

論文の内容の要旨

論文題目 骨髄系腫瘍における DNA ヒドロキシメチル化異常に関する研究

氏名 遠山 和博

背景

エピジェネティック修飾には大きく DNA メチル化とヒストン修飾があるが、両者ともに組織特異的な遺伝子発現制御の重要な役割を果たし、細胞分化や発生にも強く関わっている。DNA メチル化異常はさまざまな遺伝子の発現制御異常を伴い、腫瘍発生と関連している可能性が示唆されており、造血器腫瘍の一つである骨髄系腫瘍においても DNA メチル化異常が数多く報告されている。骨髄異形成症候群ではプロモーター部位の DNA メチル化増加が急性骨髄性白血病への進展や予後不良と関係しているとされており、脱メチル化剤の臨床応用も始まっている。急性骨髄性白血病（AML）においてはその遺伝子変異プロファイルに特徴的な DNA メチル化パターンがあることが報告されてきているものの、DNA メチル化異常と骨髄系腫瘍発生の詳細な機序については未だ明らかになっていない。

DNA 脱メチル化の機序は、2009 年に TET (ten-eleven translocation) ファミリータンパクがメチル化シトシンをヒドロキシメチル化シトシンに変換することが報告されて以降、急速に知見が広がり、現在では TET ファミリータンパクによる変換によりいくつかの中間段階を経て非メチル化シトシンになる経路がわかっている。TET ファミリータンパクによる脱メチル化作用の発見と並行して、骨髄系腫瘍では高頻度に TET2 変異があることが報告され、ミスセンス変異が酵素ドメインに集中する変異パターンや、造血細胞における TET2 コンディショナルノックアウトマウスの解析から、TET2 は機能喪失型の変異による骨髄系腫瘍原性があることが示唆されている。さらに、骨髄系腫瘍において TET2 変異と相互排他的にみられる IDH1 もしくは IDH2 のホットスポット変異が、代謝産物の 2-ヒドロキシグルタル酸の増加を介して、TET2 の酵素活性に抑制的に働くことから、DNA 脱メチル化関連

遺伝子異常による骨髄系腫瘍原性が示唆されている。この DNA 脱メチル化異常による骨髄系腫瘍原性の機序は、DNA メチル化異常と同様に詳細は明らかになっていない。

DNA 脱メチル化異常と腫瘍発生の関係を解明するためには、能動的脱メチル化過程の指標になるゲノム上の 5-ヒドロキシメチルシトシン (5-hydroxymethylcytosine: 5hmC) の局在を明らかにすることが必要であると考えられたが、既存の方法では 5hmC と 5-メチルシトシン (5-methylcytosine: 5mC) を原理的に区別することができない、もしくは、一塩基レベルでの解析をすることはできないという技術的な問題があった。2012 年に報告された Tet-Assisted Bisulfite Sequencing (TAB-seq) と呼ばれる 5hmC ゲノムマッピングの方法は β -グルコシルトランスフェラーゼによるグルコシル化で 5hmC を保護した後、TET 酵素処理を行うことで、5hmC のみがバイサルファイト法によりシトシンとして区別できるという系である。これにより 5hmC の局在と定量をゲノムワイドかつ一塩基の解像度で実現可能であると考えられた。

近年ヒト ES 細胞では 5hmC が遺伝子活性化に関わるエンハンサーに多く局在していることが報告されており、DNA 脱メチル化異常と腫瘍発生の関係を調べるためには、プロモーター部位や CpG island のみならず、その周辺や遠位部も含めた解析が必要になると考えられた。バイサルファイト法を用いたビーズアレイ解析である HumanMethylation450 BeadChip (Illumina 社、Infinium450K) は解析の対象となる CpG サイトが遺伝子全体の領域に広く設定され、CpG island のみならずその周辺領域にも (CpG shore、CpG island) 広くプローブが設計されており、DNA 脱メチル化異常と腫瘍発生のメカニズムを解析する手段としては最適なプラットフォームと考えられた。

以上から、我々は、一塩基レベルの解像度で 5hmC のゲノムマッピングが可能になる TAB-seq の技術を、Infinium450K に応用することで、急性骨髄性白血病の解析を試みた。

目的

これまでにバイサルファイト法を用いたビーズアレイ解析と TAB-seq で用いられた一塩基レベルでの解像度による DNA ヒドロキシメチル化解析は行われておらず、我々はこの系を "Tet-assisted bisulfite epigenotyping with BeadChip (TAB-chip)" と名付けた。その解析系を用いて TET2、IDH1 および IDH2 遺伝子変異を有する白血病細胞の DNA ヒドロキシメチル化

解析を行うことで、これまでに明らかになっていない DNA 脱メチル化によるエピジェネティック制御機構と骨髄系腫瘍形成の関係を解明することを目的に研究を行った。

ビーズアレイ法を用いた DNA ヒドロキシメチル化解析系の確立

初めに TAB-chip に使用する各種酵素による変換効率を、既存の TAB-seq の系を用いることで検証したところ、解析に十分と考えられる変換効率を得られていることが確認できた。次に我々は H1 ヒト胚性幹細胞のゲノム DNA をサンプルとして、既存の TAB-seq や hMeDIP-seq で得られた 5hmC 解析データと TAB-chip で得られた 5hmC 解析データを比較した。TAB-chip による解析が既存の解析法と相関が得られていることが示され、TAB-chip が 5hmC 検出法として十分使用できることが確認できた。

急性骨髄性白血病症例における脱メチル化解析

TAB-chip の系を用いて TET2 遺伝子変異のある AML 症例 10 例、IDH1/2 遺伝子変異のある AML 症例 8 例、およびそのどちらの変異もない AML 症例 9 例の DNA ヒドロキシメチル化をゲノムワイドに解析した。TET2 もしくは IDH1/2 の遺伝子変異のある症例群はそれらの遺伝子変異のない症例群と比べて DNA ヒドロキシメチル化の低下、DNA メチル化の増加している傾向が見られた。DNA ヒドロキシメチル化の低下および DNA メチル化の増加が起こっているシトシン-リン酸-グアニン（以下、CpG）ジヌクレオチドのゲノム上の部位を解析すると、CpG アイランドや転写開始点から比較的離れた部位でその存在割合が高いことが分かった。また、クロマチン修飾との関係を見ると、エンハンサー部位においてその存在割合が高く、TET2 変異や IDH1/2 変異による脱メチル化異常がエンハンサー部位でより顕著にみられることが確認できた。

TET2 もしくは IDH1/2 の遺伝子変異のある症例群で DNA ヒドロキシメチル化の低下および DNA メチル化の増加が起こっている CpG と関連付けられた遺伝子の総数は、TET2 変異群で 301 個、IDH1/2 変異群で 4177 個であった。興味深いことに、TET2 変異群で抽出された遺伝子のうち、そのほとんど（281 遺伝子/301 遺伝子、93.4%）が IDH1/2 変異群でも抽出されてきた遺伝子であった。この共通の遺伝子 281 個について遺伝子オントロジーで解析を行った結果、アポトーシス関連遺伝子、シグナル伝達経路関連遺伝子が濃縮していることがわかった。

結語

我々は、合成 TET タンパクによる酵素反応とビーズアレイ法を併用することで、一塩基レベルでの DNA ヒドロキシメチル化を効率よく検出できる系を確立した。

脱メチル化関連遺伝子変異をもつ AML 症例群の DNA ヒドロキシメチル化をゲノムワイドに解析することにより、それらの遺伝子変異による脱メチル化異常がエンハンサー部位でより起こりやすいことを示した。また、脱メチル化異常の起こる標的遺伝子の解析により、脱メチル化異常が骨髄系腫瘍原性を持つ機序として、アポトーシス関連遺伝子、シグナル伝達経路関連遺伝子などの機能異常が深く関与している可能性が示唆された。