

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07346

研究課題名(和文)新規エピゲノム制御を介した造血器腫瘍の病態促進機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the novel epigenetic mechanism promoting 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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストン脱メチル化酵素KDM4Bは、エピゲノム制御因子として8;21染色体転座急性骨髄性白血病 [t(8;21)AML]の病態を促進させる。本研究において私達は、その機構には、酵素活性非依存的な機能が関与していることを見出した。ヒストン脱メチル化酵素活性以外に、新たに、KDM4Bのプロリンリッチ領域及び、メチル化ヒストン結合領域であるPHDドメイン、Tudorドメインの各々がt(8;21)AML細胞の増殖に必要であることを示した。また、KDM4Bはプロリンリッチ領域を介して、クロマチンリモデリング因子BRG1と相互作用することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では特定の染色体異常を伴う急性骨髄性白血病において、ヒストン脱メチル化酵素KDM4Bが、酵素活性非依存的な細胞増殖効果を担うのに必要なアミノ酸領域を明らかにした。治療標的としてKDM4Bの機能を阻害するために有用な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Our prior work has shown that the histone lysine demethylase KDM4B epigenetically promotes acute myeloid leukemia (AML) associated with chromosomal translocation 8;21 [t(8;21)]. In the present study, we demonstrated that each of the proline-rich region, PHD domain, and Tudor domain of KDM4B is required for proliferation of t(8;21) AML cells, besides the demethylase activity of this protein. Among them, the proline-rich region was found to be essential for the interaction with BRG1-chromatin remodeling enzyme.

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、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(H3K9me2/me3)を脱メチル化するヒストン脱メチル化酵素であり、エピゲノム制御因子として機能する。またH3K36me2/me3、H1.4K26me2/me3もその基質となることが知られている。N末端より、ヒストン脱メチル化酵素活性を持つJmjCドメイン、プロリンリッチ領域、メチル化ヒストン結合領域であるPHDドメインとTudorドメインを有する。

(2) RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO)は8;21染色体転座を伴う急性骨髄性白血病[t(8;21)AML]の疾患責任融合遺伝子に由来するタンパク質である。転写因子RUNX1 (AML1)のDNA結合ドメインを保持しており、主にRUNX1の転写標的の遺伝子発現パターンを変えることによって、白血病の発症、進展を促すとされる。私達はKDM4Bがt(8;21)AMLで高発現していること、及びKDM4Bをt(8;21)AML細胞株で発現抑制すると細胞増殖が阻害されることを示した。また、網羅的遺伝子発現解析及びATAC-seqの結果と、既報のChIP-seqデータとの比較から、KDM4BはRUNX1-RUNX1T1タンパク質のオープンクロマチン領域への動員を促し、RUNX1-RUNX1T1による標的遺伝子の発現制御に促進的に機能することを見出した。さらに、Kdm4b遺伝子欠損マウス由来の細胞を用いた骨髄移植実験により、KDM4BがRUNX1-RUNX1T1遺伝子産物と協調して個体レベルで白血病を促進させることを明らかにした。

(3) ヒトと高い相同性を示すマウス野生型KDM4Bをt(8;21)AML細胞株に発現させて、内因性のヒトKDM4Bを発現抑制すると継続的な増殖が観察されるようになった。一方で、私達は、ヒストン脱メチル化酵素活性を欠くKDM4Bのアミノ酸置換変異体を発現させて内因性のKDM4Bを発現抑制した場合にも、その増殖が野生型の約60%程度にまで回復するという知見を得た。KDM4Bによる細胞増殖には、酵素活性に非依存的な制御機構が関与していると考えられる。KDM4Bの酵素活性の阻害が、t(8;21)AMLの治療標的としては不十分である可能性を示す。

2. 研究の目的

ヒストン脱メチル化酵素が、その酵素活性とは異なる機序を介して白血病の病態を促進する可能性を見出した。本研究では、ヒストン脱メチル化酵素による新たなエピゲノム制御機構の分子基盤を明らかにし、KDM4Bの白血病治療標的としての可能性を探索する。

3. 研究の方法

(1) 細胞増殖能の評価

N末端に3xFLAGタグを付加したマウス野生型KDM4Bまたはその変異体cDNAをヒトt(8;21)AML細胞株SKN0-1にレンチウイルスの手法を用いて導入し、同様の手法により遺伝子ノックダウンを行って、内因性のヒトKDM4Bの発現を抑制した。継続的な培養を行って細胞数を計測した。

(2) タンパク質相互作用の解析

内因性のKDM4Bに対する免疫沈降は、SKN0-1の核タンパク質を抽出し、抗KDM4B抗体及びプロテインG磁気ビーズを用いて行った。KDM4Bのタンパク結合領域の同定には、N末端にFLAGタグを付加したヒト野生型KDM4Bまたは各機能ドメイン・モチーフを欠いたKDM4Bタンパク質を、各々HEK293T細胞株に発現させて核タンパク質を抽出し、抗FLAG抗体の固定された磁気ビーズを用いて免疫沈降を行った。免疫沈降物に対するウエスタンブロッティングを用いて、相互作用タンパク質を検出した。

(3) プロモーターアッセイ

ヒトKDM4B遺伝子の転写開始点を含む領域をPCRにより増幅して単離し、3'側にホタルルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだレポータープラスミドを作成した。このレポータープラスミドと、RUNX1-RUNX1T1またはRUNX1を発現するプラスミドを、転写コファクターとして働くCBFBの発現プラスミド及びウミシイタケルシフェラーゼを発現するプラスミドとともに、ヒト胎児腎細胞株HEK293に一過的に導入した。Promega社のDual-Luciferase Reporter Assay Systemを使

用して、ウミシイタケルシフェラーゼ活性で補正したホタルルシフェラーゼ活性の値をプロモーター活性として評価した。

4. 研究成果

(1) 細胞増殖における KDM4B タンパク質の各機能ドメインの役割を検討した。t(8;21) AML 細胞株 SKN0-1 に対して、ヒト KDM4B 遺伝子のノックダウンを行い、その後 shRNA の標的配列を含まないようなマウス野生型 KDM4B タンパク質（ヒトタンパク質とのアミノ酸相同性約 85%）を発現する cDNA の導入を行った。しかし、本法では KDM4B の発現抑制に伴う細胞死及び増殖阻害効果が大きく、安定して増殖を回復させられる実験系の確立に至らなかった。次に、マウス野生型 KDM4B タンパク質を発現した安定株に対して内因性のヒト KDM4B をノックダウンしたところ、この細胞はノックダウン後も増殖を示した。そこで、マウス KDM4B の各機能ドメイン・モチーフが欠損した変異体が安定的に発現した細胞株を樹立し、内因性のヒト KDM4B を発現抑制することによって、KDM4B のどの領域が増殖に寄与するかを検討した。いずれの変異体発現株においても、野生型発現株の場合と比較して、KDM4B ノックダウン後に 40%以上の増殖阻害が認められたが、特に、メチル化ヒストンタンパク結合モチーフである PHD ドメインまたは Tudor ドメイン欠損変異体発現株では、KDM4B の発現抑制によって親株とほぼ同等にまで増殖が強く阻害されることがわかった。以上のことから、KDM4B による増殖促進効果は各機能ドメインの統合的な効果によって担われており、これらのうち、メチル化ヒストンタンパク結合モチーフがより中心的な役割を担っていると考えられた。

(2) 所属研究室では、以前にエストロゲン受容体陽性乳癌細胞において、クロマチンリモデリング複合体 PBAF と KDM4B が相互作用することを報告している。SKN0-1 細胞株の核タンパク質に対する免疫沈降の結果、内因性の KDM4B は PBAF の主要な構成因子である BRG1 及び PBRM1 と相互作用することが示された。次に、KDM4B 側のタンパク結合領域を探索するため、FLAG タグの付加されたヒト KDM4B の機能的モチーフ・ドメインを欠く変異体を細胞に発現させて、免疫沈降を行った。その結果、KDM4B のプロリンリッチ領域を欠くと、BRG1 との相互作用が大きく低下することがわかった。また、t(8;21) AML 細胞株では、BRG1 の発現抑制により増殖阻害が観察された。以上のことからプロリンリッチ領域を介した KDM4B による増殖促進には、クロマチンリモデリング複合体 PBAF との相互作用が寄与しているものと考えられた。

(3) RUNX1-RUNX1T1 は RUNX1 標的遺伝子の発現を阻害する一方で、RUNX1-RUNX1T1 による転写活性化の標的となる遺伝子も多く認められる。ヒト KDM4B 遺伝子の転写開始点の上流 900bp 以内の領域に RUNX1-RUNX1T1 または RUNX1 のコンセンサス配列（または相補的塩基配列）が 2 箇所存在し、t(8;21) AML 細胞株（SKN0-1, Kasumi-1）を用いた既報の ChIP-seq データから、RUNX1-RUNX1T1 及び RUNX1 タンパク質がこの領域に結合していることがわかった。KDM4B が RUNX1-RUNX1T1 の直接の転写標的として発現誘導される可能性が考えられる。そこで、ヒト KDM4B 遺伝子の転写開始点上流 900bp から下流 100bp の DNA 領域のプロモーター活性を HEK293 細胞株を用いたルシフェラーゼアッセイにより評価した。その結果、CBFB と RUNX1 の導入により KDM4B プロモーターの活性が上昇した一方で、RUNX1-RUNX1T1 による付加的变化、または CBFB と RUNX1-RUNX1T1 の導入による明らかなプロモーター活性の上昇は検出されなかった。以上のことから、RUNX1-RUNX1T1 による KDM4B プロモーターの活性上昇には、さらなるコファクターの必要性や、8; 21 染色体転座白血病細胞に特有の HEK293 細胞とは異なる細胞内コンテキストが必要であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Dash S; Ueda T; Komuro A; Amano H; Honda M; Kawazu M; Okada H	4. 巻 -
2. 論文標題 MYC/Glutamine Dependency Is a Therapeutic Vulnerability in Pancreatic Cancer with Deoxycytidine Kinase Inactivation-Induced Gemcitabine Resistance.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Mol Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 OF1-OF14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1541-7786.MCR-22-0554	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 -
1. 著者名 Serizawa K; Tanaka H; Ueda T; Fukui A; Kakutani H; Taniguchi T; Inoue H; Kumode T; Taniguchi Y; Rai S; Hirase C; Morita Y; Espinoza JL; Tatsumi Y; Ashida T; Matsumura I	4. 巻 115
2. 論文標題 CD34+ myeloma cells with self-renewal activities are therapy-resistant and persist as MRD in cell cycle quiescence.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Hematol.	6. 最初と最後の頁 336-349
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-021-03261-0	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 -
1. 著者名 Ueda T; Kanai A; Komuro A; Amano H; Ota K; Honda M; Kawazu M; Okada H	4. 巻 3
2. 論文標題 KDM4B promotes acute myeloid leukemia associated with AML1-ETO by regulating chromatin accessibility.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FASEB Bioadv.	6. 最初と最後の頁 1020-1033
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fba.2021-00030	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 -
1. 著者名 Sera Y; Nakata Y; Ueda T; Yamasaki N; Koide S; Kobayashi H; Ikeda KI; Kobatake K; Iwasaki M; Oda H; Wolff L; Kanai A; Nagamachi A; Inaba T; Sotomaru Y; Ichinohe T; Koizumi M; Miyakawa Y; Honda ZI; Iwama A; Suda T; Takubo K; Honda H	4. 巻 137
2. 論文標題 UTX maintains functional integrity of murine hematopoietic system by globally regulating aging-associated genes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood.	6. 最初と最後の頁 908-922
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/blood.2019001044	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 Oka N; Komuro A; Amano H; Dash S; Honda M; Ota K; Nishimura S; Ueda T; Akagi M; Okada H	4. 巻 8
2. 論文標題 Ascorbate sensitizes human osteosarcoma cells to the cytostatic effects of cisplatin.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmacol Res Perspect.	6. 最初と最後の頁 e00632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/prp2.632	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 -

1. 著者名 Kobatake K; Ikeda K; Nakata Y; Yamasaki N; Ueda T; Kanai A; Sentani K; Sera Y; Hayashi T; Koizumi M; Miyakawa Y; Inaba T; Sotomaru Y; Kaminuma O; Ichinohe T; Honda ZI; Yasui W; Horie S; Black PC; Matsubara A; Honda H	4. 巻 26
2. 論文標題 Kdm6a Deficiency Activates Inflammatory Pathways, Promotes M2 Macrophage Polarization, and Causes Bladder Cancer in Cooperation with p53 Dysfunction.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 2065-2079
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1078-0432.CCR-19-2230	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0件

〔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)	東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任准教授 (12601)	

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
---------	---------