

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07771

研究課題名(和文)ChIP-Seqを用いた若年性骨髄単球性白血病の網羅的ヒストン修飾解析

研究課題名(英文)Comprehensive histone modification analysis of juvenile myelomonocytic leukemia using ChIP-Seq

研究代表者

村松 秀城 (Muramatsu, Hideki)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00572570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：若年性骨髄単球性白血病(juvenile myelomonocytic leukemia; JMML)は、主に5歳未満の小児に発症する予後不良な造血器腫瘍である。本研究では、分子学的発症メカニズムの全体像を明らかにすることを目標としてクロマチン免疫沈降シーケンス(ChIP-Seq)によるヒストン修飾の網羅的プロファイリングを行い、JMMLの疾患特異的なH3K27acのヒストンマークが濃縮しているエンハンサー領域の候補を抽出した。さらに、他のゲノム解析(single-cell RNA sequencing, Error-corrected sequencing)との統合解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

若年性骨髄単球性白血病(juvenile myelomonocytic leukemia; JMML)は、主に5歳未満の小児に発症する予後不良な造血器腫瘍である。唯一の根治療法は同種造血細胞移植であるが、満足できる治療成績は得られていない。今回のクロマチン免疫沈降シーケンスを含む網羅的遺伝子解析による研究成果により、JMMLの分子学的発症メカニズムの更なる解明が進み、予後を正確に予測するバイオマーカーに基づく最適医療(Precision Medicine)の実現に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) is a hematopoietic tumor with poor prognosis that mainly affects children under the age of 5 years. In this study, we performed comprehensive profiling of histone modifications by chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-Seq) to elucidate the overall molecular pathogenesis mechanism and extracted candidate enhancer regions enriched in the disease-specific histone mark H3K27ac in JMML. In addition, we performed an integrated analysis with other genomic analyses (single-cell RNA sequencing and error-corrected sequencing).

研究分野：小児血液腫瘍

キーワード：若年性骨髄単球性白血病 エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

若年性骨髄単球性白血病 (**juvenile myelomonocytic leukemia; JMML**) は、主に 5 歳未満の小児に発症する予後不良な造血器腫瘍である。通常の化学療法のみで治癒が得られることはなく、唯一の根治療法は同種造血細胞移植である。しかしながら、移植合併症や再発の問題があり、**JMML** 患者の 5 年生存率は依然として **50%**前後にとどまっており、分子標的薬等の導入による新規治療法の開発が必須である。網羅的メチル化プロファイリングにより、**DNA** 高メチル化群は有意に全生存率・無移植生存率が低く、これまでに報告されてきた予後予測因子と強く関連している¹。しかしながら、**DNA** メチル化以外のエピジェネティクス解析は、**JMML** では十分に行われていなかった。クロマチン免疫沈降法 (**chromatin immunoprecipitation: ChIP**) は、ホルマリンで **DNA** とヒストンなどの **DNA** 結合タンパク質を架橋した後、超音波処理により可溶性のクロマチンにし、これをアセチル化ヒストンや転写因子に対する抗体で免疫沈降する実験手法である。ヒストンがアセチル化の修飾を受けると、クロマチンと **DNA** の結合が緩み、転写因子が結合しやすくなり、遺伝子発現が劇的に増加する。ヒストンのアセチル化はプロモーター領域でよく認められ、ヒストン **H3 K9** のアセチル化 (**H3K9ac**) と **K27** のアセチル化 (**H3K27ac**) は、アクティブな遺伝子のエンハンサーおよびプロモーター領域で検出される。スーパーエンハンサーとは、複数の転写因子や転写調節因子が結合しやすい巨大なエンハンサー領域で、遺伝子発現を強力に制御する役割をもつ。例えば、**T** 細胞性急性リンパ性白血病では、がん遺伝子 **TAL1** およびそれと協調的に働く転写因子 **GATA3**, **RUNX1**, **MYB** などの遺伝子がスーパーエンハンサーによって制御されることが報告されている。このような化学修飾を受けたヒストンに対して、特異的に結合するモノクローナル抗体による **ChIP-Seq** 法を用いれば、ゲノム網羅的に活性化しているプロモーター領域やエンハンサー領域を同定することが可能である。

2. 研究の目的

腫瘍細胞と正常細胞では、活性化しているエンハンサー領域が異なっており、がん特異的エンハンサーが同定されている。しかしながら、**ChIP-Seq** を用いた実験には比較的多量の検体が必要であり、稀少疾患である **JMML** の臨床検体を用いた網羅的なヒストン修飾解析は行われてこなかった。本研究の目的は、**H3K27ac** に対するモノクローナル抗体による **ChIP-Seq** 法を用いて、**JMML** 患者由来の腫瘍細胞のゲノム全体のヒストン修飾を網羅的に評価し、特異的なスーパーエンハンサー領域を同定し、その病態に与える影響を明らかにすることである。

3. 研究の方法

名古屋大学小児科研究室内に保存されている **JMML** 患者由来の骨髄単核球細胞を用いて、全エクソーム解析・メチル化アレイ解析に加えて、**H3K27ac** に対するモノクローナル抗体による **ChIP-Seq** を行った。ホルマリンで **DNA** とヒストンなどの **DNA** 結合タンパク質を架橋した後、超音波処理により可溶性のクロマチンにし、抗 **H3K27ac** 抗体で免疫沈降させたのちに、イルミナ社次世代シーケンサーで解析を

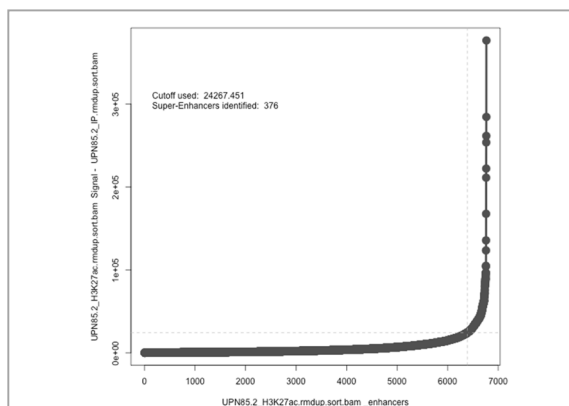


図 1. **JMML** 患者由来細胞における **H3K27ac** を指標としたスーパーエンハンサー

行った。得られたデータから、**the R Bioconductor package *DiffBind***を用いて **ChIP-Seq peak data** の評価を行った。

4. 研究成果

JMML 患者 **21** 例の臨床検体を用いて、抗 **H3K27ac** 抗体による **ChIP-Seq** を行った。**図 1** に、

解析した **1** 例の結果を示す。本症例では、**376** か所のスーパーエンハンサー領域が同定された。

次に、**ChIP-Seq peak data** によるクラスタリング解析を行った。**2** つのクラスターに分類され、予後不良・DNA 高メチル化群、**somatic *PTPN11*** など予後不良因子と関連するクラスター **1** (**n = 8**) DNA 低メチル化群と関連するクラスター **2** (**n = 13**)

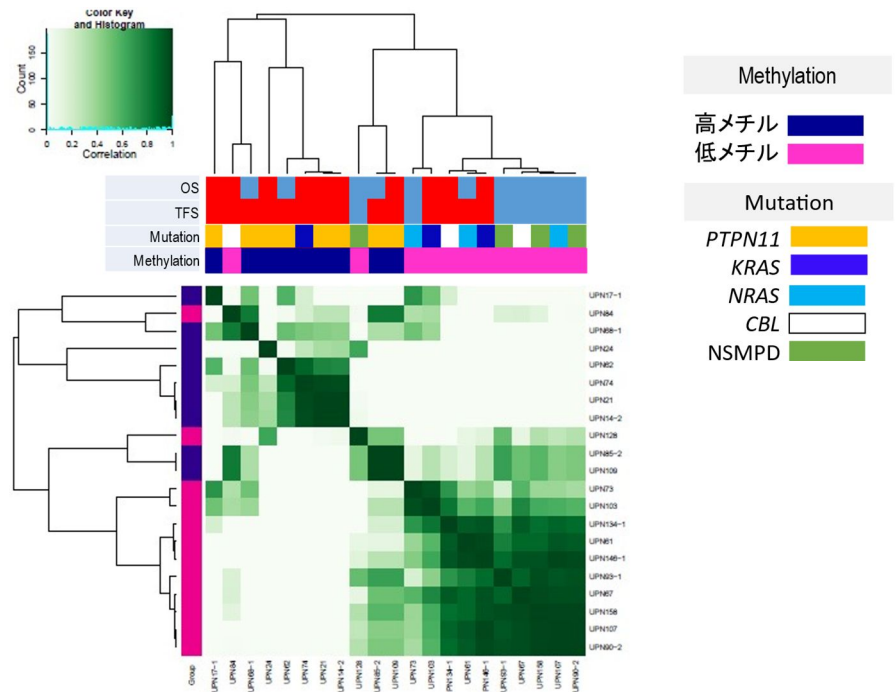


図 2. 抗 **H3K27ac** 抗体 **ChIP-Seq peak data** によるクラスタリング解析。高メチル化群と低メチル化群の間で統計学的に有意に異なる **4** か所のスーパーエンハンサー領域を同定することに成功した (**図 3**)。

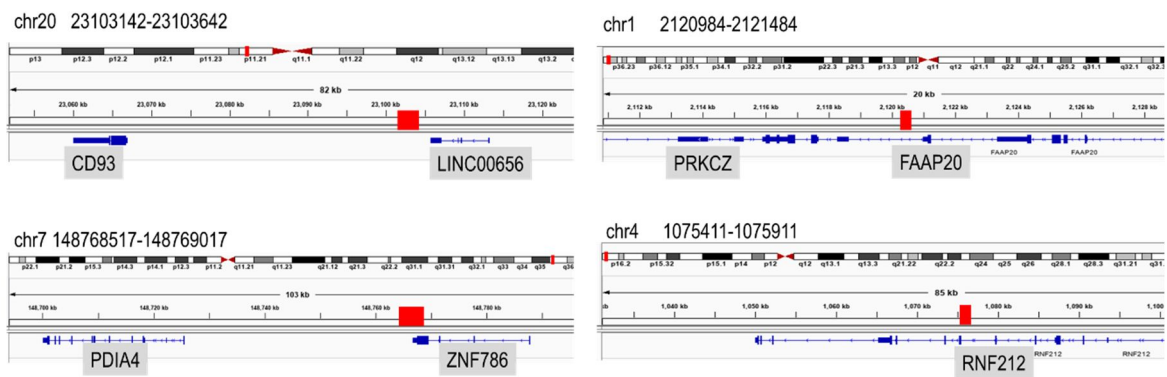


図 3.高メチル化群 (**20** 番染色体[**chr20**])・低メチル化群 (**chr1, 4, 7**) に特異的なスーパーエンハンサー領域

現在、**Hi-C (High-throughput Chromosome Conformation Capture)**解析を行い、これらのスーパーエンハンサー領域と物理的に接触している遺伝子領域を明らかにするとともに、**CRISPR/Cas9** を用いてこれらのスーパーエンハンサー領域をノックアウトした細胞を作成し、**RNA-Seq** 解析による遺伝子発現への影響の評価を計画している。

引用文献

- 1 **Imaizumi, T. et al. Clinical parameter-based prediction of DNA methylation classification generates a prediction model of prognosis in patients with juvenile myelomonocytic leukemia. *Sci Rep* 12, 14753, doi:10.1038/s41598-022-18733-4 (2022).**

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Imashuku Shinsaku, Suemori Shin-ichiro, Wakamatsu Manabu, Okuno Yusuke, Muramatsu Hideki, Makino Shigeru, Miyoshi Takashi, Chonabayashi Kazuhisa, Kanno Hitoshi	4. 巻 45
2. 論文標題 Juvenile Hemochromatosis With Non-transfused Hemolytic Anemia Caused by a De Novo PIEZO1 Gene Mutation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Hematology/Oncology	6. 最初と最後の頁 e510 ~ e513
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MPH.0000000000002639	査読の有無 無
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 Hamada Motoharu, Muramatsu Hideki, Torii Yuka, Suzuki Kyogo, Narita Atsushi, Yoshida Taro, Imaya Masayuki, Yamamori Ayako, Wakamatsu Manabu, Miwata Shunsuke, Narita Kotaro, Kataoka Shinsuke, Kawashima Nozomu, Taniguchi Rieko, Nishikawa Eri, Nishio Nobuhiro, Ito Yoshinori, Kojima Seiji, Takahashi Yoshiyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Human leukocyte antigen 7/8-matched unrelated bone marrow transplantation using anti-thymocyte globulin in children	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-023-03571-5	査読の有無 無
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 Ozono Shuichi, Sakashita Kazuo, Yoshida Nao, Kakuda Harumi, Watanabe Kenichiro, Maeda Miho, Ishida Yasushi, Manabe Atsushi, Taga Takashi, Muramatsu Hideki	4. 巻 70
2. 論文標題 A nationwide survey of late effects in survivors of juvenile myelomonocytic leukemia in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatr Blood Cancer	6. 最初と最後の頁 e30126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pbc.30126	査読の有無 無
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 Imaizumi Takahiro, Meyer Julia, Wakamatsu Manabu, Kitazawa Hironobu, Murakami Norihiro, Okuno Yusuke, Yoshida Taro, Sajiki Daichi, Hama Asahito, Kojima Seiji, Takahashi Yoshiyuki, Loh Mignon, Stieglitz Elliot, Muramatsu Hideki	4. 巻 12
2. 論文標題 Clinical parameter-based prediction of DNA methylation classification generates a prediction model of prognosis in patients with juvenile myelomonocytic leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14753
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-18733-4	査読の有無 無
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 Honda Yuko, Muramatsu Hideki, Nanjo Yuka, Hirabayashi Shinsuke, Meguro Toru, Yoshida Nao, Kakuda Harumi, Ozono Shuichi, Wakamatsu Manabu, Moritake Hiroshi, Yasui Masahiro, Sano Hideki, Manabe Atsushi, Sakashita Kazuo	4. 巻 115
2. 論文標題 A retrospective analysis of azacitidine treatment for juvenile myelomonocytic leukemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 263 ~ 268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-021-03248-x	査読の有無 無
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 Takebayashi Akira, Yamamoto Masaki, Igarashi Keita, Muramatsu Hideki, Kawasaki Yukihiko	4. 巻 64
2. 論文標題 Azacitidine as a bridge to transplantation in juvenile myelomonocytic leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.14929	査読の有無 無
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 Kitazawa H, Okuno Y, Muramatsu H, Kojima S, Takahashi Y., et al.	4. 巻 5
2. 論文標題 Simple and robust methylation test for risk stratification of patients with juvenile myelomonocytic leukemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 5507 ~ 5518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2021005080	査読の有無 無
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 Nagatomo Kumie, Fukushima Hiroko, Kanai Yu, Muramatsu Hideki, Takada Hidetoshi	4. 巻 63
2. 論文標題 A neonate diagnosed with Noonan syndrome with myeloproliferative change	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 1521 ~ 1523
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.14634	査読の有無 無
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 Kawaguchi Koji, Azumi Shohei, Itakura Yosuke, Takachi Takayuki, Ogura Taemi, Horikoshi Yasuo, Suzuki Kyogo, Muramatsu Hideki, Hama Asahito, Takahashi Yoshiyuki, Watanabe Kenichiro	4. 巻 68
2. 論文標題 Acquisition of a rare NUP98-BPTF fusion gene associated with recurrence of acute myeloid leukemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatr Blood Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pbc.29201	査読の有無 無
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 Ichikawa D, Yamashita K, Okuno Y, Muramatsu H, Kojima S, Nakazawa A, Takahashi Y., et al.	4. 巻 6
2. 論文標題 Integrated diagnosis based on transcriptome analysis in suspected pediatric sarcomas	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 NPJ Genom Med	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41525-021-00210-y	査読の有無 無
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 Yamato G, Deguchi T, Terui K, Ito E, Watanabe K, Muramatsu H., et al.	4. 巻 35
2. 論文標題 Predictive factors for the development of leukemia in patients with transient abnormal myelopoiesis and Down syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 1480 ~ 1484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-021-01171-y	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 村松秀城.
2. 発表標題 JMMLにおける大規模遺伝子解析に基づいた予後予測.
3. 学会等名 第64回日本小児血液・がん学会学術集会 (シンポジウム7) (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村松秀城
2. 発表標題 小児がんの基礎知識と学校での配慮
3. 学会等名 愛知県立大府特別支援学校 創立50周年記念 令和3年度夏のセミナー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村松秀城
2. 発表標題 ゲノム解析の実例の紹介-2
3. 学会等名 第63回日本小児血液・がん学会(ゲノム教育セッション)
4. 発表年 2021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
研究 分 担 者	奥野 友介 (Okuno Yusuke) (00725533)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	

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