

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893036

研究課題名(和文)造血器腫瘍における核内チロシンキナーゼによるエピジェネティック制御機構の解明

研究課題名(英文) Role of epigenetic regulation by nuclear tyrosine kinases in hematologic malignancies

研究代表者

青山 和正 (Aoyama, Kazumasa)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・特任研究員

研究者番号：50734266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：Abl チロシンリン酸化酵素の恒常活性型変異は慢性骨髄性白血病(CML)の原因となる。我々は、Ablによるチロシンリン酸化が、グローバルヒストン脱アセチル化を伴い、ヒストン脱アセチル化酵素1を安定化させることを見出した。また、JAK2 チロシンリン酸化酵素の恒常活性型変異体JAK2V617Fは骨髄増殖性腫瘍(MPN)患者で見られるが、JAK2V617Fがポリコム抑制複合体2と協調して、ヒストンH3リジン27トリメチル化やアセチル化を制御することが分かった。以上で示したチロシンリン酸化酵素によるヒストン修飾制御がCMLやMPNにおいて重要な役割を担っているものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：A constitutively active mutant of Abl tyrosine kinase causes chronic myelogenous leukemia (CML). In this study, we showed that Abl-mediated tyrosine phosphorylation leads to stabilization of histone deacetylase 1 accompanied by global histone deacetylations. Furthermore, we demonstrated that JAK2V617F, which is a constitutively active mutant of JAK2 tyrosine kinase and is found in patients with myeloproliferative neoplasms (MPN), cooperates with polycomb repressive complex2 in regulation of histone H3 lysine27 trimethylation. These results suggest that tyrosine kinases-regulated histone modifications plays an important role in CML and MPN.

研究分野：分子生物学

キーワード：エピジェネティクス 癌 チロシンキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

ヒストン修飾は、クロマチン構造変換や遺伝子発現を制御するエピジェネティック制御機構の一つである。例えば、クロマチン凝縮、遺伝子発現抑制系の H3 リジン 9 トリメチル化 (H3K9me3) やクロマチン脱凝縮、遺伝子発現活性化系の H3K4me3 やヒストン H4 リジン 16 アセチル化 (H4K16ac) などが知られている (Jenuwein and Allis, *Science*, 293: 1074, 2001)。ヒストン修飾の異常は癌や生活習慣病などの疾患で見られ、研究が盛んに行われている。しかしながら、ヒストン修飾を制御するシグナル伝達に関しては、未だ十分に解明されていない。

がん原遺伝子産物 c-Abl は、あらゆる細胞に発現している非受容体型チロシンキナーゼである。c-Abl は、細胞質で細胞増殖・分化・接着など様々なイベントに関わる重要なシグナル伝達分子である (Sirvent A et al., *Biol Cell* 100: 617, 2008)。c-Abl は、酵素活性部位であるタンパク質チロシンキナーゼドメインの他に、核移行シグナル、核排出シグナルをもち、核内外を行き来することも知られていた (Taagepera S et al., *PNAS* 95: 7457, 1998)。しかしながら、核内での機能は十分に解析されていなかった。このような中、我々は核内 c-Abl がグローバルなクロマチン構造変換を伴う H4K16ac の低下や H3K9me3 の亢進などのヒストン修飾変化を誘導することを明らかにした (Aoyama K et al., *Exp Cell Res*, 2011)。さらに、我々は、核内 c-Abl が、核内に束状 F-actin を形成する機能を持つ事を示した (Aoyama K et al., *Exp Cell Res*, 2013)。核内 c-Abl に形成された核内束状 F-actin アクチンフィラメントは、凝縮されたクロマチン領域に形成されており、クロマチン構造変換やヒストン修飾に関わる可能性が考えられた。しかし、このヒストン修飾制御の分子メカニズムは解明できていなかった。また、c-Abl の恒常活性型変異体である Bcr-Abl は慢性骨髄性白血病の原因遺伝子であり、c-Abl と同様に核移行シグナルを有し核内にも存在することが知られている (Dierov J et al., *Cancer cell* 5: 275, 2004)。

JAK2 非受容体型チロシンキナーゼの恒常活性型変異体である JAK2V617F が多くの骨髄増殖性腫瘍患者で高頻度に認められている (James C et al., *Nature* 1144: 434, 2005)。JAK2V617F も細胞質のシグナル伝達分子として知られているが、核内にも存在する。核内では、直接ヒストン H3 チロシン 41 をリン酸化 (H3Y41ph) し、エピジェネティックスへの関与が示されている (Dawson MA et al., *Nature* 461: 819, 2009)。

2. 研究の目的

上記の背景を考えると、核内チロシンキナーゼによるエピジェネティック制御が、慢性骨髄性白血病や骨髄増殖性腫瘍などの造血

器腫瘍に関わる可能性が考えられる。しかしながら、チロシンキナーゼの活性型変異は、細胞質の過剰なシグナル伝達を誘起することで、がん化を引き起こすと考えられており、核内のチロシンキナーゼはあまり研究されていない。そこで本研究においては、核内チロシンキナーゼによるエピジェネティック制御と造血器腫瘍との関連を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 核移行型 c-Abl 発現細胞から免疫沈降法でチロシンリン酸化タンパク質を精製し、質量分析により核移行型 c-Abl 発現細胞に特異的なチロシンリン酸化タンパク質を既に同定した。この質量分析の結果や、タンパク質翻訳後修飾データベース Phosphosite plus を参考にして、エピジェネティック制御に関わる核内チロシンリン酸化基質を予測した。質量分析の結果を検証するため、予測した核内基質候補タンパク質の特異抗体を用いて免疫沈降し、チロシンリン酸化を検出した。

(2) c-Abl の核内基質分子のリン酸化部位を予測し、非リン酸化型変異体(YF 変異体)を作製し、リン酸化の機能を調べた。

(3) JAK2V617F トランスジェニックマウスの造血幹・前駆細胞における遺伝子発現を調べるため、RNA シークエンス (RNA-seq) を行った。

(4) 骨髄増殖性腫瘍患者で機能低下変異が認められるポリコム抑制複合体 2 (PRC2) の酵素コンポーネント Ezh2 ノックアウトマウスと JAK2V617F トランスジェニックマウスを交配した。完成したコンパウンドマウスの造血幹・前駆細胞において、ChIP シークエンス (ChIP-seq) によるエピゲノム解析を行った。

4. 研究成果

(1) 質量分析の結果や、タンパク質翻訳後修飾データベース Phosphosite plus から、複数の核内タンパク質を選択し、c-Abl によりチロシンリン酸化されることを確認した。中でも、Histone deacetylase 1 (HDAC1) は、c-Abl の強制発現により、強力にチロシンリン酸化され、さらにプロテアソーム依存的なタンパク質分解から保護されることがわかった。今回は示すことができなかったが、この HDAC1 の安定化機構が恒常活性化型 Bcr-Abl による慢性骨髄性白血病に寄与するかどうか大変興味深い。

(2) HDAC1 のチロシンリン酸化部位を同定するために多数の YF 変異体を作製したが、安定化に関わるチロシンリン酸化部位は同定できなかった。HDAC1 の安定化に関わる他の基質が存在すると考えられる。我々は以前に、核内 c-Abl が核内束状 F-actin を形成することを報告している (Aoyama K et al., *Exp Cell Res*, 2013)。また、核内 F-アク

チンに関しては未解明な部分が多いが、転写に関わる事 (Percipalle P, Nucleus 4: 43, 2013; Baarlink et al., Science 340: 864, 2013) や、HDAC1 を含むヒストンリモデリング因子と結合する可能性が示されている (Andrin et al., J.Biol. Chem. 279, 25017, 2004)。これらを考え合わせると、核内 c-Abl は、核内 F-actin の形成を介して、HDAC1 の安定化に寄与している可能性も考えられた。

(3) JAK2V617F トランスジェニックマウスの造血幹前駆細胞において、RNA-seq を行い、PRC2 標的遺伝子の発現が脱抑制していることが分かった。ここから、JAK2V617F と PRC2 が協調的に遺伝子発現を制御している可能性が考えられた。

(4) JAK2V617F トランスジェニックと Ezh2 ノックアウトのコンパウンドマウスは、骨髄線維症様の病態を呈した。造血幹・前駆細胞において、PRC2 が触媒する H3K27me3 の ChIP-seq を行ったところ、がん遺伝子 Hmga2 領域で脱抑制を意味する H3K27me3 レベルの低下減少が認められた。さらに興味深いことに、Hmga2 の脱抑制は H3K27ac の亢進を伴っており、プロモドメイン阻害剤は Hmga2 の脱抑制と骨髄線維症様病態を抑制した。核内 JAK2V617F が直接触媒する H3Y41ph も ChIP-seq で解析するため、H3Y41ph 特異抗体の作製を試みた。計 66 クローン作製したが、ChIP で使用可能なクローンを得ることができなかった。H3Y41ph の ChIP grade の抗体作製に成功し、ChIP-seq を行うことで、エピジェネティック制御における JAK2V617F の役割がより明らかになると考えられる。特に今回行った H3K27me3 や H3K27ac との関係性は大変興味深い。

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)

全て査読有り

Sashida G, Wang C, Tomioka T, Oshima M, Aoyama K, Kanai A, Mochizuki-Kashio M, Harada H, Shimoda K, Iwama A. The loss of Ezh2 drives the pathogenesis of myelofibrosis and sensitizes tumor-initiating cells to bromodomain inhibition. *J Exp Med*. 2016 in press
Yamaguchi N, Yuki R, Kubota S, Aoyama K, Kuga T, Hashimoto Y, Tomonaga T, Yamaguchi N. c-Abl-mediated tyrosine phosphorylation of JunB is required for Adriamycin-induced expression of p21. *Biochem J*. 2015 Oct

1;471(1):67-77.

Mochizuki-Kashio M, Aoyama K, Sashida G, Oshima M, Tomioka T, Muto T, Wang C, Iwama A. Ezh2 loss in hematopoietic stem cells predisposes mice to develop heterogeneous malignancies in an Ezh1-dependent manner.

Blood. 2015 Sep 3;126(10):1172-83.

Yuki R, Aoyama K, Kubota S, Yamaguchi N, Kubota S, Hasegawa H, Morii M, Huang X, Liu K, Williams R, Fukuda MN, Yamaguchi N. Overexpression of zinc-finger protein 777 (ZNF777) inhibits proliferation at low cell density through down-regulation of FAM129A. *J Cell Biochem*. 2015 Jun;116(6):954-68.

Kubota S, Morii M, Yuki R, Yamaguchi N, Yamaguchi H, Aoyama K, Kuga T, Tomonaga T, Yamaguchi N. Role for Tyrosine Phosphorylation of A-kinase Anchoring Protein 8 (AKAP8) in Its Dissociation from Chromatin and the Nuclear Matrix. *J Biol Chem*. 2015 Apr 24;290(17):10891-904.

Aoyama K, Yamaguchi N, Yuki R, Morii M, Kubota S, Hirata K, Abe K, Honda T, Kuga T, Hashimoto Y, Tomonaga T, Yamaguchi N. c-Abl induces stabilization of histone deacetylase 1 (HDAC1) in a kinase activity-dependent manner.

Cell Biol Int. 2015 Apr;39(4):446-56..

Kameda T, Shide K, Yamaji T, Kamiunten A, Sekine M, Taniguchi Y, Hidaka T, Kubuki Y, Shimoda H, Marutsuka K, Sashida G, Aoyama K, Yoshimitsu M, Harada T, Abe H, Miike T, Iwakiri H, Tahara Y, Sueta M, Yamamoto S, Hasuike S, Nagata K, Iwama A, Kitanaka A, Shimoda K. Loss of TET2 has dual roles in murine myeloproliferative neoplasms: disease sustainer and disease accelerator. *Blood*. 2015 Jan 8;125(2):304-15.

[学会発表](計 33 件)

青山 和正, 望月(櫻尾) 牧子, 大島 基彦, 小出 周平, 指田 吾郎, 岩間 厚志 ヒストンメチル基転移酵素 Ezh2 欠損造血幹細胞における Ezh1 の役割 BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会) 2015 年 12 月 1-4 日 (神戸ポートアイランド、神戸)

Aoyama K, Mochizuki-Kashio M, Oshima M, Koide S, Iwama A. Role of Ezh1 in hematopoietic malignancies

induced by Ezh2 insufficiency.
JSPS-NUS Joint Symposium “New
Horizons in Normal and Cancer Stem
Cell Research”2016.1.15 (Singapore,
Singapore)

Morii, M., Kubota, S., Honda, T.,
Aoyama, K., Yuki, R., Kometani, S.,
Yamaguchi, N.-t., and Yamaguchi, N.
Search for a tyrosine-phosphorylated
protein involved in Src-mediated
antiapoptosis. The 2016 Gordon
Research Seminar on DNA Damage,
Mutation and Cancer, 2016.3.13-16
(Ventura, California, U.S.A.)

他、連名で 30 回

6 . 研究組織

(1)研究代表者

青山 和正 (AOYAMA Kazumasa)

千葉大学・大学院医学研究院・特任研究員

研究者番号：50734266

(2)研究分担者

なし

研究者番号：

(3)連携研究者

なし

研究者番号：