

# 若年性骨髄単球性白血病におけるヒストン修飾による遺伝子発現制御の解析に関する研究

名古屋大学医学部附属病院

小児科

医員

若松 学

名古屋大学医学部附属病院

小児科

教授

高橋 義行

講師

村松 秀城

医員

北澤 宏展

ゲノム医療センター

病院講師

奥野 友介

## 1. 研究の背景・目的

若年性骨髄単球性白血病 (juvenile myelomonocytic leukemia; JMML) は、本邦において年間 20-30 例程度が発症するまれな小児がんである。通常の化学療法では十分な治療効果が得られず、唯一の根治療法として同種造血細胞移植が行われる。しかしながら、造血細胞移植の前処置、移植後の合併症、再発などの問題から JMML 患者における 5 年生存率は、未だ 50%前後にとどまり、造血細胞移植に代わる有効な分子標的薬の導入が望まれている。

JMML では、遺伝子発現制御に関わる遺伝子プロモーター領域の CpG アイランドにおけるシトシンのメチル化に異常をきたした「高メチル化群」が存在し、高メチル化群はそうでない患者よりも予後が悪いことが報告されており、エピジェネティック異常が発がんおよび病状進展に寄与している疾患であると考えられている。<sup>1,2,3</sup>

これまで、臨床検体を用いた網羅的なエピジェネティック解析は、上記の DNA シトシンメチル化解析以外については極めて困難であったが、近年のクロマチン免疫沈降法 (chromatin immunoprecipitation: ChIP) と次世代シーケンス技術を組み合わせたクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq) の技術開発により、臨床検体においてもヒストン修飾の網羅的な評価が可能となり、診断やエピゲノム異常を修復する治療薬への臨床応用が進んでいる。

クロマチンは、ヒストンとそれに巻き付く DNA から構成される。このヒストンがアセチル化、メチル化、リン酸化やユビキチン化などの様々な化学修飾を受けることでクロマチン構造が変化し、遺伝子発現の制御が行われる。ヒストン修飾のうち、遺伝子発現の活性

化に関与するアセチル化修飾を受けたヒストンが結合する領域がエンハンサーに相当する。このエンハンサー領域のクラスターをスーパーエンハンサーと呼び、重要な遺伝子の近傍で遺伝子の発現調節を行っている。本研究では、ChIP-seq を用いて、JMML におけるヒストン修飾による遺伝子発現制御の解析を行った。

## 2. 研究の対象ならびに方法

当科で保存細胞が存在する患者のうち、JMML 患者 3 例、およびヌーナン症候群関連骨髄増殖性疾患 (NS/MPD) の患者 2 例を対象とし、ChIP-seq を行った。各々の患者の単核球保存細胞を用いて、はじめにヒストンと DNA の架橋を行い、ホルムアルデヒドで細胞を固定した。その後、速やかに細胞を溶解し、超音波破碎装置を用いておよそ 200-500 塩基にピークを認めるように、クロマチンを切断した。切断したクロマチンを、H3K27ac 抗体と混合し、免疫沈降を行った。この際、免疫沈降していないサンプル、およびウサギ IgG 抗体で免疫沈降したサンプルを同時にコントロールとして準備した。免疫沈降後に脱架橋し、抽出した DNA をもとにシーケンス用のライブラリ調整し、次世代シーケンサーで解析した。

データ解析は、当科で以前に構築した解析パイプラインを用い、クオリティチェック後に、出力した DNA 断片を全ゲノムにマッピングし、H3K27ac のヒストン修飾がエンリッチした領域を抽出し、既存の登録されたデータベースと比較した。<sup>4</sup>

## 3. 研究結果

JMML、およびコントロールとしてヌーナン症候群関連骨髄増殖性疾患の患者サンプルをそれぞれ、3 例、2 例を使用して H3K27ac 抗体による免疫沈降を行い、得られたシーケンスデータを基に、H3K27ac 抗体が結合する領域をサンプルごとに抽出した。解析にあたり、既知の H3K27ac 抗体の結合領域と比較を行った。JMML で共通して認める、14490 個の H3K27ac 抗体の結合領域を同定した。これらの H3K27ac 抗体の結合領域を (1) JMML のみ、(2) NS/MPD のみ、(3) 両者で共通する領域の 3 群に分類した。また、H3K27ac 抗体の結合領域とその近傍に位置する遺伝子の mRNA 発現レベルについて評価したところ、変化のなかった H3K27ac 近傍の遺伝子と比較し発現の上昇を認めた。

## 4. 考察

我々は、患者サンプルを用いて、JMML におけるヒストン修飾が及ぼす遺伝子発現の制御の検討を行った。本研究では、症例数は限られるものの、遺伝子発現の制御に関与すると考えられる領域の候補を抽出した。今後は、症例数を増やして解析を進める予定であ

る。

5. 文献

1. Lipka DB, Witte T, Toth R, Yang J, Wiesenfarth M, Nollke P, et al. RAS-pathway mutation patterns define epigenetic subclasses in juvenile myelomonocytic leukemia. *Nat Commun* 2017; 8:2126.
2. Murakami N, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Nagae G, Suzuki K, et al. Integrated molecular profiling of juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood* 2018; 131:1576-86.
3. Stieglitz E, Mazor T, Olshen AB, Geng H, Gelston LC, Akutagawa J, et al. Genome-wide DNA methylation is predictive of outcome in juvenile myelomonocytic leukemia. *Nat Commun* 2017; 8:2127.
4. Hnisz D, Abraham BJ, Lee TI, Lau A, Saint-Andre V, Sigova AA, et al. Super-enhancers in the control of cell identity and disease. *Cell* 2013; 155:934-47.

6. 論文発表

第 62 回米国血液学会議/米国・サンディエゴ/December 5-8, 2020 (予定)