

平成 28 年 5 月 9 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860729

研究課題名(和文) ストレス応答に關与するヒストンメチル化の異常が造血幹細胞に与える影響

研究課題名(英文) Alteration of stress response by a histone methylation abnormality in hematopoietic stem cells

研究代表者

河原 真大 (KAWAHARA, MASAHIRO)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：80617449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、DNA損傷ストレスや低酸素ストレスに關与するとされるヒストン脱メチル化酵素KDM4Bが、白血病細胞で強発現しているという知見に基づいて、KDM4Bが白血病細胞や造血幹細胞で果たす役割について検討を行った。KDM4Bのノックダウンや、強発現は、細胞増殖やDNA損傷ストレス応答に影響を与えなかった。しかし、造血幹細胞でのKDM4Bの強発現は顆粒球への分化誘導を促進させた。これらの結果から、KDM4Bは造血分化に關与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the current study, we focused the hematological function of a histone lysine demethylase, KDM4B, that is reported to be associated with DNA-damage stress and hypoxia stress and is overexpressed in primary acute myeloid leukemia cells. Knockdown or overexpression of KDM4B did not enhance the proliferation capacity nor affect response against DNA-damage stress in leukemia cells. However, overexpression of KDM4B in hematopoietic stem cells promoted the differentiation towards granulocytes. These data suggest that KDM4B could be involved with myeloid differentiation.

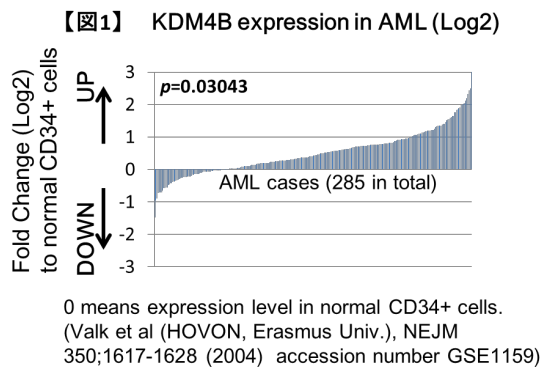
研究分野：血液腫瘍学

キーワード：造血分化 ヒストンメチル化

1. 研究開始当初の背景

ヒストンメチル化は、エピジェネティクス制御に関わる重要な機構の一つである。特にヒストン H3 のリジン残基(K4, K9, K27, K36, K79 など)のメチル化は、遺伝子の転写調節に重要で、それぞれ特異的な酵素(ヒストンリジンメチル化酵素(KMTs)と脱メチル化酵素(KDMs))で精緻に制御される。近年、次世代シーケンサーによる網羅的解析によって、急性骨髄性白血病(AML)や骨髄異形成症候群(MDS)において、これらのうちのいくつかの酵素(MLL, EZH2, NSD1 など)に変異が集中していることが判明し、AML や MDS の発症に、ヒストンメチル化の異常が強く関与することが明らかとなってきた。

KDMs の発現パターンを既存のデータベースで検索すると、AML でのヒストン脱メチル化酵素群(KDMs)の発現パターンを既報のデータベースを用いて解析すると、KDM4B が、正常 CD34+細胞と比較して有意に発現が上昇していた(図1)。



KDM4B は H3K9me2/3 (遺伝子発現を抑制するヒストン修飾)を脱メチル化する酵素である。しかし、どのような遺伝子をターゲットに機能するのは不明なままである。最近、低酸素状態で誘導される転写因子 HIF1 の標的遺伝子であることが報告され、低酸素ストレスに対する応答反応との関連が注目されている。また、H3K9me3 は、エピジェネティクス以外の機能として DNA 二重鎖切断時に DNA 修復酵素によって認識され DNA 修復の足がかりになることが最近報告された。即ち

KDM4B の発現増強により H3K9me3 が減少することで、DNA 修復の遅延が生じ、アポトーシスの誘導や遺伝子不安定性 (Genomic Instability)が高まる可能性が予想された。

以上の背景から、KDM4B が、造血細胞での様々なストレス応答に関与しており、KDM4B の発現上昇が造血器腫瘍の発症・維持に何らかの役割を果たしているのではないかと推論された。

2. 研究の目的

以上の断片的な知見から、本研究では、

- 1) 造血各分化段階での KDM4B の発現レベルを検討
 - 2) KDM4B が白血病などの造血器腫瘍細胞の維持に果たす役割の検討
 - 3) KDM4B の発現上昇が、造血幹細胞に与える影響の検討
- を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

様々な細胞で KDM4B をノックダウンしたり、強制発現したりして、主に、細胞増殖や幹細胞性(Stemness)の増強、分化障害、ストレスに対する脆弱性(細胞死、遺伝子不安定性など)を引き起こすか?について検討した。具体的には下記の方法で、これら命題の検証を行った。

KDM4B の白血病細胞における役割の検討

レンチウイルスによって shRNA を導入する手法で、様々な白血病細胞株において KDM4B をノックダウンし、定量 PCR およびウェスタンブロットング法で KDM4B の発現低下が認められる細胞株を選別した。これら細胞株を用いて、細胞増殖への影響や、DNA 損傷を与えるタイプの抗がん剤(エトポシド、アドリアマイシンなど)に対する感受性について MTS アッセイを用いた cell viability assay を中心にして検討した。

KDM4B が非腫瘍性血液細胞に与える影響

についての検討

レンチウイルスによってマウス骨髄系細胞株(32D, Baf3)に KDM4B を導入して強発現させ、細胞増殖や分化誘導、抗がん剤に対する感受性について検討した。

KDM4B の強発現は正常造血幹細胞に与える影響についての検討

正常マウスからフローサイトメーターを用いて正常造血幹細胞・前駆細胞を分取し、KDM4B の発現パターンを定量 PCR 法で確認した。さらに、正常造血幹細胞・前駆細胞にレンチウイルスで KDM4B を導入後、コロニーアッセイ法を行い、造血分化能の偏りがなくを確認した。また、コロニーアッセイ法を繰り返して植え継ぐことで、造血幹細胞のコロニー形成能力の増強の有無を確認した。さらに、コンジェニック系統マウスに移植して、造血機能の in-vivo な評価も行った。

4. 研究成果

KDM4B の白血病細胞における役割の検討

複数のヒト白血病細胞株において、KDM4B のノックダウンを行ったが、細胞増殖に有意な差を認めなかった。DNA 損傷を与える抗がん剤(エトポシドやアドリマイシンなど)で処理して生細胞率を MTS アッセイで測定したが、抗がん剤に対する感受性の亢進、低下を認めなかった。これらの結果から、白血病細胞において、KDM4B は細胞増殖や抗がん剤耐性、DNA 損傷ストレス応答などに関与していないことが示唆された。

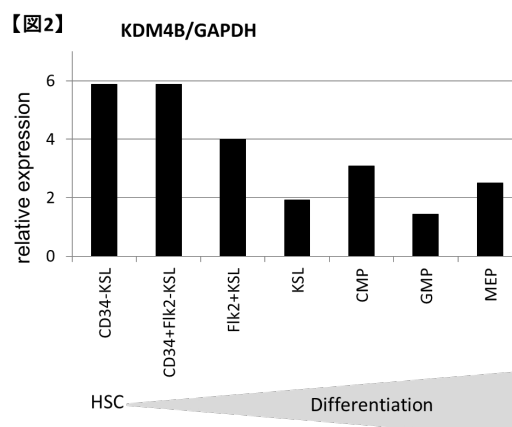
KDM4B が非腫瘍性血液細胞に与える影響についての検討

KDM4B を強発現させた非腫瘍性マウス造血細胞株 32D, BAF3 は、特に細胞増殖亢進を示さなかった。また、IL-3 に非依存性に増殖することも無かった。これらの結果は、KDM4B の強発現は、細胞増殖亢進や自律的増殖能力獲得に関与しないことが示唆された。

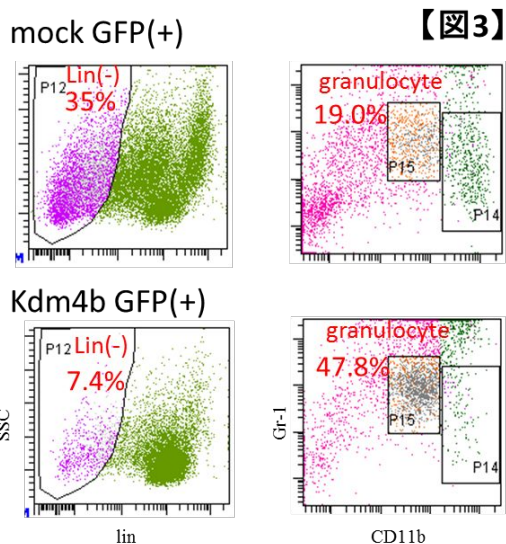
KDM4B の強発現は正常造血幹細胞に与え

る影響についての検討

まず、正常な造血細胞における KDM4B の発現分布について検討したところ、未熟な細胞ほどその発現が高いことが判明した(図2)。



次に、正常造血幹細胞に KDM4B を強発現して、IL-3, IL-6, SCF, GM-CSF, EPO のサイトカイン存在下でコロニーアッセイを行ったところ、コロニー形成能力自体には大差が無いようにみえたが、フローサイトメトリー解析で、好中球数が異常に増加し、分化マーカーを有しない未熟細胞(Lin(-)細胞)が低下した(図3)。



植え継ぎコロニーアッセイでは、コロニー形成能力の亢進を認めなかった。KDM4B を強発現させた造血幹細胞をマウスに移植して戻すと、移植したドナー細胞由来の造血が認められず、骨髄中の造血幹細胞もそのほとんどが KDM4B を強発現していない細胞のみであっ

た。

以上の結果から、当初予想していた仮説とは異なり、KDM4B は顆粒球分化を促進する働きを有している可能性が示唆された。

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 3件)

- 1) Katsurada T, Kawabata H, Kawabata D, Kawahara M, Nakabo Y, Takaori-Kondo A, Yoshida Y. A Japanese family with X-linked sideroblastic anemia affecting females and manifesting as macrocytic anemia. *Int J Hematol*. 2016 Feb 10. [Epub ahead of print] 査読有り
- 2) Shimazu Y, Shimazu Y, Hishizawa M, Hamaguchi M, Nagai Y, Sugino N, Fujii S, Kawahara M, Kadowaki N, Nishikawa H, Sakaguchi S, Takaori-Kondo A. Hypomethylation of the Treg-Specific Demethylated Region in FOXP3 Is a Hallmark of the Regulatory T-cell Subtype in Adult T-cell Leukemia. *Cancer Immunol Res*. 2016 Feb;4(2):136-45. 査読有り
- 3) Yuya Nagai †, Masahiro Kawahara †, Masakatsu Hishizawa, Yayoi Shimazu, Noriko Sugino, Sumie Fujii, Norimitsu Kadowaki and Akifumi Takaori-Kondo. († These authors equally contributed to this work.) T memory stem cells are the hierarchical apex of adult T-cell leukemia. *Blood*. 125:3527-3535 (2015) 査読有り

[学会発表](計 9件)

(国外)

- 1) Chonabayashi K, Kawahara M, Okita K, Nishizawa M, Kadowaki N, Takaori-Kondo A, Yamanaka S, and Yoshida Y. Patient-specific induced pluripotent stem

cells recapitulate the maturation defect of myelodysplastic syndromes. The 56th ASH Annual Meeting and Exposition (Dec6-9,2014) San Francisco, USA 一般演題

- 2) Sugino N, Kawahara M, Suzuki T, Nagai Y, Shimazu Y, Fujii S, Hishizawa M, and Takaori-Kondo A. The Pharmacological Inhibition of KDM1A Displays Preclinical Efficacy in AML/MDS by Inducing Myelomonocytic Differentiation. The 56th ASH Annual Meeting and Exposition (Dec6-9, 2014) San Francisco, USA 一般演題

(国内)

- 3) Ryusuke Yamamoto, Masahiro Kawahara, Yuya Nagai, Katsuyuki Ohmori, Yayoi Shimazu, Noriko Sugino, Sumie Fujii, Goichi Tatsumi and Akifumi Takaori-Kondo. Genetic and cytologic analyses about early T cell precursor acute lymphoblastic leukemia. 第77回日本血液学会学術集会, 金沢, 2015年10月
- 4) Yuya Nagai, Masahiro Kawahara, Masakatsu Hishizawa, Yayoi Shimazu, Noriko Sugino, Sumie Fujii, Ryusuke Yamamoto, Goichi Tatsumi, Norimitsu Kadowaki, Akifumi Takaori-Kondo. The hierarchy in adult T-cell leukemia that originates from T memory stem cells. 第77回日本血液学会学術集会, 金沢, 2015年10月
- 5) Noriko Sugino, Masahiro Kawahara, Akinori Kanai, Hiroataka Matsui, Goichi Tatsumi, Ryusuke Yamamoto, Yuya Nagai, Sumie Fujii, Yayoi Shimazu, Masakatsu Hishizawa, Toshiya Inaba, Takayoshi Suzuki, Akifumi Takaori-Kondo. LSD1 regulates myeloid differentiation via

affecting the enhancer activity of GF11.
第 77 回日本血液学会学術集会, 金沢, 2015
年 10 月

6) Kazuhisa Chonabayashi, Masahiro
Kawahara, Masatoshi Nishizawa, Akifumi
Takaori-Kondo, Shinya Yamanaka, Yoshinori
Yoshida. Generation of engraftable
leukemic stem cells from iPS cells derived
from a secondary AML patient. 第 77 回日
本血液学会学術集会, 金沢, 2015 年 10 月

7) Yayoi Shimazu, Yutaka Shimazu,
Masakatsu Hishizawa, Masahide Hamaguchi,
Yuya Nagai, Noriko Sugino, Sumie Fujii,
Masahiro Kawahara, Norimitsu Kadowaki,
Hiroyoshi Nishikawa, Shimon Sakaguchi,
Akifumi Takaori-Kondo. Hypomethylation of
the TSDR is a hallmark of the Treg subtype
in adult T-cell leukemia. 第 77 回日本血
液学会学術集会, 金沢, 2015 年 10 月

8) Noriko Sugino, Masahiro Kawahara,
Takayoshi Suzuki, Sumie Fujii, Yuya
Nagai, Yayoi Shimazu, Masakatsu Hishizawa,
and Akifumi Takaori-Kondo. KDM1A is a
promising therapeutic target of
myelodysplastic syndromes. 第 76 回日本血
液学会学術集会, 大阪, 2014 年 10 月

9) Kazuhisa Chonabayashi, Masahiro
Kawahara, Keisuke Okita, Masatoshi
Nishizawa, Norimitsu Kadowaki, Akifumi
Takaori-Kondo, Shinya Yamanaka, and
Yoshinori Yoshida. iPS technology revealed
the genetic and functional diversity
present in a single MDS patient. 第 76 回
日本血液学会学術集会大阪, 2014 年 10 月

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ninai-sums.jp/study/hematology>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河原 真大 (KAWAHARA MASAHIRO)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号: 80617449

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし