

令和元年6月14日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16180

研究課題名(和文)ポリコーム群遺伝子Pcgf1による造血分化制御とがん抑制機構の解明

研究課題名(英文)Role of the polycomb-group protein Pcgf1 in hematopoietic

研究代表者

中島 やえ子 (Nakajima-Takagi, Yaeko)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：50749497

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)：Non-canonical PRC1の構成因子Pcgf1の欠損マウスの解析から、Pcgf1は骨髄球分化制御因子Cebpa遺伝子を介して骨髄球分化・増殖を抑制的に制御していることを明らかにした。Pcgf4/Bmi1 (Canonical PRC1)はB細胞分化を抑制的に制御すると報告されており、2種のPRC1は異なる役割を果たしながら造血細胞分化を制御していることが明らかになった。

また、骨髄増殖性疾患のマウスモデルとPcgf1欠損マウスのコンパウンドマウス(JAK2V617F/Pcgf1 /)の解析から、Pcgf1の機能不全は重篤な骨髄線維症を早期にもたすことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血細胞の制御におけるポリコーム群遺伝子の解析はこれまでCanonical PRC1を中心に行われ、重要な役割を果たすことが明らかにされてきた。一方で、近年、白血病など造血器腫瘍の遺伝子解析の結果から、その発症にnon-canonical PRC1の機能不全の寄与が示唆される造血器腫瘍があることがわかってきた。そのようななか、本研究はこれまで明らかにされていなかったnon-canonical PRC1の構成因子Pcgf1の造血細胞分化における役割を明らかにし、また、骨髄線維症をモデルとして病態の進展に関わることを示した。これは造血腫瘍の発症機序解明や治療モデルの確立に繋がる成果といえる。

研究成果の概要(英文)：Polycomb repressive complex (PRC) 1 negatively regulates transcription of target genes by mono-ubiquitylation of histone H2A at lysin 119. Pcgf1 is one of the non-canonical PRC1 components. We showed that Pcgf1 negatively regulated myeloid differentiation and proliferation by repressing the gene expression of Cebpa which is known as a critical regulator of myeloid development. It was reported that Pcgf4/Bmi1-containing canonical PRC1 was implicated in the suppression of B cell differentiation and our results suggest the distinct function of Pcgf1-containing non-canonical PRC1.1 and Bmi1-containing canonical PRC1 in hematopoietic differentiation.

We also examined the role of Pcgf1 in a mouse model of JAK2V617F-induced myelofibrosis. JAK2/Pcgf1 KO mice developed lethal myelofibrosis significantly earlier than the other genotypes, suggesting that insufficiency of non-canonical PRC1 complex accelerates the progression of myelofibrosis.

研究分野：造血細胞分化

キーワード：ポリコーム Pcgf1 骨髄球分化 JAK2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞において、様々なエピジェネティック制御機構の重要性が明らかにされているが、特にポリコーム群複合体によるクロマチン修飾を介した遺伝子発現の抑制的制御が自己複製能、多分化能を規定する上で重要な役割を果たす。ポリコーム群複合体は Pcgf ファミリー (Pcgf1-6) を含む PRC (Polycomb repressive complex) 1 (H2AK119ub1 のユビキチン修飾 <H2AK119ub1>を行う) と Ezh ファミリーを含む PRC2 (H3K27 のメチル化修飾 <H3K27me3>を行う) の2つに大きく分類される(図1)。PRC1 に関しては、これまでに Pcgf4/Bmi1 を含む Canonical PRC1 が精力的に解析され、造血幹細胞の自己複製能の維持に必須であること、B 細胞分化のマスター制御因子を標的遺伝子として B 細胞分化を抑制的に制御していることが明らかにされている。

一方で、最近、Pcgf1/3/5 を含む Non-canonical PRC1 が Canonical PRC1 とは異なる機能を示すことが明らかになりつつある(図1)。マウス ES 細胞を用いたロックダウン解析で、Pcgf1 は Non-canonical PRC1 複合体 PRC1.1 の構成因子として H2AK119ub1 の制御に関わることが示された(Wu et al., Nat Cell Biol, 2013)。また、Canonical PRC1 は PRC2 による H3K27me3 修飾依存的に標的遺伝子座にリクルートされ H2AK119ub1 修飾を行うと考えられているが、Non-canonical PRC1 は H3K27me3 修飾非依存的に標的遺伝子のヒストン修飾を制御しうることが生化学的解析から示されている(Blackledge et al., Cell, 2014)。さらに、ヒト白血病モデルにおいて Pcgf1 をロックダウンすると、白血病細胞の増殖活性が抑制されることが報告された、そのがん遺伝子的な活性が示されている(van den Boom et al., Cell Rep, 2016)。このような中、申請者らは Pcgf5 欠損マウスを解析し、H2AK119ub1 修飾の制御に関わるものの、造血細胞に維持には必須ではないことを報告 (Si and Nakajima-Takagi et al., Plos One, 2016, co-first author) し、また、Pcgf3 もその欠損マウスの解析から造血細胞機能には必須ではないとのデータを得ている(未発表データ)。これに対して、興味深いことに、Pcgf1 は造血細胞機能に必須であった。Pcgf1 欠損マウスにおいては、造血幹細胞の骨髄再構築能は維持されるものの、著明な骨髄球への分化の偏りを示し、約半数のマウスは髄外造血を伴う致死的な骨髄増殖性腫瘍様の病態を発症した。このことは Pcgf1 が造血幹細胞の分化決定において骨髄球分化・増殖の抑制因子として機能していることを示唆する。

近年、PRC2 の構成遺伝子である EZH2 に活性化型変異と機能喪失型変異の両方が造血器腫瘍において同定され、異常造血における機能解析が精力的に進められている。一方、PCGF1 と共に PRC1.1 を構成する BCOR や BCORL1 にも機能喪失型遺伝子変異が骨髄異形成症候群 (MDS) や急性骨髄性白血病、再生不良性貧血で報告されている (Damm et al., Blood, 2013; Kulasekararaj et al., Blood, 2014)。

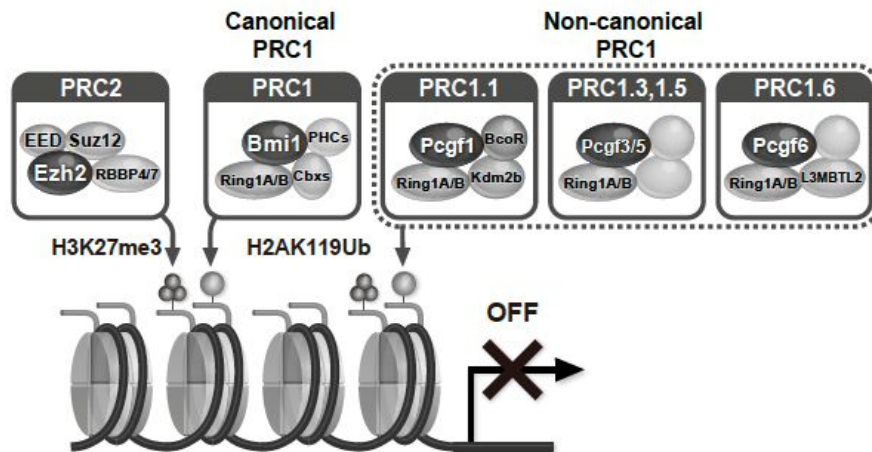


図1. Canonical PRC1とNon-canonical PRC1

2. 研究の目的

新規ポリコーム群複合体の一つである PRC (Polycomb repressive complex) 1.1 の構成因子である Pcgf1 を欠損するマウスは、造血幹細胞が骨髄球への著明な分化の偏りを示し、約半数のマウスは髄外造血を伴う致死的な骨髄増殖性腫瘍を発症する。また、JAK2V617F と Pcgf1 欠損マウスとのコンパウンドマウスは JAK2V617F と比較して早期に致死的な骨髄線維症を発症し死亡することを確認した。これらの知見は、Pcgf1 が造血幹細胞の分化決定において骨髄球分化・増殖の抑制因子として機能することを示唆する。本研究においては、Pcgf1 の骨髄球分化制御における重要な標的遺伝子の同定・解析を通して、PRC1.1 による造血幹細胞の分化制御とともに、骨髄球系腫瘍における PRC1.1 の新規がん抑制遺伝子としての機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)ポリコーム遺伝子 Pcgf1 欠損マウスは骨髄球への分化の偏りが観察される。その表現型をもたらず Pcgf1 の標的遺伝子の同定、さらにはその制御機構の解明を通して、骨髄球分化制御

におけるエピジェネティックな遺伝子発現制御の重要性を明らかにする。

(2)骨髄球系腫瘍の病態進行と *Pcgf1* の発現量との関連を理解するために *JAK2V617F* トランスジェニックマウス(骨髄増殖性疾患のモデルマウス)と *Pcgf1* 欠損マウスのコンパウンドマウスを作成し解析を行う。このマウスの病態進行に関わる *Pcgf1* の標的遺伝子、その制御機構を理解することで、エピジェネティックな分化制御機構の破綻と疾患進展に関する新規分子機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1)骨髄球分化における *Pcgf1* の標的遺伝子の同定

これまでに *Pcgf1* 欠損造血幹細胞、多能性前駆細胞を用いた RNA-seq の結果から *Pcgf1* 欠損造血幹細胞、多能性前駆細胞においては *Cebpa* 遺伝子の発現が亢進(脱抑制)し、また、GSEA(Gene Set Enrichment Analysis) から *Cebpa* ネットワーク関連遺伝群の発現も活性化していることが確認され、その候補遺伝子の一つとして骨髄球分化のマスター制御因子 *Cebpa* を同定していた。そこで本研究では *Cebpa* に注目し解析を行った。

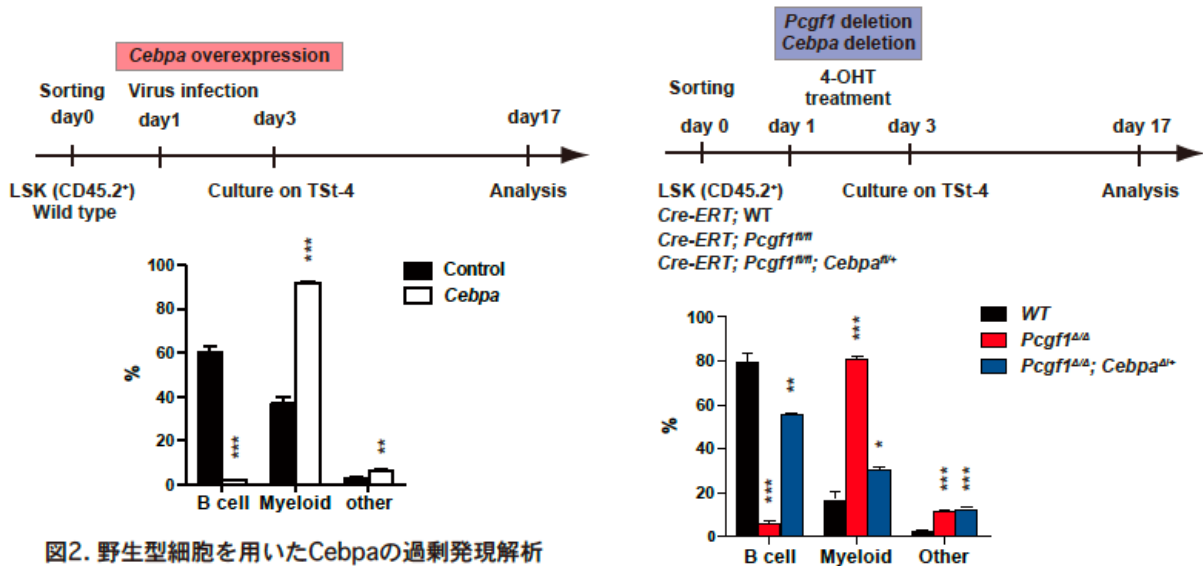


図2. 野生型細胞を用いたCebpaの過剰発現解析

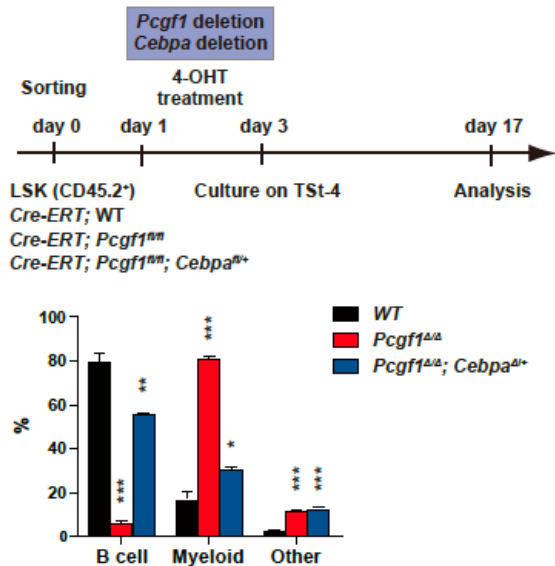


図3. Cebpa発現抑制によるPcgf1欠損表現型のレスキュー解析

まず、野生型マウスの造血幹前駆細胞に *Cebpa* を過剰発現し培養したところ、コントロールと比較して、B 細胞分化が抑制される一方で骨髄球分化の促進が観察され、*Pcgf1* 欠損造血幹前駆細胞の表現型が再現できた(図2)。また、*Pcgf1* 欠損マウスと *Cebpa* 欠損マウスを交配することにより *Pcgf1/Cebpa* コンパウンド欠損マウスを作成、造血幹前駆細胞を単離し、同様に培養を行った。その結果、*Pcgf1* 欠損造血幹前駆細胞で観察される B 細胞分化の抑制と骨髄球分化の促進が減弱し、*Pcgf1* 欠損による分化の偏りがレスキューされた(図3)。

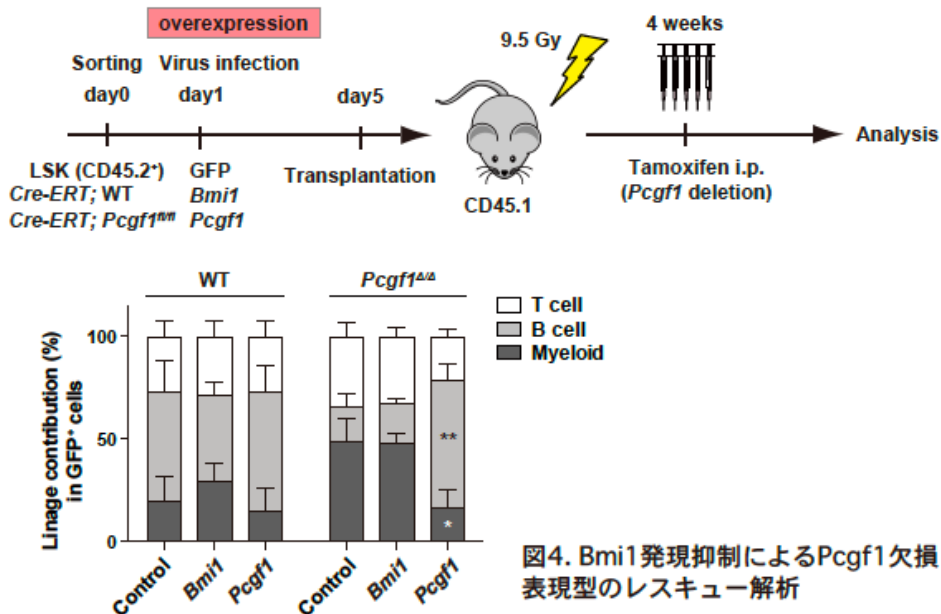


図4. Bmi1発現抑制によるPcgf1欠損表現型のレスキュー解析

一方で、Pcgf1 の機能を Pcgf4/Bmi1 で代償できるか検証するために、Pcgf1 もしくは Pcgf4/Bmi1 を過剰発現した *Pcgf1* 欠損造血幹前駆細胞を用いた移植実験を行った。移植マウスの表現型解析を行ったところ、Pcgf1 の過剰発現で *Pcgf1* 欠損の表現型はレスキューされるものの、Pcgf4/Bmi1 ではされなかった(図4)。さらに ChIP-seq 解析から Cebpa のプロモーター領域は H2AK119ub1 修飾のターゲットとなっており、Pcgf1 欠損造血幹前駆細胞ではその ub1 レベルが低下していた。一方、Bmi1/Pcgf4 欠損造血幹前駆細胞ではその低下は見られなかった。以上の結果より、Cebpa は Pcgf1 による骨髓球抑制における主要な標的遺伝子であること、また、Non-canonical PRC1 と Canonical PRC1 は異なる役割を果たしながら、造血細胞分化を制御していることが明らかになった。

(2) 骨髓増殖性疾患のマウスモデルを用いた病態進展における Pcgf1 の役割

骨髓増殖性疾患のマウスモデルと *Pcgf1* 欠損マウスのコンパウンドマウス (*JAK2V617F/Pcgf1*^{-/-}) の解析に関しては、*JAK2V617F/Pcgf1*^{-/-} マウスは *JAK2V617F* と比較して重篤な骨髓線維症を早期に発症をした。また、RNA-seq 解析を行ったところ、造血幹・前駆細胞において PRC1 標的遺伝子の発現が脱抑制していること、巨核球前駆細胞関連遺伝子群の発現が亢進していることが明らかになった。また、H2AK119ub1 の ChIP-seq 解析からは HoxA クラスター領域の ub1 レベルの低下とそれに伴う遺伝子発現の脱抑制が明らかになった。これらの遺伝子の発現制御異常が骨髓線維症の発症機序に関わっているものと考えられた。今後、これらの詳しい解析を進めていくと共に、骨髓線維症の治療モデルの確立を目指していく予定である。

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 2 件)

中島 やえ子、岩間 厚志. バリエント型ポリコム抑制性複合体 PRC1.1 は骨髓球分化決定を負に制御する. 第 22 回造血器腫瘍研究会, 2017 年.

Yaeko Nakajima-Takagi, Yusuke Isshiki, Junichiro Takano, Motohiko Oshima, Sha Si, Kazumasa Aoyama, Atsunori Saraya, Haruhiko Koseki, Tomokatsu Ikawa and Atsushi Iwama. Role of the polycomb-group protein Pcgf1 in the lineage commitment of hematopoietic stem and progenitor cells. 第 79 回日本血液学会学術集会, 2017 年.

6 . 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：岩間 厚志
ローマ字氏名：(IWAMA, atsushi)

研究協力者氏名：大島 基彦
ローマ字氏名：(OSHIMA, motohiko)

研究協力者氏名：篠田 大輔
ローマ字氏名：(SHINODA, daisuke)

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。