

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 27 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460391

研究課題名(和文)造血器腫瘍発症における疾患関連EED遺伝子変異体の機能解析

研究課題名(英文)Role of EED mutation in hematologic malignancy

研究代表者

上田 健 (UEDA, Takeshi)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：60585149

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ポリコム複合体PRC2 (Polycomb repressive complex 2)は、ヒストンH3の27番目のリジン残基 (H3K27)をメチル化して転写抑制に寄与するとされるタンパク質複合体である。私達は、以前に骨髄異形成症候群において、PRC2の構成因子のひとつであるEEDの遺伝子変異を同定した。本研究では、疾患関連EED Ile363Met変異を有するノックインマウスを用いて変異の機能を個体レベルで解析した。その結果、変異マウスでは、H3K27トリメチル化のピークから周辺への伝播障害を伴い、造血細胞の自律的増殖と造血器腫瘍発生率の増加を呈することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：EED acts as a non-catalytic component of polycomb repressive complex 2 (PRC2) that is a central regulator of histone H3 Lys27 (H3K27) methylation associated with transcriptional repression. We previously identified EED Ile363Met (I363M) mutation in myelodysplastic syndrome and related diseases. In this study, to investigate the role of I363M in disease pathogenesis, we generated and analyzed EED I363M knock-in mice. As a result, the I363M mutation was shown to inhibit the propagation of trimethylated H3K27 repressive marks in vivo. In addition, we demonstrated that the heterozygotes enhanced hematopoietic stem/progenitor cell activity and contributed to increased susceptibility to leukemia, while the homozygotes resulted in embryonic lethality.

研究分野：医歯薬学

キーワード：エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

(1) ポリコーム複合体 PRC2 (polycomb repressive complex 2)は、ヒストン H3 の 27 番目のリジン残基 (H3K27) に対するメチル化酵素複合体であり、エピゲノムを介した遺伝子発現制御に中心的な役割を果たす。WD リピートタンパク質 EED は、PRC2 の non-catalytic な構成因子として機能する。PRC2 が十分に活性化され機能を発揮するためには、EED がトリメチル化 H3K27 (H3K27me3) と相互作用することによるアロステリック効果が必要である。私達は以前に、難治性造血器腫瘍である骨髄異形成症候群の 3.1% において EED の遺伝子変異を同定し、その変異のすべてが PRC2 複合体の機能欠失に寄与することを報告した (Ueda et al. Leukemia 2012)。本研究では、同定した変異のひとつである疾患関連 EED I1e363Met (以下 I363M と表記) 変異体に着目した。

(2) EED のアミノ酸残基 I1e363 は、EED と H3K27me3 の相互作用に重要な芳香族アミノ酸 Trp364、Tyr365 の隣に位置している。私達は、H3K27me3 ペプチドとの共沈実験から、I363M 変異体は H3K27me3 への結合能が、野性型 EED の約 10% にまで低下していることを見出した。また、この変異体を NIH3T3 マウス線維芽細胞株に発現させると、H3K27me3 レベルの著明な低下が観察された。一方で、I363M 変異体と野性型 EED は、PRC2 のコアサブユニット EZH2 とは同等に結合することが示された。以上のことから、I363M 変異体を構成因子にもつ PRC2 では、H3K27me3 との相互作用によるアロステリックな活性化が抑制されている可能性が考えられる。PRC2 の活性化障害と造血器腫瘍の発症、進展との関連が示唆された (Ueda et al. Leukemia 2012)。

2. 研究の目的

当研究室で作出された I363M 変異を有するノックインマウスを用いて、EED I363M 変異の機能を個体レベルで検証する。PRC2 の活性化障害の意義を生体で検証できる哺乳類モデルはこれまでに報告がない。変異同定に至った経緯より、特に造血系に着目して、変異の生理的および病的意義を個体レベルで解析する。

3. 研究の方法

(1) 正常造血における機能解析

ヘテロ変異マウス (以下変異マウスと表記) と対照マウスから骨髄細胞を調製し、フローサイトメトリーにより造血分化マーカーを解析した。またコロニーアッセイによって、変異が造血機能に与える影響を評価した。さらに表現型が造血細胞自律的なものである

か否か、放射線照射マウスへの骨髄移植実験により検証を行った。

(2) 造血器腫瘍発症における機能解析

変異マウス、対照マウスを経時的に観察し、造血器腫瘍の自然発症の有無を検討した。また、マウス白血病レトロウイルス MOL4070A によって引き起こされる白血病モデルを用いて、造血器腫瘍発症の頻度を解析した。MOL4070A は、Moloney マウス白血病ウイルスの Long terminal repeat を改変して作製されたウイルスであり、野性型新生仔マウスに感染させると、白血病を低い頻度で発症する。白血病発症のバックグラウンドの低いのが特徴であり、本モデルは腫瘍発症率の増加を検出するのに適している。

(3) 遺伝子発現解析

マウス骨髄より、造血幹細胞を含む c-Kit 陽性 Sca1 陽性 Lin 陰性分画 (LSK 細胞分画) をフローサイトメトリーを用いて単離し、RNA 抽出後、次世代シーケンサーを用いて RNA シーケンスを行った。得られた遺伝子発現データを基にパスウェイ解析のひとつである Gene set enrichment analysis を行い、特定の機能をもつ遺伝子群の発現がどのように変動したかを変異マウスと対照マウスとの両群で比較した。

(4) エピゲノム解析

胎生 12.5 日齢の胎仔より単離した胎仔繊維芽細胞に対して、H3K27 メチル化修飾を認識する抗体を用いて、ChIP シーケンスを行った。ホモ変異マウス、野性型対照マウス由来の細胞におけるメチル化修飾のゲノム上の分布を比較した。

4. 研究成果

(1) 変異マウスは、加齢に伴い対照群と比較して有意に高い骨髄有核細胞数、造血前駆細胞数、末梢血白血球数を示した。また、造血コロニーアッセイでは、通常コロニーリプレATINGを行うことにより造血コロニー数は減少するのに対し、変異マウス由来の造血細胞においては、複数回のリプレATINGによっても造血コロニー形成能が維持されていた。骨髄移植実験を行ったところ、変異マウス由来の細胞を移植されたレシピエントの末梢血中には、対照マウス由来の細胞を移植された場合に比べ、有意に高い割合でドナー由来の細胞が検出された。以上より、変異マウス由来の造血細胞で観察される幹細胞性の維持、増殖能の亢進は細胞自律的機構に起因するものと考えられた。

(2) 18 ヶ月にわたる長期観察の結果、一部の

変異マウスでは、脾腫を認めたが、血球形態異常や末梢血及び脾細胞の分化マーカーに関して特定の分化系列への偏りは観察されなかった。したがって、I363M 変異は造血細胞の過増殖、造血組織の過形成には寄与するが、単独では形質転換に至らないものと考えられた。一方で、MOL4070A を用いた白血病モデルでは、変異マウスは対照群と比べて高い腫瘍発症率を示し、早期に造血器腫瘍を発症して致死となった。このことから、I363M 変異は、付加的な遺伝子発現異常と協調して、腫瘍発症に促進的に機能することが明らかとなった。

(3) 遺伝子発現解析の結果、変異マウスの LSK 細胞分画では、幹細胞の維持に重要とされるヒストン H3K27 と H3K4 とともにトリメチル化修飾される (bivalent ドメインを有する) 遺伝子群、また骨髄球系分化関連遺伝子や、cAMP を介する細胞内情報伝達経路に関連した遺伝子群がいずれも脱抑制され、発現上昇していることが明らかとなった。また、PRC2 の他の構成因子である Suz12 変異マウスを用いた既報の遺伝子発現データとの比較から、共通して発現が脱抑制されている PRC2 の標的遺伝子として Lgals3 を同定した。造血前駆細胞に Lgals3 を過剰発現させると、より長期の造血コロニー形成能を獲得した。一方で、変異マウス由来の造血前駆細胞において Lgals3 の発現を抑制した場合には、コロニー形成能の低下が観察された。このことから、本遺伝子が I363M 変異による造血幹細胞性の維持に寄与している可能性が示された。

(4) I363M ホモマウスは胎生 13.5-14.5 日で致死となった。胎仔線維芽細胞を用いた ChIP シークエンスの結果から、I363M 変異を有する細胞では、H3K27me3 ピークから周辺へのトリメチル化レベルの広がりが抑制されていることが示された。EED と H3K27me3 との相互作用による PRC2 の活性化は、H3K27me3 の伝播に重要であるというモデルが報告されている。今回、私達は遺伝子改変マウスを用いて EED 変異による PRC2 活性化障害が H3K27me3 ピークからの伝播障害をもたらすことを明らかにした。

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)

Tong KI, Ota K, Komuro A, Ueda T, Ito A, Anne Koch C, Okada H. Attenuated DNA damage repair delays therapy-related myeloid neoplasms in a mouse model. *Cell Death Dis.*

査読有 2016;7(10):e2401.
doi:10.1038/cddis.2016.298.

Ueda T, Nakata Y, Nagamachi A, Yamasaki N, Kanai A, Sera Y, Sasaki M, Matsui H, Honda Z, Oda H, Wolff L, Inaba T, Honda H. Propagation of trimethylated H3K27 regulated by polycomb protein EED is required for embryogenesis, hematopoietic maintenance, and tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 査読有 2016;113(37):10370-5.
doi:10.1073/pnas.1600070113.

Ueda T, Nakata Y, Yamasaki N, Oda H, Sentani K, Kanai A, Onishi N, Ikeda K, Sera Y, Honda ZI, Tanaka K, Sata M, Ogawa S, Yasui W, Saya H, Takita J, Honda H. ALK(R1275Q) perturbs extracellular matrix, enhances cell invasion and leads to the development of neuroblastoma in cooperation with MYCN. *Oncogene.* 査読有 2016;35(34):4447-58.
doi:10.1038/onc.2015.519.

Inoue S, Li WY, Tseng A, Beerman I, Elia AJ, Bendall SC, Lemonnier F, Kron KJ, Cescon DW, Hao Z, Lind EF, Takayama N, Planello AC, Shen SY, Shih AH, Larsen DM, Li Q, Snow BE, Wakeham A, Haight J, Gorrini C, Bassi C, Thu KL, Murakami K, Elford AR, Ueda T, Straley K, Yen KE, Melino G, Cimmino L, Aifantis I, Levine RL, De Carvalho DD, Lupien M, Rossi DJ, Nolan GP, Cairns RA, Mak TW. Mutant IDH1 Downregulates ATM and Alters DNA Repair and Sensitivity to DNA Damage Independent of TET2. *Cancer Cell.* 査読有 2016 ;30(2):337-48.
doi:10.1016/j.ccell.2016.05.018.

Ikeda K, Ueda T, Yamasaki N, Nakata Y, Sera Y, Nagamachi A, Miyama T, Kobayashi H, Takubo K, Kanai A, Oda H, Wolff L, Honda Z, Ichinohe T, Matsubara A, Suda T, Inaba T, Honda H. Maintenance of the functional integrity of mouse hematopoiesis by EED and promotion of leukemogenesis by EED haploinsufficiency. *Sci Rep.* 査読有 2016;6:29454. doi:10.1038/srep29454.

上田健、本田浩章。ヒストン H3K36 脱メチル化酵素 FBXL10 による造血幹細胞でのエネルギー代謝亢進と白血病発症。生化学 査読有 第 88 巻第 3 号, 314-321 (2016)
doi:10.14952/SEIKAGAKU.2016.880314.

Ueda T, Nagamachi A, Takubo K, Yamasaki N, Matsui H, Kanai A, Nakata Y, Ikeda K, Konuma T, Oda H, Wolff L, Honda Z, Wu X, Helin K, Iwama A, Suda T, Inaba T, Honda H. Fbxl10 overexpression in murine hematopoietic stem cells induces leukemia involving metabolic activation and upregulation of Nsg2. Blood. 査読有 2015;125(22):3437-46. doi:10.1182/blood-2014-03-562694.

〔学会発表〕(計6件)

上田健、中田雄一郎、長町安希子、山崎憲政、金井昭教、松井啓隆、稲葉俊哉、本田浩章
EED変異体によるPRC2活性化障害の造血器腫瘍発症における役割、第89回日本生化学会大会 2016.9.25 仙台国際センター (宮城県・仙台市)

上田健、池田健一郎

ヒストン脱メチル化酵素 Fbxl10 の白血病発症における機能解析、第20回日本がん分子標的治療学会 2016.5.31 別府国際コンベンションセンター (大分県・別府市)

上田健、長町安希子、中田雄一郎、山崎憲政、稲葉俊哉、本田浩章
ヒストン脱メチル化酵素 Fbxl10 の白血病における機能解析、第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会合同大会 2015.12.1 神戸国際展示場 (兵庫県・神戸市)

上田健、長町安希子、田久保圭誉、山崎憲政、松井啓隆、金井昭教、中田雄一郎、池田健一郎、小沼貴晶、小田秀明、Linda Wolff、本田善一郎、Xudong Wu、Kristian Helin、岩間厚志、須田年生、稲葉俊哉、本田浩章
ヒストン脱メチル化酵素 Fbxl10 の脱制御による白血病発症機構の解析、第11回血液学若手研究者勉強会 麒麟塾 2015.7.11 コクヨホール (東京都・港区)

上田健、長町安希子、中田雄一郎、山崎憲政、稲葉俊哉、本田浩章
ヒストン脱メチル化酵素 Fbxl10 の MLL-AF9 白血病における遺伝子改変マウスを用いた機能解析、第76回日本血液学会 2014.11.2 大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)

上田健、長町安希子、中田雄一郎、山崎憲政、松井啓隆、本田浩章
Disease-associated EED Ile363Met mutation increases susceptibility to hematologic

malignancies、第87回日本生化学会大会 2014.10.16 国立京都国際会館 (京都府・京都市)

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 健 (UEDA, Takeshi)
近畿大学・医学部・講師
研究者番号：60585149

(2) 研究分担者

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