

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640065

研究課題名(和文) 酸化リン酸化経路活性化による発がん機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of tumorigenic mechanisms by activation of oxidative phosphorylation pathway

研究代表者

本田 浩章 (Honda, Hiroaki)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号：40245064

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々はヒストン脱メチル化酵素Kdm2bの造血幹細胞における過剰発現が白血病発症を誘導することを見だし、Kdm2b高発現造血幹細胞では酸化リン酸化経路が活性化していることを見出した。本研究では、Kdm2bは、1)酸化リン酸化関連遺伝子に直接結合し発現を上昇させていること、2)S期の細胞周期を有意に亢進させているがG0-G1への移行については関与していないこと、3)ATP産生を上昇させるがROS産生には影響しないこと、を明らかとした。我々の結果は、酸化リン酸化経路の亢進による白血病発症機構にエネルギー代謝の見地から新しい知見をもたらしたものと考えられる。

研究成果の概要(英文)： We found that overexpression of Kdm2b, a histone demethylase for histone H3K36, in hematopoietic stem cells induced leukemia and observed that genes involved in oxidative phosphorylation are activated in Kdm2b-overexpressing hematopoietic stem cells. In this study, we demonstrated that i) Kdm2b directly binds to several genes involved in oxidative phosphorylation and upregulates their expression patterns, ii) Kdm2b accelerates cell cycle of the S-phase but dose not affect cell cycle entry from G0 phase to G1 phase, and iii) Kdm2b enhances ATP production but dose not affect ROS production. These findings provide novel insights into the tumorigenic mechanisms by activation of oxidative phosphorylation from the viewpoint of energy metabolism.

研究分野：血液内科

キーワード：ヒストン脱メチル化 Kdm2b 白血病 造血幹細胞 酸化リン酸化経路 エネルギー代謝

## 1. 研究開始当初の背景

クロマチン構造の中心となるヒストンは、アセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化など様々な化学的修飾を受け、染色体の高次構造の変化によりダイナミックに転写を制御し、発生、分化、細胞死や細胞癌化等において重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。

我々はマウスにレトロウイルスを投与し *in vivo* mutagenesis を起こす系を用いて、白血病関連遺伝子としてヒストン H3 の第 36 番目のリジン残基 (H3K36) に対する脱メチル化酵素である Kdm2b を同定した。我々はさらに白血病発症における Kdm2b の関与を検討する目的で、造血幹細胞特異的に Kdm2b を高発現するトランスジェニック (Tg) マウス、および Kdm2b を全身で欠失したノックアウト (KO) マウスを作製した。これらのマウスに対して長期観察を行なったところ、Kdm2bTg マウスのみが白血病を発症することを見いだした。この結果は、Kdm2b を過剰発現した造血幹細胞が造腫瘍性を獲得し、白血病を発症することを示している。我々はさらにその基盤となる分子機構を解析する目的で、コントロールマウスおよびまだ白血病を発症していない若い Kdm2b Tg マウスの造血幹細胞を単離し、トランスクリプトーム解析を行なった。コントロールマウスと比較して Kdm2b Tg マウスの造血幹細胞では様々な遺伝子の発現上昇および低下が認められたが、これまでの論文で白血病細胞の原因遺伝子として同定されている遺伝子についてはその発現変化は明らかではなかった。そのため、遺伝子変化を機能グループとして解析する GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) を行なったところ、興味あることに、Kdm2b Tg マウスの造血幹細胞において、cytochrome family や NADH など酸化リン酸化経路の遺伝子群が有意に活性化していることが明らかとなった。さらに、Kdm2b Tg マウスに発症した白血病細胞においても同じ解析を行なったところ、同様に酸化リン酸化経路の遺伝子発現の上昇が認められ、酸化リン酸化活性化は、白血病の発症機構のみならずその増殖・維持機構においても基盤となっていると考えられた。

## 2. 研究の目的

細胞はグルコースを分解して ATP を産生することによりエネルギーを得ているが、その経路は 1) 解糖系 → 2) TCA 回路 → 3) 電子伝達系、という 3 つに大別される。このうち、解糖系は細胞質で行なわれる嫌気性代謝であり、TCA 回路と電子伝達系はミトコンドリア内膜で行なわれる好気性代謝である。解糖系における ATP 産生は代謝物のリン酸基が ADP に転移する反応であり (基質レベルのリン酸化)、1 分子のグルコースからわずか 2 分子の ATP しか産生されないが、ミトコンドリアの電子伝達系における ATP 産生反応は内膜と外膜の間のプロトン勾配を利用した酸化反応で

あり (酸化リン酸化)、1 分子のグルコースから 36 分子の ATP を生み出すことが出来る。すなわち、酸化リン酸化は細胞がグルコースから効率良く ATP を産生するのに不可欠な反応と考えられる。

我々は、造血幹細胞特異的なプロモーターを用いて作製した Kdm2b の Tg マウスが白血病を発症することを見だし、白血病発症前の造血幹細胞を単離しトランスクリプトーム解析を行なうことにより、造血幹細胞分画において酸化リン酸化経路が恒常的に活性化していることを見いだした。さらに、この現象は白血病を発症したマウスの芽球細胞においても認められ、酸化リン酸化活性化は、白血病の発症機構と増殖機構の両方において重要な役割を果たしていると考えられた。

この申請では、Kdm2b の Tg マウスで観察された造血幹細胞における酸化リン酸化経路の活性化が、いかなる分子機構を介して白血病発症に至るかを解析することを目的とする。得られた結果は、がん幹細胞を標的とした新たな治療戦略への応用へも期待される。

## 3. 研究の方法

### 1) 酸化リン酸化経路関連遺伝子の発現上昇が Kdm2b による直接作用かどうかの検討

Kdm2b Tg マウスの造血幹細胞においては、コントロールマウスの造血幹細胞に比べて cytochrome 系、NADH 系、ATP synthase 系など、酸化リン酸化経路に関わる遺伝子群の発現が上昇している。この現象が、Kdm2b による直接作用であるかどうかについて、抗 Kdm2b 抗体を用いた ChIP 解析により検討を行った。コントロールマウスと Kdm2b Tg マウスから造血幹細胞を単離し、ホルマリン架橋後に Kdm2b に対する抗体を用いて免疫沈降し、Kdm2b Tg の造血幹細胞において有意に酸化リン酸化関連遺伝子への集積が検出されるかどうかについて解析した。

### 2) 酸化リン酸化経路の活性化による造血幹細胞機能変化の解析

酸化リン酸化経路の活性化により、造血幹細胞の機能がどのように変化するかについて、以下の点に焦点を当てて解析を行った。

- i) ATP 産生測定: ミトコンドリアにおける酸化リン酸化経路の活性化により、おそらく細胞において通常よりも多くの ATP が産生され、細胞にとってのエネルギー源になっていると考えられる。このことを検証する目的で、コントロールマウスと Kdm2b Tg マウスから造血幹細胞を単離し、luciferase を基質とした発光系と FACS を組み合わせることにより、細胞内の ATP 量の変化について検討した。
- ii) 活性化酸素種 (reactive oxygen species, ROS) の測定: ミトコンドリアにおける酸化リン酸化経路の活性化により、細胞内の ROS

の産生が増加している可能性がある。ROSの増加はDNAを損傷し、細胞をがん化に導く可能性が考えられる。この可能性を検討する目的で、コントロールマウスとKdm2b Tg マウスから経時的に造血幹細胞を単離し、DCFH-DA等の細胞浸透性のプローブを取り込ませ、この基質がROSにより酸化されると蛍光を発することを利用してFACSを用いて細胞内ROSの測定を行った。

iii) 細胞増殖能と細胞周期の測定: コントロールマウスとKdm2b Tg マウスにおいて造血幹細胞の細胞増殖能と細胞周期を比較する。コントロールマウスとKdm2b Tg マウスにBrdUを注射し、その後造血幹細胞を単離しその取り込みを解析することにより造血幹細胞の増殖能の差について検討した。また、コントロールマウスとKdm2b Tg マウスから単離した造血幹細胞をPyronin YでラベルしFACSを行うことにより、造血幹細胞の細胞周期の変化についても検討した。

### 3) 造血組織以外の組織における Kdm2b 脱制御による腫瘍発症の検討

白血病は他のがんと異なり腫瘍細胞が可動性を有するとともに直接酸素を取り込むことが可能である。すなわち、白血病においては固形がん認められる局所的増殖に伴う血管新生を必要とせず、低酸素状態やそれに伴う酸化リン酸化経路の活性化の状態も異なっている可能性が考えられる。

我々の解析は造血系細胞を標的としたものであるが、このKdm2b 発現亢進による酸化リン酸化経路の活性化と造腫瘍性の獲得が造血幹細胞に特化した現象であるのか、それとも組織幹細胞に普遍的な現象であるのかどうかについて検討を行った。この目的のため、全身の細胞で目的遺伝子を高発現するRosaのベクターを用いてKdm2bのノックインマウスを作製し、造血器以外の組織においても腫瘍化が認められるかどうかについて観察した。腫瘍化が認められた場合、その組織の幹細胞を単離して酸化リン酸化経路亢進の有無について解析を行った。

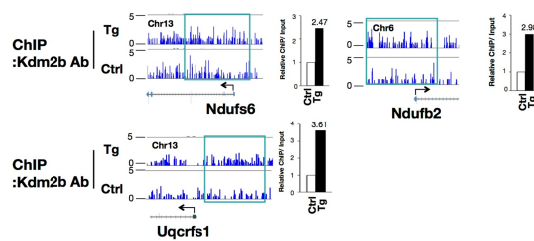
## 4. 研究成果

### 1) 酸化リン酸化経路関連遺伝子の発現上昇がKdm2bによる直接作用かどうかの検討

コントロールマウスとKdm2b Tg マウスの造血幹細胞を用いたトランスクリプトーム解析をGene Set Enrichment Analysis (GSEA)により解析したところ、酸化リン酸化に関わる遺伝子群の発現上昇が認められた。これらの遺伝子がKdm2bの直接作用かどうかについて、抗Kdm2b抗体を用いたChIP解析により検討を行った。

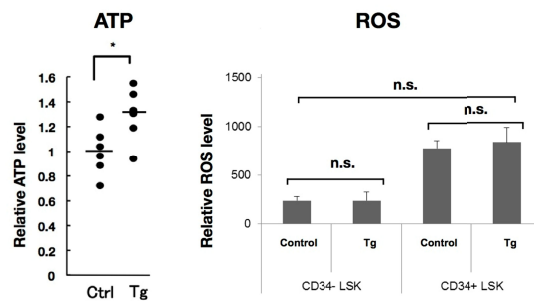
その結果、酸化リン酸化に関わる遺伝子群のうち、Ndufs6, Ndufb2, Uqcrcs1に集積を認め、少なくともこれらの遺伝子についてはKdm2b

の直接標的遺伝子であり、Kdm2bがその遺伝子座に結合することにより発現を誘導していると考えられた(下図参照)。

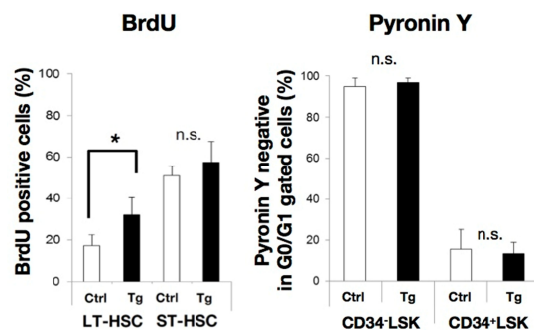


### 2) 酸化リン酸化経路の活性化による造血幹細胞機能変化の解析

コントロールマウスとKdm2b Tg マウスから造血幹細胞を単離し、ATPおよびROSの産生について解析を行った。その結果コントロールマウスの造血幹細胞に比べてKdm2b Tg マウスの造血幹細胞ではATPの有意な上昇を認めたが、ROSについては差を認めなかった。この結果はKdm2b Tg マウスの造血幹細胞では、ROS産生を伴わずにATPのみが産生亢進していることが明らかとなった。



同様にコントロールマウスとKdm2b Tg マウスから造血幹細胞を単離し、BrdUとPyronin Yの測定を行った。その結果、Kdm2b Tg マウスにおいて長期骨髄再構築能を有する造血幹細胞(LT-HSC)でBrdUの取り込みの増加を認め、S期の細胞周期が有意に亢進していることが明らかとなった。一方Pyronin Yについては差を認めず、G0/G1への細胞周期移行については変化が無いと考えられた(下図)。



### 3) 造血組織以外の組織における Kdm2b 脱制御による腫瘍発症の検討

全身で目的遺伝子を高発現する Rosa/stop

ノックインカセットを用いて、全身の細胞で誘導可能に Kdm2b を高発現するコンディショナルノックインマウスの作製を行った。現在発現誘導を掛けて、経過観察を行っている。今後、白血病を含めて全身の様々な臓器において腫瘍が発症するかどうかについて検討を行う予定である。

#### 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7件)

1. Ueda T, Nagamachi A, Takubo K, Yamasaki N, Matsui H, Kanai A, Nakata Y, Ikeda K, Konuma T, Oda H, Wolff L, Honda Z, WuX, Helin K, Iwama A, Suda T, Inaba T, Honda H. Fbx10 overexpression in murine hematopoietic stem cells induces leukemia involving metabolic activation and upregulation of Nsg2. **Blood** 125(22):3437-3446, 2015 **査読あり**
2. Akira Sato A, Kayama A, Shojima K, Matsumoto S, Koyama H, Minami Y, Nojima S, Morii E, Honda H, Takeda K, and Kikuchi A. The Wnt5a-Ror2 axis promotes the signaling circuit between interleukin-12 and interferon- $\gamma$  in colitis. **Sci Rep** 5:10536, 2015 **査読あり**
3. Wada T, Koyama D, Kikuchi J, Honda H, Furukawa Y. Overexpression of the shortest isoform of histone demethylase LSD1 primes hematopoietic stem/progenitor cells for malignant transformation. **Blood pii: blood-2014-11-610907**, 2015 **査読あり**
4. Honda H, Nagamachi A, Inaba T. -7/7q- syndrome in myeloid-lineage hematopoietic malignancies: attempts to understand this complex disease entity. **Oncogene** (review) 34(19):2413-2425, 2015 **査読あり**
5. Sato T, Goyama S, Kataoka K, Nasu R, Tsuruta-Kishino T, Kagoya Y, Nukina A, Kumagai K, Kubota N, Nakagawa M, Arai S, Yoshimi A, Honda H, Kadowaki T, Kurokawa M. Evil Defines Leukemia-initiating Capacity and Tyrosine Kinase Inhibitor Resistance in Chronic Myeloid Leukemia. **Oncogene** 33(42), 5028-5038, 2014 **査読あり**
6. Kobayashi CI, Takubo K, Kobayashi H, Nakamura-Ishizu A, Honda H, Kataoka K, Kumano K, Akiyama H, Sudo T, Kurokawa M, Suda T. The IL-2/CD25 Axis Maintains Distinct Subsets of Chronic Myeloid Leukemia-Initiating Cells. **Blood** 123(16): 2540-9, 2014 **査読あり**
7. Nagamachi A, Nakata Y, Ueda T, Yamasaki N, Ebihara Y, Tsuji K, Honda Zi, Takubo K, Suda T, Oda H, Inaba T, Honda H. Acquired deficiency of A20 results in rapid apoptosis, systemic inflammation, and

abnormal hematopoietic stem cell function. **PLOS ONE** 9(1):e87425, 2014 **査読あり**

[学会発表](計4件)

1. Takeshi Ueda, Akiko Nagamachi, Yuichiro Nakata, Norimasa Yamasaki, Toshiya Inaba and Hiroaki Honda. Role of Fbx10, a histone demethylase, in MLL-AF9-induced leukemia. 第76回日本血液学会 平成26年11月2日 大阪
2. Ken-ichiro Ikeda, Takeshi Ueda, Akiko Nagamachi, Norimasa Yamasaki, Yuichiro Nakata, Toshiya Inaba and Hiroaki Honda. EED, a subunit of PRC2, plays an essential role in maintenance of adult hematopoietic stem cells. 第76回日本血液学会 平成26年11月1日 大阪
3. Yuichiro Nakata, Takeshi Ueda, Ken-ichiro Ikeda, Norimasa Yamasaki and Hiroaki Honda. Essential roles of Jmjd3, a histone demethylase, in normal hematopoiesis and leukemogenic potential. 第76回日本血液学会, 平成26年11月1日 大阪
4. Akiko Nagamachi, Takeshi Ueda, Norimasa Yamasaki, Yuichiro Nakata, Yasuhiro Ebihara, Koichiro Tsuji, Keiyo Takubo, Toshio Suda, Toshiya Inaba, and Hiroaki Honda. A20, a ubiquitin-modifying enzyme for NF- $\kappa$ B, plays essential roles in the homeostatic maintenance of adult hematopoiesis by prohibiting apoptosis and inflammation 第72回日本癌学会 平成25年10月4日 横浜

[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

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/sosai/top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本田 浩章 (HONDA HIROAKI)  
広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授  
研究者番号：40245064

(2) 研究分担者

上田 健 (UEDA TAKESHI)  
広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教  
研究者番号：60585149

(3) 連携研究者：なし

( )

研究者番号：