

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08852

研究課題名(和文)原因遺伝子RUNX1の新しい機能に基づく家族性血小板異常症の発症機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of familial platelet disorder based on the novel function of RUNX1

研究代表者

鈴木 貴紘 (SUZUKI, TAKAHIRO)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・上級研究員

研究者番号：00553661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：家族性血小板異常症(FPD)は血小板異常・高い骨髄性悪性腫瘍発症率を特徴とする遺伝性の血液疾患である。本研究ではFPDのDNAメチル化異常を明らかにすることを目的に行った。CRISPR/Cas9システムによってFPDモデルiPS細胞を3株樹立し、in vitroで造血前駆細胞および巨核球に分化誘導を行った結果、FPDモデル細胞では分化異常が示された。また、造血前駆細胞でのDNAメチル化異常を同定し、高メチル化異常部位にETSファミリー転写因子結合モチーフが濃縮していることを見出した。このことは、ETSファミリー転写因子がFPDにおいてDNAメチル化異常を誘発していることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はこれまで知られていなかった家族性血小板異常症のDNAメチル化異常を明らかにした新規性の高い研究成果である。家族性血小板異常症は高率に骨髄性悪性腫瘍を発症することから"前がん状態"にあると考えることができる。実際に家族性血小板異常症の原因遺伝子RUNX1は突発性の骨髄性悪性腫瘍においても高い確率で変異がみられる。このことから、本研究で明らかとなった家族性血小板異常症でのDNAメチル化異常は家族性血小板異常症自体の理解を深めるとともに、骨髄性悪性腫瘍の発症メカニズムについても重要な知見を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：Familial platelet dyscrasia (FPD) is an inherited hematologic disorder characterized by platelet abnormalities and high incidence of myeloid malignancies. The aim of this study was to identify DNA methylation abnormalities in FPD. Three FPD model iPS cell lines were established by CRISPR/Cas9 system and induced to differentiate into hematopoietic progenitor cells and megakaryocytes in vitro. We also identified abnormal DNA methylation in hematopoietic progenitor cells and found that ETS family transcription factor binding motifs were enriched in the hypermethylation sites. This suggests that ETS family transcription factors induce DNA methylation abnormalities in FPD.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：家族性血小板異常症 DNAメチル化

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

家族性血小板異常症 (FPD: Familial platelet disorder) は持続的な血小板の減少・機能異常による、出血傾向・紫斑・点状出血などを特徴とする常染色体優性遺伝性の血液疾患である。このような症状に加え、FPD 患者の 35%以上が生涯で急性骨髄性白血病や骨髄異形成症候群などの骨髄性悪性腫瘍を発症する重篤な疾患である。FPD の原因遺伝子は転写因子 RUNX1 であり、FPD 家系では RUNX1 遺伝子の様々な部位にヘテロ接合変異が確認される。しかし、疫学的に同定されている FPD 家系は約 30 程度であるのと同時に、RUNX1 遺伝子に変異を導入したマウスやゼブラフィッシュなどのモデル生物系の解析では血小板の減少や機能不全の表現型が再現できないことからいまだ不明な多い。

このような問題に対し、近年、FPD 患者由来細胞をもとに樹立した人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) (FPD-iPS) による *in vitro* モデルでの解析が行われるようになってきた (Sakurai *et al.* Leukemia (2014), Connely *et al.* Blood (2014), Izuka *et al.* Exp Hematol (2015))。FPD-iPS 細胞では *in vitro* での血液細胞系列への分化に異常が見られ、特に巨核球への分化効率の低下がみられるとともに、巨核球分化に関連する遺伝子の発現異常も報告されている。これらの結果から FPD-iPS 細胞は *in vitro* での FPD モデルとして有用であることが示された。しかし、前述のとおり確認されている FPD 家系が少数であることや倫理的な問題から FPD 患者由来 iPS 細胞の入手は困難であり、FPD における血小板減少や骨髄性悪性腫瘍発症の詳細な分子メカニズムは十分に解明されていない。

我々の研究グループは先行研究で FPD の原因遺伝子である RUNX1 をはじめ、多くの転写因子に DNA メチル化を制御する新たな機能があることを見出した (Suzuki *et al.* Blood Adv. (2017), Goyal *et al.* BMC Mol Biol. (2017))。このことから、FPD においても DNA メチル化異常が生じている可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、FPD-iPS 細胞を用いた *in vitro* モデルを用いて、造血前駆細胞での DNA メチル化異常を網羅的に明らかにすることでこれまで知られていない FPD の発症機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

FPD-iPS 細胞を *in vitro* で造血前駆細胞に分化誘導し、Enzymatic-Methyl Sequencing 法により網羅的に DNA メチル化プロファイルを明らかにした。得られた FPD モデル造血前駆細胞の DNA メチル化プロファイルと正常 iPS 細胞から分化誘導した造血前駆細胞の DNA メチル化プロファイルを比較することで FPD における DNA メチル化異常を同定し、転写因子モチーフエンリッチメント解析などから DNA メチル化異常の生じるメカニズムを解析した。

4. 研究成果

(1) FPD モデル iPS 細胞の樹立

研究当初、樹立済みの FPD 患者由来の iPS 細胞を入手することを想定していたが、倫理的な問題等により入手が困難だったため、健康者由来の iPS 細胞に CRISPR/Cas9 システムを用いて FPD で報告のあるヘテロ接合変異を導入した。RUNX1 の DNA 結合ドメイン (RUNT ドメイン) の変異 2 種類 (K83E, R201Q)、および trans-activation ドメインの変異 1 種類 (Y287X) の異なる変異を導入

した FPD-iPS 細胞を樹立した。

(2) FPD モデル iPS 細胞の造血幹細胞分化誘導
樹立した 3 種類の FPD-iPS 細胞を 2 次元培養
法により in vitro 分化誘導を行った。誘導さ
れた造血前駆細胞 (CD34 陽性・CD45 陽性細胞)
をフローサイトメトリーで解析したところ、
K83E-FPD 細胞ではほとんど造血前駆細胞が得
られなかった。また、R201Q-, Y287X-FPD 細胞
においても変異を導入していない細胞 (WT) と
比較して造血前駆細胞分化が有意に低下して
いた (図 1)。このことは FPD 患者由来の iPS 細胞
での報告と一致することから CRISPR/CAS9
で樹立された FPD-iPS 細胞も FPD モデルとし
て有用であることを示している。また、変異の
場所によって FPD の病態に違いがあることが
示唆された。

(2) 造血前駆細胞から巨核球への分化誘導

K83E-FPD 細胞は造血前駆細胞がほとんど得られ
なかったため、以降の解析からは除外した。
R201Q-FPD 造血前駆細胞、Y287X-FPD 造血前駆
細胞をさらに TPO, SCF, IL11 存在下で培養し
巨核球 (CD41a 陽性・CD42b 陽性細胞) へと分化
誘導した。分化誘導効率をフローサイトメト
リーで解析したところ、WT と比較して優位な
分化誘導効率の低下がみられたことから、ど
ちらの FPD モデル細胞でも実際の FPD の病態
である血小板の異常が再現されていることが
示された (図 2)。

(3) 転写因子結合モチーフエンリッチメント 解析

R201Q-FPD 造血前駆細胞、Y287X-FPD 造血前駆細胞
および WT の造血前駆細胞のメチロームデータ
を取得・比較し、DNA メチル化異常部位を同定し
た。その結果、R201Q 造血前駆細胞で 2,390 個の
低メチル化領域、8,434 個の高メチル化領域、Y287X 造血前駆細胞で 4,032 個の低メチル化領域、
11,668 個の高メチル化領域を同定した。それぞれに共通する低メチル化領域は 114 領域、高メ
チル化領域は 2,856 領域であった。また、転写因子結合モチーフエンリッチメント解析の結果、
共通する高メチル化領域には ETS ファミリー転写因子の結合モチーフが濃縮していたことから、
ETS ファミリー転写因子が FPD における DNA メチル化異常に関与していることが示唆された (図
3)。 ETS ファミリーの遺伝子発現を調べたところ、WT と比較して全体として FPD モデル造血

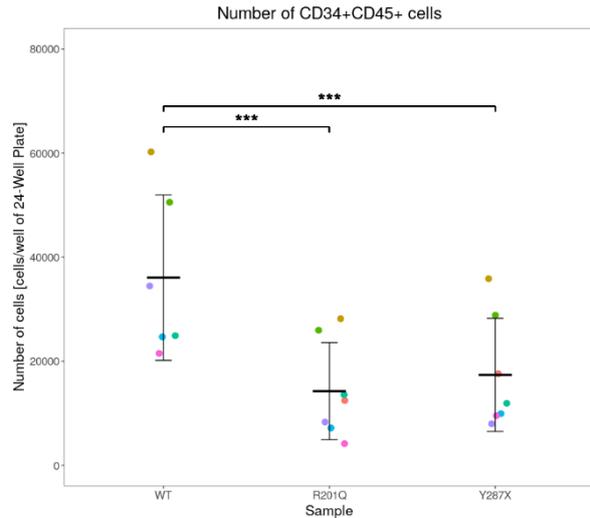


図 1 造血前駆細胞への分化誘導効率

7 回繰り返し実験を行い、各結果をドットで示す
とともに、第 1 四分位点、中央値、第 3 四分位点
を示している。縦軸は得られた造血前駆細胞数、
横軸は各細胞株を表す。***: p-value < 0.05

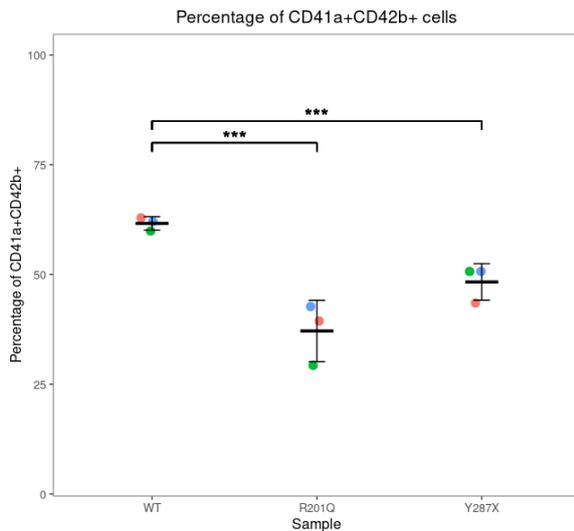


図 2 巨核球への分化誘導効率

3 回繰り返し実験を行い、各結果をドットで示す
とともに、第 1 四分位点、中央値、第 3 四分位点
を示している。縦軸は得られた造血前駆細胞数、
横軸は各細胞株を表す。***: p-value < 0.05

前駆細胞で低下傾向にあり、特に ELF1 は統計的に有意な発現低下がみられた。このことから、RUNX1 の変異によって ELF1 などの ETS ファミリー転写因子の発現が低下し、DNA メチル化異常が誘発されている可能性が示唆された。

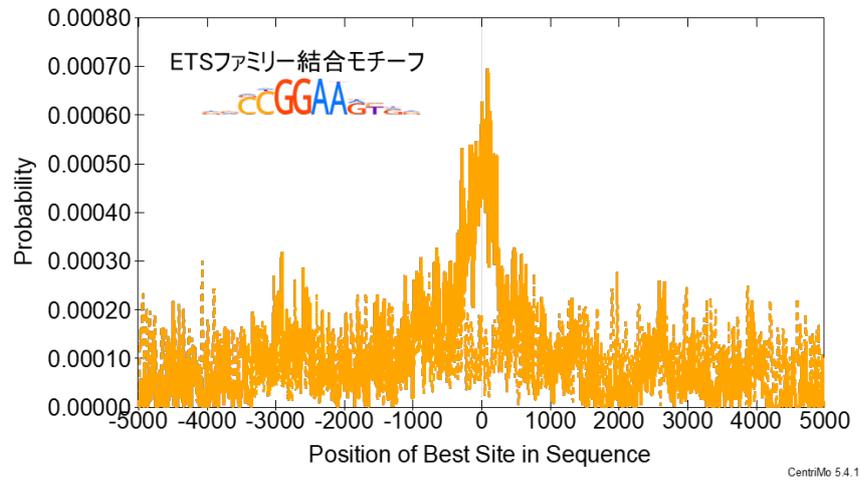


図3 共通した高メチル化領域周辺の ETS ファミリー結合モチーフの出現分布

X 軸は共通して高メチル化した領域を中心に上・下流 5 kbp の領域、縦軸は ETS ファミリー結合モチーフの出現期待値。

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 田中優希 |
| 2. 発表標題 CRISPR-Cas9による家族性血小板異常症モデルiPS細胞の樹立 |
| 3. 学会等名 第13回日本エピジェネティクス研究会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 田中優希、鈴木貴紘、降旗絵里奈、LIM Joanne、西村創、長谷川未冴、鈴木治和 |
| 2. 発表標題 The technological development of inducing the gene-specific DNA demethylation using the DNA-binding domain of the transcription factor |
| 3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2019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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|