

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591397

研究課題名(和文) DNA脱メチル化剤による翻訳効率向上が造血細胞の分化を促進するメカニズムの解明

研究課題名(英文) DNA demethylation facilitates globin translation in myelodysplastic syndrome

研究代表者

松井 啓隆 (MATSUI, HIROTAKA)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授

研究者番号：60379849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄異形成症候群の発症や進展にはエピゲノムの異常が関与することが知られているが、DNA脱メチル化薬がどのような遺伝子の発現変化を惹起して薬剤効果を発揮するのか判明していない。本研究では、DNA脱メチル化に伴ってヘモグロビンの産生が増加するK562白血病細胞を実験モデルとし、DNA脱メチル化薬がどの遺伝子を標的としてヘモグロビン産生を促すのが検証した。K562細胞において、薬剤暴露によってプロモーター領域の脱メチル化が促進された658遺伝子の詳細な解析により、グロビタンパク質の増加は翻訳促進によるものであると推定され、本研究代表者は翻訳伸長促進因子eEF1A2を有望な直接標的として単離した。

研究成果の概要(英文)：Abnormal epigenetic regulations have been shown to be involved in the pathogenesis and/or progression of myelodysplastic syndrome (MDS) and this characteristic of disease led to the introduction of DNA demethylating agents including Azacytidine and Aza-deoxycytidine (Aza-dC) for the clinical management of MDS. In this study, we characterized genes whose expressions are directly increased by Aza-dC using K562 cells, in which DNA demethylation induces hemoglobin (Hb) synthesis, as an experimental model. By analyzing changes in DNA methylation status and gene expression together with histone modification, we found that genes that are suppressed by promoter methylation but are ready to be transcribed will be activated by DNA demethylation. In addition, we elucidated a mechanism by which K562 cells produce Hb upon DNA demethylation.

研究分野：血液内科学

キーワード：エピゲノム DNAメチル化 骨髄異形成症候群

1. 研究開始当初の背景

本研究計画を申請した2011年に、アザシチジンが骨髓異形成症候群に対する治療薬として認可され、一般に使用されるようになった。本薬剤は細胞内に取り込まれたのち、Aza-dCTPに変換され、DNAが複製される際にこれに組み込まれる。Aza-dCTPが組み込まれたDNAは、DNAメチル化酵素であるDNAメチルトランスフェラーゼと不可逆的に複合体を形成し酵素活性を阻害するので、DNAメチル化活性が低下することとなる。すなわち、アザシチジンはDNA脱メチル化薬であり、さまざまな要因によってDNAメチル化をはじめとするエピゲノム状態に異常をきたした骨髓異形成症候群に対して有効な薬剤であるため、本疾患に対する使用が認可された。

本薬剤による治療に伴って、骨髓異形成症候群患者の一部では、貧血が改善し輸血依存性が軽減され、また生命予後の延長がもたらされる場合がある。しかしながら、ではいったい約3GbあるとされるゲノムDNAのどの部位のDNAメチル化異常が骨髓異形成症候群の発症や進展に関与し、逆にアザシチジンがどのDNAメチル化を解除する結果薬剤効果を発揮するのかという点は不明なままであり、本薬剤は経験的な治療効果を基に使用されているのが現状であった。

2. 研究の目的

上記の事情を背景に、本研究ではアザシチジンや、本薬剤の誘導体であるアザデオキシシチジンが、どのような遺伝子を標的として治療効果を発揮するのか明らかにすることを目的とする実験を計画した。

実験モデルとして、まず赤白血病細胞株のK562細胞を採用することとした。この細胞は白血病細胞株でありながら、一定の刺激による細胞分化能が保持されており、アザデオキシシチジンやNaB(Sodium Butyrate)によりヘモグロビンの産生が著しく増加し、赤血球系細胞としての表現型が表立ってくる。この表現型は、少なくとも部分的には骨髓異形成症候群のアザシチジンによる治療を再現するモデルとして利用可能と想定された。すなわち、骨髓異形成症候群患者でも、アザシチジンが有効な症例では徐々に貧血が改善するパターンをとることが知られている。

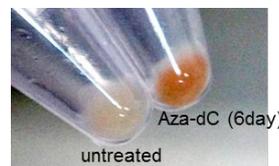
3. 研究の方法

(1) K562細胞のアザデオキシシチジンによる赤血球分化誘導実験：前述のように、本研究では主にK562細胞を用いて、薬剤暴露によるヘモグロビン産生亢進のメカニズムを探ることとした。K562細胞に対して様々な濃度でアザデオキシシチジンを添加し、7日間にわたり、細胞内のヘモグロビン産生量の変化を経時的に測定するとともに、細胞周期パターンの変容や、網羅的な遺伝子発現パターンの変貌を検出した。

(2) DNAメチル化解析：アザデオキシシチジンによるDNA脱メチル化を検出する手法として、次世代シーケンサーを用いた網羅的解析手法の確立を進めた。次世代シーケンサーによるDNAメチル化検出にはいくつかの方法があるが、それぞれに長所・短所がある。RRBSと呼ばれる方法は、一塩基単位でDNAメチル化を測定でき、統計解析により変化の有意差検定が可能であるが、CpGアイランドや遺伝子プロモーターなど、CpGが豊富な部位のメチル化検出に限られるという欠点がある。一方、メチル化CpGに特異的に結合するMBDドメインを用いてメチル化されたDNA断片を濃縮精製する方法では、一塩基単位でのメチル化解析は難しいが、全ゲノムレベルでメチル化を評価することができる。今回はこの両者を試みた。

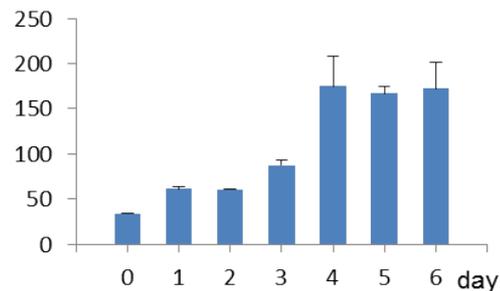
4. 研究成果

(1) K562細胞のアザデオキシシチジンによる赤血球系への分化

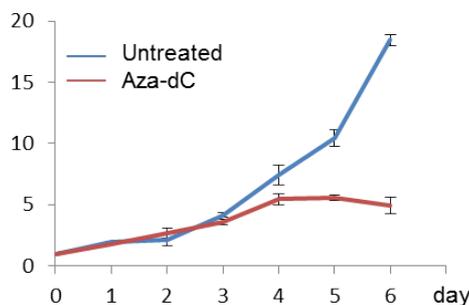


左写真に示すように、K562細胞を5 μ Mのアザデオキシシチジン存在下で6日間

Hb concentration (pg/cell) (Aza-dC 5 μ M)



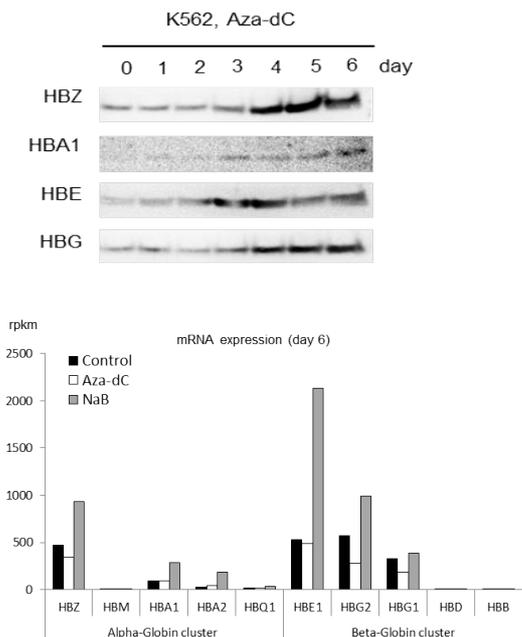
Cell count (x10⁵/mL)



培養すると、細胞ペレットの色調が明確に赤くなり、細胞当たりのヘモグロビン濃度は4倍程度に増加した。これと共に、細胞周期は停止してG1分画が増加し、細胞の増殖は抑制された。これらにより、K562細胞はアザデオキシシチジンによって赤血球系に分化することが確かめられた。

興味深いことに、次世代シーケンサーによるmRNAシーケンス法を用いて、この際の遺伝子発現の変化を検証したところ、NaBによる赤血球分化の場合にはグロビン遺伝子の

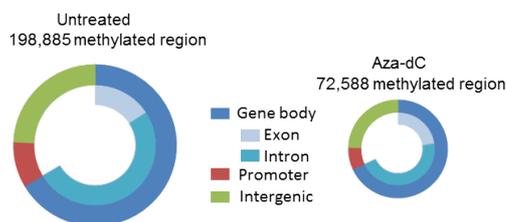
発現が強く誘導されたのに対し、アザデオキシシチジンによる赤血球分化では、グロビン関連遺伝子は(タンパク質レベルではヘモグロビンの産生が著しく増加しているにも関わらず)、mRNA レベルではほとんど増加しないことが分かった(下図)。



このことから、K562 細胞の DNA 脱メチル化に伴うヘモグロビン産生増加は、当初予想したような単純なヘモグロビン関連遺伝子プロモーターの脱メチル化による転写量増加によるものではなく、グロビタンパク質の翻訳が促進されたためであると考えられた。

(2) アザデオキシシチジンによる DNA メチル化の変化

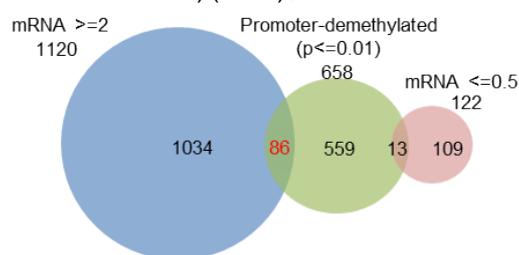
背景に記載の通り、アザデオキシシチジンは、DNA を非特異的に脱メチル化させる薬剤であるため、ゲノム上広範囲に DNA メチル化が減少すると想定された。これを確認するため、MBD ドメインを用いた全ゲノムレベルメチル化解析手法で、DNA メチル化の変化を検証したところ、次図に示すように、薬剤未処理の K562 細胞で、ゲノム上約 20 万カ所存在したメチル化蓄積領域は、アザデオキシシチジン暴露によって約 7 万 3000 か所に減少した。また、薬剤暴露によるメチル化領域の分布に大きな変化は見られなかったため、やはり脱メチル化はゲノム上非特異的に生じていることが確認された。



(3) アザデオキシシチジンによるグロビタンパク質翻訳促進のメカニズム解析

(1)(2)の実験結果より、アザデオキシシチジンは、グロビン翻訳の促進に関わる未知の因子を(DNA 脱メチル化により)発現増加させ、グロビン mRNA からタンパク質への翻訳を促進するものと推定された。

そこで次に、翻訳関連因子のうち、遺伝子プロモーターのメチル化が減少するとともに、mRNA レベルで発現が増加するものの検索を行った。6 日間のアザデオキシシチジン暴露により統計的に有意にプロモーターの DNA メチル化が減少したものは 658 遺伝子あったが、このうち mRNA 発現が増加したものは 86 遺伝子(13.0%)に過ぎないことが判明した(すなわち、DNA 脱メチル化に伴って発現増加した遺伝子の大半は二次的・三次的な変化であると考えられた)(下図)。



これら、プロモーターメチル化の減少によって直接的に発現増加したと推測された 86 遺伝子のうち、タンパク質翻訳に関与するのは、翻訳伸長促進因子である eEF1A2 遺伝子のみであった。本遺伝子は、K562 細胞において、アザデオキシシチジン暴露によって 5 倍程度に mRNA 発現が増加し、また同様にタンパク質レベルでも増加することが確認された。骨髄異形成症候群患者の eEF1A2 プロモーターも、検討した限りでは概して強くメチル化を受けており、アザシチジン治療を受けた症例では eEF1A2 遺伝子の発現が増加したことから、本遺伝子が骨髄異形成症候群の貧血に関与する、DNA 脱メチル化薬標的遺伝子のひとつであることが示唆された。

現在、プロモーターDNA の脱メチル化によって発現変化する遺伝子と発現変化しないものの差異を分子生物学的に解析している。これまでに、プロモーターがメチル化されていても、その周辺領域のクロマチンが開いた状態で維持されている場合、DNA 脱メチル化が起こると発現増加する傾向にあることを掴んでいる。これは、DNA メチル化に加えて、活性型ヒストン修飾の H3K4me3 と抑制型修飾の H3K27me3 を ChIP シーケンス法によって解析した結果わかってきたものであり、今後も多方面からエピゲノム状態の変化を検証することにより、DNA 脱メチル薬の薬剤効果が期待できる症例と、他の薬剤による治療を優先すべき症例とを予測できるようなシステムの構築を進めていく予定である。また本研究成果は現在学術論文として発表すべく、投稿準備を進めている。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 17 件)

1. Sashida G, Harada H, Matsui H, Oshima M, Yui M, Harada Y, Tanaka S, Mochizuki-Kashio M, Wang C, Saraya A, Muto T, Inaba T, Koseki H, Huang G, Kitamura T, Iwama A. Ezh2 loss promotes development of myelodysplastic syndrome but attenuates its predisposition to leukemic transformation. **Nature commn.** 23(5): 4177, 2014. (査読あり)
2. Yamakawa N, Okuyama K, Ogata J, Kanai A, Helwak A, Takamatsu M, Imadome K, Takakura K, Chanda B, Kurosaki N, Yamamoto H, Ando K, Matsui H, Inaba T, Kotani A. Novel functional small RNAs are selectively loaded onto mammalian Ago1. **Nucleic Acids Res.** 42(8):5289-301, 2014. (査読あり)
3. Okuda H, Kawaguchi M, Kanai A, Matsui H, Kawamura T, Inaba T, Kitabayashi I, Yokoyama A. MLL fusion proteins link transcriptional coactivators to previously active CpG-rich promoters. **Nucleic Acids Res.** 42(7): 4241-4256, 2014. (査読あり)
4. Murakami E, Imamura M, Hayes CN, Abe H, Hiraga N, Honda Y, Ono A, Kosaka K, Kawaoka T, Tsuge M, Aikata H, Takahashi S, Miki D, Ochi H, Matsui H, Kanai A, Inaba T, McPhee F, Chayama K. Ultradeep sequencing study of chronic hepatitis C virus genotype 1 infection in patients treated with daclatasvir, peginterferon, and ribavirin. **Antimicrob Agents Chemother.** 58(4): 2105-2112, 2014. (査読あり)
5. Nagamachi A, Matsui H, Asou H, Ozaki Y, Aki D, Kanai A, Takubo K, Suda T, Nakamura T, Wolff L, Honda H*, Inaba T. (Nagamachi and Matsui: equal contribution) Haploinsufficiency of SAMD9L, an endosome fusion facilitator, causes myeloid malignancies in mice mimicking human diseases with monosomy 7. **Cancer Cell.** 24(3):305-17, 2013. (査読あり)
6. Shi N, Hiraga N, Imamura M, Hayes CN, Zhang Y, Kosaka K, Okazaki A, Murakami E, Tsuge M, Abe H, Aikata H, Takahashi S, Ochi H, Tateno-Mukaidani C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A, Inaba T, McPhee F, Gao M, Chayama K. Combination therapies with NS5A, NS3 and NS5B inhibitors on different genotypes of hepatitis C virus in human hepatocyte chimeric mice. **Gut.** 62(7):1055-61, 2013. (査読あり)
7. Harada Y, Inoue D, Ding Y, Imagawa J, Doki N, Matsui H, Yahata T, Matsushita H, Ando K, Sashida G, Iwama A, Kitamura T, Harada H. RUNX1/AML1 mutant collaborates with BMI1 overexpression in the development of human and murine myelodysplastic syndromes. **Blood.** 121(17):3434-46, 2013. (査読あり)
8. Yoshida N, Oda M, Kuroda Y, Katayama Y, Okikawa Y, Masunari T, Fujiwara M, Nishisaka T, Sasaki N, Sadahira Y, Mihara K, Asaoku H, Matsui H, Seto M, Kimura A, Arihiro K, Sakai A. Clinical significance of sIL-2R levels in B-cell lymphomas. **PLoS One.** 2013;8(11):e78730. (査読あり)
9. Kobayashi Y, Matsui H*, Kanai A, Tsumura M, Okada S, Miki M, Nakamura K, Kunishima S, Inaba T, Kobayashi M. Identification of integrin $\beta 3$ L718P mutation in a pedigree with autosomal dominant macrothrombocytopenia. **Br J Haematol**, 160(4):521-9, 2013. (査読あり)
10. Ozaki Y, Matsui H, Asou H, Nagamachi A, Aki D, Honda H, Yasunaga S, Takihara Y, Yamamoto T, Izumi S, Ohsugi M, Inaba T*. (Ozaki and Matsui: equal contribution) Poly-ADP Ribosylation of Miki by tankyrase-1 Promotes Centrosome Maturation. **Mol Cell** 14, 694-706, 2012. (査読あり)
11. Ueda T, Sanada M, Matsui H, Yamasaki N, Honda ZI, Shih LY, Mori H, Inaba T, Ogawa S, Honda H. EED mutants impair polycomb repressive complex 2 in myelodysplastic syndrome and related neoplasms. **Leukemia** 26(12):2557-60, 2012. (査読あり)
12. Li Q, Guo H, Matsui H, Honda H, Inaba T, Sundberg JP, Sprecher E, Uitto J. Mouse Samd9l is not a functional paralogue of the human SAMD9, the gene mutated in normophosphataemic familial tumoral calcinosis. **Exp Dermatol** 21, 554-556, 2012. (査読あり)
13. 松井啓隆, 金井昭教, 長町安希子, 尾崎佑子, 稲葉俊哉. 次世代シーケンサーを用いた骨髄異形成症候群(MDS)における DNA メチル化の解析. **広島医学** 65: 285-288, 2012. (査読あり)
14. 上田健, 稲垣舞子, 長町安希子, 山崎憲政, 松井啓隆, 稲葉俊哉, 本田浩章. ヒストン脱メチル化酵素 Fbx110 の発現異常による白血病発症機構の解析.

広島医学 65: 289-291, 2012. (査読あり)

15. 河合秀彦, 曹麗麗, 飯塚大輔, 松井啓隆, 金井昭教, 稲葉俊哉, 増田雄司, 笹谷めぐみ, 神谷研二, 鈴木文男. 恒常的な放射線照射に対する細胞応答の線量率依存性の解析. **広島医学** 65: 302-304, 2012. (査読あり)
16. 曹麗麗, 河合秀彦, 飯塚大輔, 松井啓隆, 金井昭教, 稲葉俊哉, 笹谷めぐみ, 神谷研二, 鈴木文男. 慢性的な γ 線照射に対する細胞応答の先端技術を用いた解析. **長崎医学会雑誌** 87: 243-246, 2012. (査読あり)
17. 上田健, 真田昌, 松井啓隆, 山崎憲政, 本田善一郎, Shih Lee-Yung, 森啓, 稲葉俊哉, 小川誠司, 本田浩章. 骨髄異形成症候群 MDS におけるポリコム複合体 PRC2 構成因子 EED の機能欠失型変異. **長崎医学会雑誌** 87: 209-211, 2012 (査読あり)

〔学会発表〕(計 18 件)

1. 奥野萌, 松井啓隆, 長町安希子, 金井昭教, 稲葉俊哉. リボソーム RNA プロセシング異常による造血器腫瘍発症経路の同定. 第 19 回造血器腫瘍研究会. 2015 年 1 月 24 日. 佐賀.
2. 松井啓隆. DNA メチル化異常と造血器腫瘍. 第 76 回 日本血液学会学術集会. 2014 年 10 月 31 日. 大阪.
3. 松井啓隆, 稲葉俊哉. ポリ ADP-リボシル化による分裂期中心体の成熟を介した細胞分裂のマネージメント. 第 87 回日本生化学会大会. 2014 年 10 月 16 日. 京都.
4. 松井啓隆, 河合秀彦, 金井昭教, 稲葉俊哉. 大量データ解析を駆使した放射線影響解析手法の確立にむけて. 日本放射線影響学会第 57 回大会. 2014 年 10 月 1 日. 鹿児島.
5. Matsui H, Kanai A, Inaba T. Determination of 5-hydroxymethylcytosine at single base resolution using next generation sequencer. 43rd ISEH meeting. 2014 年 8 月 23 日. モントリオール(カナダ).
6. Matsui H, Kanai A, Nagamachi A, Ozaki Y, Honda H, Inaba T. Deficiency of *SAMD9L* contributes to the development of Myeloid Malignancies Harboring Monosomy 7/7q-. 第 5 回 JSH 国際シンポジウム. 2014 年 5 月 24 日. 浜松.
7. 松井啓隆, 金井昭教, 稲葉俊哉. 次世代シーケンサーによるハイドロキシメチルシトシンの定量. 第 18 回造血器腫瘍研究会. 2014 年 2 月 7 日. 東京.
8. Matsui H, Nagamachi A, Ozaki Y, Honda H, Inaba T. Haploinsufficiency Of *SAMD9L*, An Endosome Fusion Facilitator, In Mice Induces The Development Of Myeloid Malignancies Mimicking Human Diseases

With Monosomy 7. 55th ASH annual meeting. 2013 年 12 月 9 日. ニューオーリンズ(米国).

9. Matsui H, Kanai A, Inaba T. Determination of 5-hydroxymethylcytosine at single base resolution using next generation sequencer. 第 72 回日本癌学会総会. 2013 年 10 月 5 日. 横浜.
10. Matsui H, Kanai A, Inaba T. Determination of 5-hydroxymethylcytosine at single base resolution using next generation sequencer. 第 74 回 日本血液学会学術集会. 2013 年 10 月 11 日. 札幌.
11. 松井啓隆, 金井昭教, 稲葉俊哉. 造血器悪性腫瘍の発症・進展におけるエピゲノム異常の関与. 日本放射線影響学会第 56 回大会. 2013 年 10 月 18 日. 青森.
12. Matsui H, Nagamachi A, Ozaki Y, Honda H, Asou H, Inaba T. Haploinsufficiency of *Samd9L*, encoding an endosome fusion facilitator, develops myeloid malignancies in mice mimicking human diseases with monosomy 7. 42nd ISEH meeting. 2013 年 8 月 23 日. ウィーン(オーストリア).
13. 松井啓隆, 金井昭教, 稲葉俊哉. 次世代シーケンサーを用いた DNA 脱メチル化薬標的遺伝子の特定. 第 17 回造血器腫瘍研究会. 2013 年 1 月 24 日. 宮崎.
14. Matsui H, Ozaki Y, Nagamachi A, Inaba T. Abnormal Mitosis Due to Impairment of Centrosome Maturation by the Deletion of Candidate 7q- Responsible Genes. 54th ASH annual meeting. 2012 年 12 月 8 日. アトランタ(米国).
15. 松井啓隆, 尾崎佑子, 長町安希子, 金井昭教, 稲葉俊哉. The translational machinery as a possible target of epigenetic therapy in MDS. 第 73 回 日本血液学会学術集会. 2012 年 10 月 19 日. 京都.
16. 松井啓隆, 金井昭教, 稲葉俊哉. エピゲノム治療薬による翻訳制御機構の活性化にともなう, MDS 細胞の赤血球系への分化. 第 71 回日本癌学会総会. 2012 年 9 月 20 日. 札幌.
17. 松井啓隆, 金井昭教, 尾崎佑子, 長町安希子, 稲葉俊哉. 次世代シーケンサーを用いた造血器悪性腫瘍のエピゲノム解析. 日本放射線影響学会第 55 回大会. 2012 年 9 月 6 日. 仙台.
18. Matsui H, Kanai A, Inaba T. The translational machinery as a possible target of epigenetic therapy in MDS. 第 3 回 JSH 国際シンポジウム. 2012 年 5 月 26 日. 川越.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 啓隆 (MATSUI, Hirotaka)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・准
教授
研究者番号：60379849

(2) 研究分担者

金井 昭教 (KANAI, Akinori)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・助
教
研究者番号：60549567