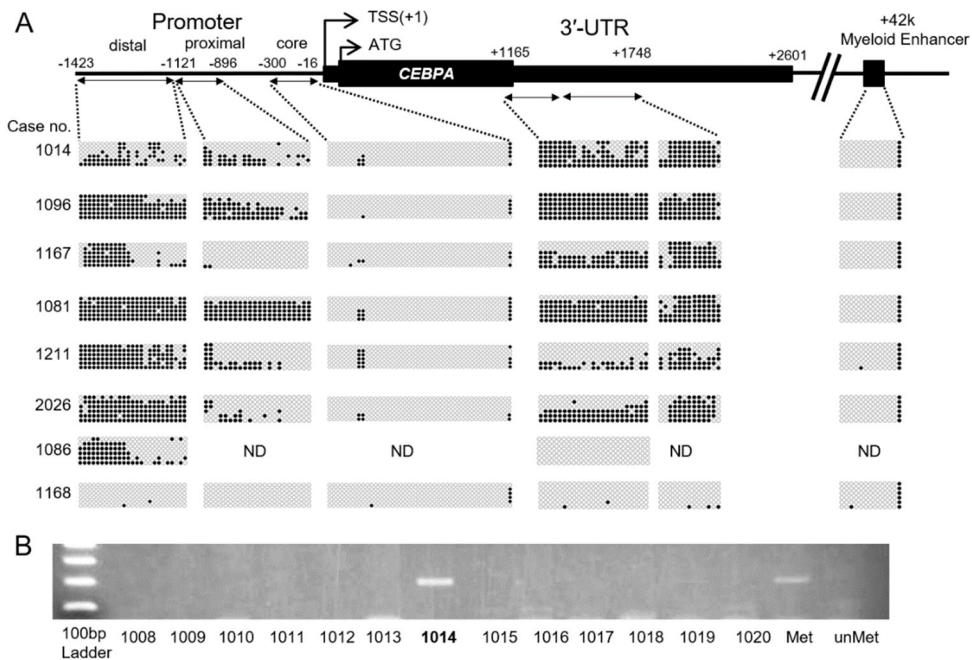


図 2. AML 臨床例における *CEBPA* 3'UTR メチル化

(A) バイサルファイトシーケンスによる 3'UTR メチル化陽性例の解析  
(B) MSP の陽性例の 1 例 (Case.1014)

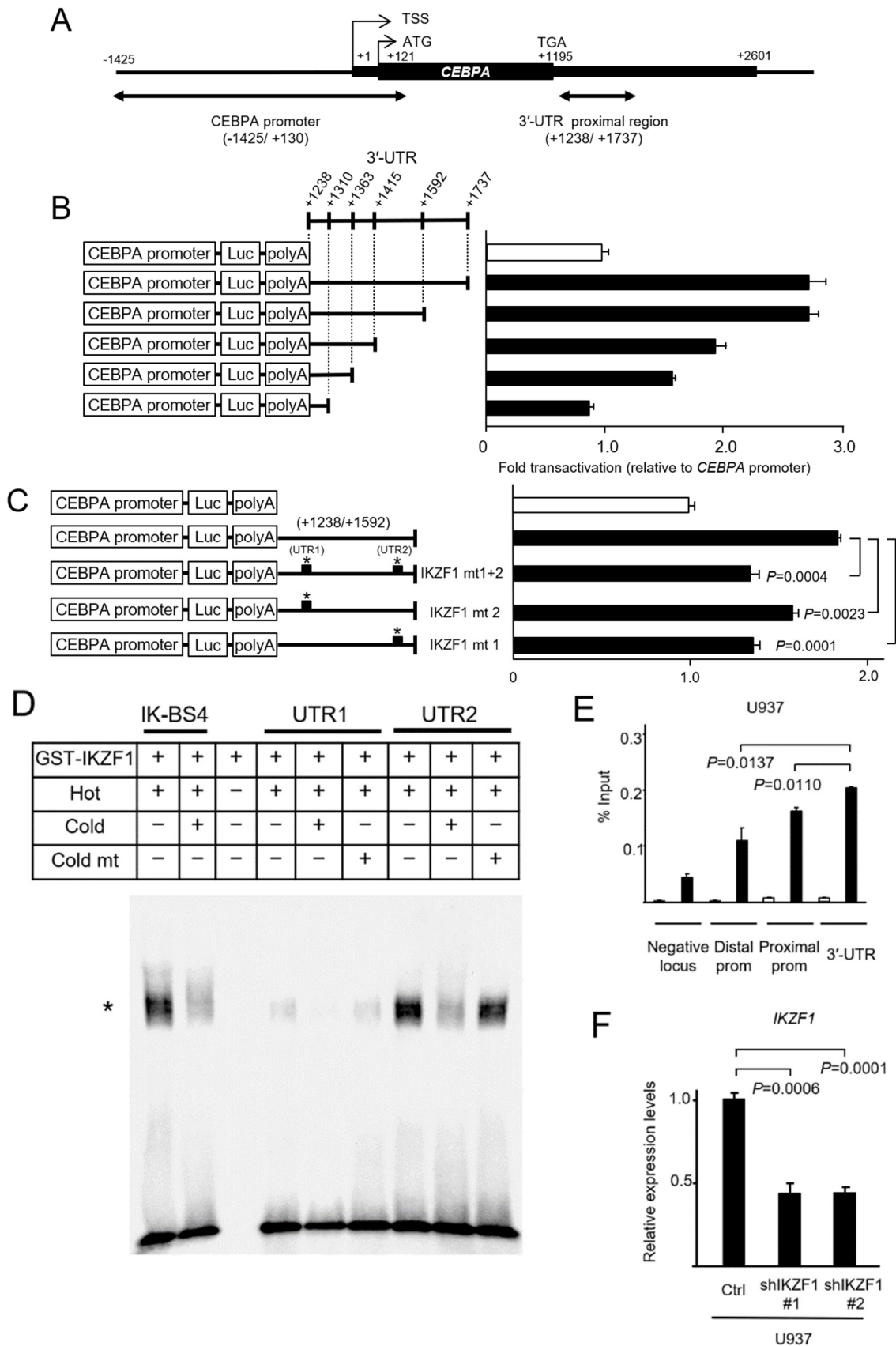


図3. IKZF1 が CEBPA 3'UTR に結合する

- (A) CEBPA 遺伝子周辺の模式図  
 (B) ルシフェラーゼアッセイにより調節活性のある部位を同定  
 (C) IKZF1 結合配列に変異を導入  
 (D) IKZF1 結合プローブを用いた EMSA  
 (E) IKZF1 抗体による ChIP アッセイ  
 (F) U937 細胞における IKZF1 ノックダウンにより CEBPA 発現が低下

**表 1. Clinical characteristics of AML according to 3'-UTR methylation**

	All cases	3'-UTR methylation		P value
		positive	negative	
n	231	6	225	
age	55 (15-86)	42.5 (23-81)	56 (15-86)	0.22
M/F ratio	137/94 (1.46/1)	5/1 (5/1)	132/93 (1.42/1)	0.41
FAB (%)				
M0	16 (6.9)	4 (66.7)	12 (5.3)	<0.01
M1	50 (21.6)	1 (16.7)	49 (21.8)	1.00
M2	61 (26.4)	0 (0.0)	61 (27.1)	0.35
M3	21 (9.1)	0 (0.0)	21 (9.3)	1.00
M3v	2 (0.9)	0 (0.0)	2 (0.9)	1.00
M4	49 (21.2)	1 (16.7)	48 (21.3)	1.00
M4Eo	12 (5.2)	0 (0.0)	12 (5.3)	1.00
M5a	5 (2.2)	0 (0.0)	5 (2.2)	1.00
M5b	9 (3.9)	0 (0.0)	9 (4.0)	1.00
M6	5 (2.2)	0 (0.0)	5 (2.2)	1.00
M7	1 (0.4)	0 (0.0)	1 (0.4)	1.00
WBC ( $\times 10^9/L$ )	16.9 (0.1-651.0)	4.8 (0.9-35.3)	17.7 (0.1-651.0)	0.05
Hb (g/dL)	8.2 (2.7-16.0)	6.8 (4.4-7.8)	8.5 (2.7-16.0)	0.04
PLT ( $\times 10^9/L$ )	51.0 (5.0-774.0)	35.0 (6.0-90.0)	51.0 (5.0-774.0)	0.15
PB blasts (%)	56.0 (0-100.0)	70.5 (11.0-79.0)	56.0 (0-100.0)	0.68
BM blasts (%)	67.0 (4.0-98.8)	79.4 (18.4-93.2)	66.8 (4.0-98.8)	0.52

**表 2. Immunophenotypes of 3'-UTR methylated AML**

Case no.	1014	1096	1167	1081	1211	2026	1086
3'-UTR methylation	+	+	+	+	+	+	-
Distal promoter methylation	+	+	+	+	+	+	+
FAB	M0	M1	M0	M0	M4	M0	M4
Chromosome complex	complex	complex	normal	complex	normal	complex	normal
CD2	-	-	-	-	+	-	-
CD4	-	-	-	-	+	-	+
CD7	+	±	+	+	-	-	-
CD10	-	+	-	-	ND	-	-
CD19	-	-	-	±	ND	-	-
CD13	+	+	+	+	-	+	+
CD33	+	+	+	+	+	+	+
CD34	+	+	+	+	+	+	+
CD117	ND	ND	+	+	ND	+	+
CD56	-	+	+	+	+	+partly	-
HLA-DR	-	-	+	+	+	+	+
<i>NPM1</i>	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
<i>CEBPA</i>	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
<i>DNMT3A</i>	wt	wt	wt	wt	wt	ND	wt
<i>IDH1</i>	wt	wt	wt	wt	wt	ND	wt
<i>IDH2</i>	R140Q	wt	wt	wt	wt	ND	wt
<i>FLT3-ITD</i>	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt

ND: not determined.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木村 由紀子, 岩永 栄作, 遠藤 慎也, 井上 明威, 徳永 賢治, 松岡 雅雄
2. 発表標題 Myeloid/T-NK白血病に関連したCEBPA 3' UTRにおけるIKZF1の重要な役割
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村 由紀子, 岩永 栄作, 遠藤 慎也, 井上 明威, 徳永 賢治, 松野 直史, 松岡 雅雄
2. 発表標題 Myeloid/NK/T cell leukemiaと関連したCEBPAの新たな制御領域
3. 学会等名 第79回日本血液学会学術集会 2017年10月21日
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