

令和 4 年 4 月 26 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15451

研究課題名（和文）ヒストンメチル化酵素G9aによる胎児型ヘモグロビンの制御機構解析

研究課題名（英文）Analysis of the regulatory mechanism of fetal hemoglobin by histone methyltransferase G9a

研究代表者

高瀬 翔平（Takase, Shohei）

東京薬科大学・生命科学部・研究員

研究者番号：60827400

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：鎌状赤血球症の治療戦略は、胎児型グロビンの再活性化誘導である。本研究はヒストンメチル化酵素G9aに着目し、その再活性化機構の全貌解明を目指した。開発したG9a阻害剤のin vivo解析では、1週間連続投与で胎児型グロビンの再活性化が見られ、4週間後でも顕著な異常は観察されなかった。また、この再活性化制御機構の主要な転写抑制因子とG9aの関係性を評価した結果、G9aは転写因子の発現量に寄与しない一方で、グロビン遺伝子座へのリクルートを制御していることが示唆された。加えて、RNA-seq解析はG9a阻害による再活性化機構にBGLT3の発現が関与してい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

胎児型グロビン遺伝子の再活性化剤として現在までに認可されている鎌状赤血球症の治療薬はヒドロキシアウレアのみである。しかし、この治療薬においても詳細な再活性化メカニズムがわかっていない。本研究成果は、鎌状赤血球症治療薬としてのG9a阻害剤の有用性を示し、この制御機構におけるエピジェネティクス制御因子G9aがどのように関与するのか、その一端を解明することができた。したがって、本成果は鎌状赤血球症における新たな治療薬開発の一助となり、今後の人類の健康に貢献するものである。

研究成果の概要（英文）：The therapeutic strategy for sickle cell disease is induction of fetal globin reactivation. This study focused on histone methyltransferase G9a and aimed to elucidate the entire mechanism of its reactivation. In vivo analysis of the developed G9a inhibitor showed that reactivation of fetal globin was observed after 1 week of continuous administration, and no significant abnormality was observed even after 4 weeks. The relationship between G9a and the major transcriptional repressors in this reactivation control mechanism was also evaluated, suggesting that G9a regulates recruitment to the globin locus while not contributing to the expression level of the transcription factor. In addition, RNA-seq analysis revealed that BGLT3 expression is involved in the reactivation mechanism by G9a inhibition.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：エピジェネティクス ケミカルバイオロジー ヒストンメチル化酵素G9a 阻害剤 鎌状赤血球症 グロビンスイッチング制御機構 HUDEP-2

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

鎌状赤血球症の治療戦略は、出生後に発現抑制する胎児型グロビン遺伝子の再活性化である。胎児型ヘモグロビン誘導活性を示し、認可されている治療薬はヒドロキシウレアのみで、この治療薬は代謝拮抗剤であるため、骨髄機能抑制や細胞毒性等の重篤な副作用が示唆されている。したがって、異なる胎児型ヘモグロビン再活性化剤が求められており、ヒストンメチル化酵素 **G9a** はエピジェネティックに胎児型グロビン遺伝子を制御することから、有望な治療標的分子として期待されている。しかし、従来の **G9a** 阻害剤は、類似した化学構造で、細胞毒性の点で改善の余地がある。研究代表者らは独自に強力で選択的な **G9a** 阻害剤の開発に成功している。

また、**G9a** を含むエピジェネティクス因子による胎児型グロビン遺伝子の調節機構は未だ不明な点が多く残っている。この作用機序の全貌解明は、発生段階で発現遺伝子が変わるグロビンスイッチング制御機構の理解を深めるために重要だと考えられた。

2. 研究の目的

**G9a** の阻害によるグロビンスイッチング制御機構の解明と、鎌状赤血球症に対する治療薬開発を本研究の目的としている。

3. 研究の方法

**G9a** 阻害剤 **RK-701** の薬効について、正常マウスおよびヒト鎌状赤血球症マウスにおいて評価した。グロビンスイッチング制御機構の解明について、マウス赤白血病細胞株 **B8/3** および胎児型グロビン遺伝子をほとんど発現していないヒト赤芽球細胞 **HUDEP-2** を用いて解析を行った。

4. 研究成果

4 - (1) マウスにおける **G9a** 阻害活性と胎児型グロビン遺伝子の発現亢進

**G9a** 阻害剤 **RK-701** が *in vivo* においても薬効を示すか調べるため、正常マウスおよびヒト鎌状赤血球症モデルマウスに連続投与を行った。3 または 4 日おきに体重測定を行い、1 週間ごとに採血した血球成分から **RNA** を抽出し、定量 **PCR** 法によってグロビン遺伝子量を評価した。その結果、胎児型グロビン遺伝子は 1 週目から **RK-701** 投与群で増加しており、5 週間連続投与したマウスにおいてもコントロール群と比較して著しい体重変化は見られなかった (図 1)。以上の結果より、**RK-701** は *in vivo* にも使用可能な **G9a** 阻害剤であることが示唆された。

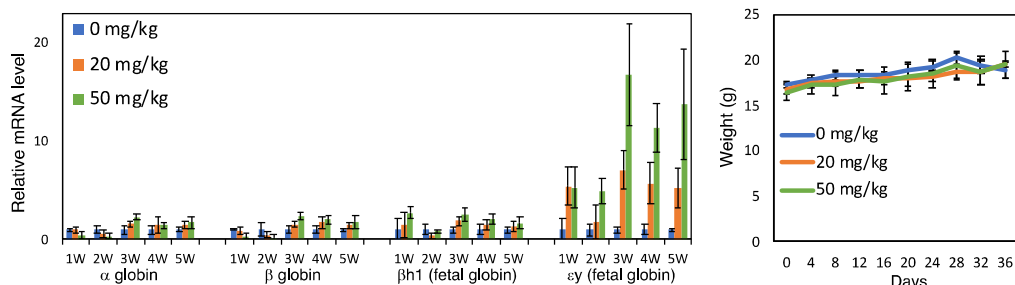


図 1 正常マウスにおける **RK-701** の胎児型グロビン遺伝子再活性化

**RK-701** の連続投与 (20 もしくは 50 mg/kg、週に 5 日投与) により、1 週目から血球成分中のマウス胎児型グロビン遺伝子  $\gamma$  の mRNA レベルが亢進した (左グラフ)。一方で、マウスの体重変化は見られなかった (右グラフ)。

4 - (2) マウス、ヒト培養細胞における **G9a** 阻害による胎児型グロビン遺伝子の発現亢進

マウス赤白血病細胞 **B8/3** およびヒト赤芽球細胞 **HUDEP-2** において、**G9a** 阻害剤 **RK-701** と既存の **UNC0638** による胎児型グロビン遺伝子の再活性化比較を行った。どちらの **G9a** 阻害剤も濃度依存的にマウスおよびヒト培養細胞において胎児型グロビン遺伝子を亢進させた (図 2)。また、**RK-701** は **UNC0638** と比較して同程度あるいは、それ以上に高い胎児型グロビン遺伝子の再活性化能を持つことが示唆された。

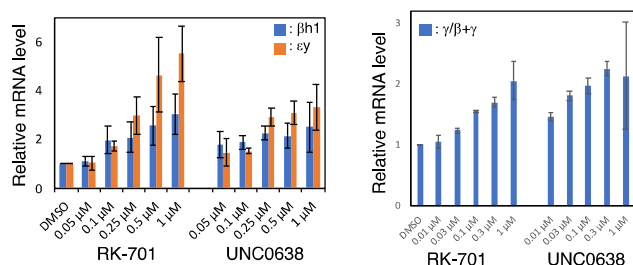


図 2 マウス、ヒト細胞における **G9a** 阻害剤の胎児型グロビン遺伝子誘導

マウス **B8/3** 細胞 (左グラフ) およびヒト **HUDEP-2** 細胞 (右グラフ) において **RK-701**、**UNC0638** は濃度依存的に胎児型グロビン遺伝子の発現量を亢進させた。

4 - (3) ヒト **HUDEP-2** 細胞におけ

### る G9a 発現抑制による胎児型グロビン遺伝子の発現亢進

ヒト赤芽球細胞 **HUDEP-2** における **G9a** の分子機構を評価するため、**shRNA** による **G9a** のノックダウンを行った。レトロウイルスベクターを用いた感染導入した **HUDEP-2** 細胞を限界希釈法によりシングルセルクローニングを行った。ノックダウン効率が比較的優れた 2 株を選抜し、コントロールの **HUDEP-2** 細胞と胎児型グロビン遺伝子の発現量を比較した(図 3)。**G9a** をノックダウンした **HUDEP-2** 細胞は、コントロールの **HUDEP-2** 細胞より胎児型グロビン遺伝子の発現量が亢進していた。

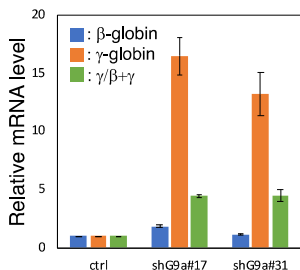


図 3 ヒト **HUDEP-2** 細胞における **G9a** 発現抑制の胎児型グロビン遺伝子誘導

ヒト赤芽球細胞 **HUDEP-2** において **shRNA** を用いた **G9a** ノックダウン細胞株を作製した(**shG9a #17** および **#31**)。どちらの **G9a** ノックダウン **HUDEP-2** 細胞もコントロールと比較して胎児型グロビン遺伝子の発現量を亢進させた。

### 4 - (4) G9a と胎児型グロビン遺伝子の転写抑制因子 BCL11A または ZBTB7A の関係

**BCL11A** および **ZBTB7A** は胎児型グロビン遺伝子の主要な転写抑制因子として先行研究で報告されていることから、**G9a** との関係性を評価することにした。ヒト赤芽球細胞 **HUDEP-2** において **G9a** 阻害剤 **RK-701** および **UNC0638** はこれらリプレッサーの発現量に影響を与えないことがわかった(図 4)。

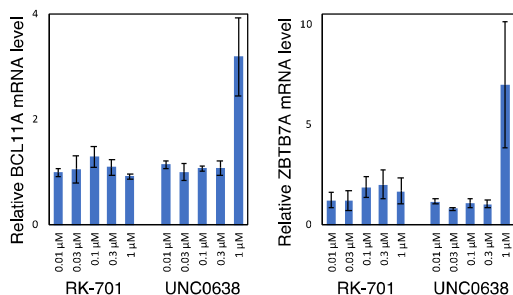
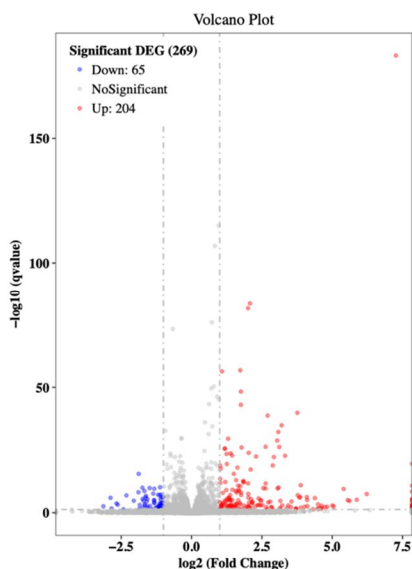


図 4 ヒト **HUDEP-2** 細胞における **G9a** 阻害剤の転写抑制因子の発現量への影響

ヒト赤芽球細胞 **HUDEP-2** において **RK-701**、**UNC0638** は **BCL11A** (左グラフ) および **ZBTB7A** (右グラフ) の発現量を変化させなかった。1 μM **UNC0638** によるリプレッサーの発現増加はおそらく細胞毒性の影響による見かけ上の結果と考えられる。

### 4 - (5) ヒト HUDEP-2 細胞における RK-701 の RNA-seq 解析

ヒト赤芽球細胞 **HUDEP-2** において **G9a** 阻害剤 **RK-701** はどのような遺伝子発現変化をもたらすのかを網羅的に調べるため、**RNA-seq** 解析を行った。その結果、有意に発現亢進した遺伝子は 204 遺伝子で、発現抑制では 65 遺伝子であった(図 5)。そのうち、胎児型グロビン遺伝子である **HBG1/2** だけでなく、**HBE1** の発現亢進も示された。その一方で、成人型グロビン遺伝子の **HBB** や別のヘモグロビン構成因子である 鎖、図 4 の結果同様に **BCL11A** および **ZBTB7A** の発現量に差はほとんど見られなかった。



α/β	GeneSymbol	Average of normalized reads		Fold Change
		DMSO	RK	
α-globin	HBA1	4731.04	5358.19	1.13
	HBA2	5552.78	6601.25	1.19
	HBM	561.33	535.18	0.95
	HBQ1	189.54	206.90	1.09
	HBZ	94.42	29.58	0.31
	HBZP1	1.01	---	---
β-globin	HBB	60587.83	68304.60	1.13
	HBBP1	6202.45	6125.98	0.99
	HBD	3661.20	3674.33	1.00
	HBE1	7.71	34.58	4.48
	HBG1	198.05	465.98	2.35
	HBG2	1886.08	6257.05	3.32

GeneSymbol	Average of normalized reads		Fold Change
	DMSO	RK	
BCL11A	490.05	573.96	1.17
KLF1	9704.59	9840.58	1.01
ZBTB7A	2603.35	2539.11	0.98

GeneSymbol	Average of normalized reads		Fold Change
	DMSO	RK	
BGLT3	13.08	42.94	3.28

図 5 ヒト **HUDEP-2** 細胞における **G9a** 阻害剤 **RK-701** のトランスクリプトーム解析

ヒト赤芽球細胞 **HUDEP-2** において **DMSO** または 1 μM **RK-701** を 4 日処理した細胞から抽出した **RNA** を用いて **RNA-seq** 解析を行い、**volcano plot** を作成した(左グラフ)。その結果、胎児型グロビン遺伝子 **HBG1/2** の亢進以外に **HBG1** の下流に位置する **non-coding RNA** の **BGLT3** の発現が亢進していた(右表)。

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 高瀬翔平
2. 発表標題 鎌状赤血球症治療薬としての G9a阻害剤RK-701の開発研究
3. 学会等名 新薬創製談話会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高瀬 翔平、寛山隆、白井文幸、園田健、中田明子、西ヶ谷洋輔、角谷龍展、丹羽英明、梅原崇史、中村幸夫、吉田稔、伊藤昭博
2. 発表標題 新規G9a阻害剤RK-701によるグロピンスイッチング制御機構解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 G9a阻害剤	発明者 吉田稔、白井文幸、 伊藤昭博、高瀬翔平	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2021-092001	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------