

【要約】

Possible role of intragenic DNA hypermethylation in gene silencing of the
tumor suppressor gene *NR4A3* in acute myeloid leukemia

(急性骨髄性白血病におけるがん抑制遺伝子 *NR4A3* 発現抑制に対する遺伝子内
高メチル化の関与)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻 細胞治療内科学

(主任：横手 幸太郎教授)

清水 亮

【背景・目的】

NR4A3 は NR4A ファミリーに属するリガンドが不明な核内受容体で、その機能は多岐に渡り、代謝、腫瘍形成、アポトーシス、DNA 修復、炎症など様々な生体反応との関連が報告されている。腫瘍形成においては造血器疾患に加えて、悪性黒色腫、乳癌、神経芽腫、Ewing 肉腫、肝癌など様々な癌で関連が指摘され、一部の癌ではがん抑制遺伝子として機能している可能性が示唆されている。造血器疾患においては、急性骨髄性白血病 (AML) において *NR4A3* の発現は核型異常と関係なく低下していることが報告されており、*Nr4a1/Nr4a3* 欠損マウスは生後早期に AML を発症し死亡する。さらにこのマウスの AML 細胞において *Nr4a3* を過剰発現すると AML 発症を抑制できることが報告されている。このことは *NR4A* が AML においてがん抑制遺伝子として機能し、白血病の病態形成において重要な役割を担っていることを示唆している。したがって AML における *NR4A3* の転写再活性化は、広範な抗腫瘍スペクトラムを伴った新規治療薬へつながる可能性があると考えられる。しかし現在までのところ AML において *NR4A3* の発現が低下している原因については明らかにされていない。

悪性腫瘍における遺伝子発現異常の原因としては、DNA メチル化異常などのエピジェネティック異常が注目されている。中でもプロモーター領域のメチル化異常はよく知られたエピジェネティック異常であり、例えば *MLH1* や *p16* などのがん抑制遺伝子ではプロモーター領域の高メチル化によりその発現が低下している。また最近ではプロモーター領域とともに遺伝子内高メチル化領域が腫瘍形成に関与する報告もみられ、それに加えて遺伝子内のメチル化が遺伝子発現の間に正と負の両方の相関があるとする報告も散見される。現在までのところ機能喪失型変異の報告がないことも考慮し、AML における *NR4A3* の発現低下に DNA メチル化異常が関与していると仮説を立て、本研究を行った。

【方法】

健常成人より採取した CD34 陽性単核球細胞と 10 個の白血病細胞株における *NR4A3* の発現量を qPCR により測定し、比較した。ヒトにおける *NR4A3* のがん抑制遺伝子としての機能解析は十分になされていないことから、白血病細胞株において *NR4A3* 過剰発現株を作製し、growth curve および colony forming assay により増殖能を評価し、ヒト白血病における *NR4A3* のがん抑制遺伝子としての機能を解析した。次に bisulfite sequence 法により白血病細胞株および AML 患者白血病細胞における DNA 高メチル化領域の同定を試みた。さらに白血病細胞株および AML 患者白血病細胞を *in vitro* で培養し、そこに DNA メチル化阻害薬である decitabine (DAC) を添加して DNA 脱メチル化と NR4A3 脱抑制の相関を評価した。

【結果】

すべての細胞株で NR4A3 の発現は健常成人における CD34 陽性単核球細胞のものと比較し有意に低下していた。続いて 3 つの AML 細胞株 (Kasumi-1、THP-1、MOLM-13) を用いて過剰発現株を作製した。これらの細胞株で過剰発現がなされていることは qPCR および

ウエスタンブロットにおいて確認した。過剰発現株ではいずれの細胞株においても細胞増殖能の抑制およびコロニー数の減少が認められ、これらの結果よりヒトにおいても *NR4A3* は AML においてがん抑制遺伝子としての機能を有することが示唆された。

次に *NR4A3* における DNA 高メチル化領域を探索するために bisulfite sequence を行った。まず初めにプロモーター領域について解析したが、プロモーター領域では高メチル化領域は認めなかった。そこで遺伝子内領域に着目してさらに DNA 高メチル化領域の同定を行った。Exon3 およびその近傍領域において、白血病細胞株である NB4、HL60、Kasumi-1 および THP-1 では高メチル化が認められた。MOLM-13 についてもメチル化は認められたがそのメチル化の程度は軽度であった。

今回同定した高メチル化領域が発現低下と関連があるかを調べるためにメチル化阻害薬である DAC を用いて解析を行った。白血病細胞株に DAC を投与することにより高メチル化領域は脱メチル化しており、それに伴い *NR4A3* の脱抑制が認められた。この結果から白血病細胞株では *NR4A3* の発現低下に exon3 およびその近傍領域における高メチル化が関与している可能性が示唆された。

そこで白血病細胞株で得られたデータが、患者白血病細胞でも同様に認められるかを調べるために患者検体(4 検体)を用いて白血病細胞株と同様の実験を行った。はじめに患者サンプルの発現量を測定してみると、白血病細胞株と同様に健常成人コントロールと比較して *NR4A3* の発現量は有意に低下していた。続いて患者検体においても DNA 高メチル化領域を検索してみると、白血病細胞株と同様の exon3 およびその近傍領域に高メチル化領域が認められた。患者検体に DAC を添加すると高メチル化領域において脱メチル化が起きるとともに *NR4A3* の脱抑制が認められ、患者サンプルにおいても遺伝子内高メチル化領域が *NR4A3* の発現低下に関与している可能性が示唆された。

【考察】

大腸がん細胞株を用いた遺伝子内高メチル化部位に関する詳細な解析にて、メチル化と発現が負の相関を示す遺伝子群では腫瘍細胞での遺伝子内高メチル化領域は非腫瘍細胞での H3K4me1 や H2A.Z のピークと一致する遺伝子が多いと報告されている。Yang らは、特にメチル化阻害薬投与終了後も脱メチル化が長時間にわたって維持された遺伝子群の中で、メチル化と発現量に負の相関を示した遺伝子群において、腫瘍細胞の gene body のメチル化部位と正常細胞の H3K4me 1 ならびに H2A.Z のピークが一致する遺伝子が多かったと報告している。このことから、発現の低下と相関している遺伝子内 DNA メチル化領域が、alternative promoter や enhancer として機能していることが示唆される。

そこで、我々も高メチル化を同定した exon3 およびその周囲の領域に関して、その他のエピジェネティック制御に関わる因子との関連を ChIP-sequence のデータ-ベースである ENCODE のデータ-ベースを用いて検討した。先の報告と同様に *NR4A3* の exon3 およびその近傍領域では非腫瘍細胞であるヒト乳腺上皮細胞や単球では、H3K4me1 や H2A.Z のピークが認められるのに対し、白血病細胞株である K562 では認められなかった。さらに、

H3K4me1 はエンハンサーに、H2A.Z はエンハンサーやプロモーターに認められるが、active enhancer に認められる H3K27ac が非腫瘍細胞、白血病細胞株とも認められないのに対し、H3K4me3 のピークは非腫瘍細胞で認められ、腫瘍細胞では認めなかった。これらの結果を考えると、*NR4A3* の exon3 およびその近傍領域が alternative promoter など *NR4A3* の転写制御に関わる機能的配列を有している可能性、ならびに AML では同部位の高メチル化によりその機能が抑制され、転写不活性化に至っている可能性が示唆された。今回我々の研究において *NR4A3* の発現低下に関して遺伝子内の高メチル化の関与を示したが、高メチル化が *NR4A3* 発現低下の唯一の機序でない可能性がある。例えば、*RUNX1* 変異をもつ家族性血小板異常症では、造血前駆細胞において *NR4A3* は *RUNX1* の target gene であり、発現が抑制されている。また AML においてヒストン脱アセチル化酵素である entinostat 投与でも *NR4A3* の脱抑制効果が認められる。原発性骨髄線維症において *NR4A3* の発現抑制に関与する miRNA が存在するなどの報告が散見される。これらの結果は AML において *NR4A3* の発現を完全に再活性化するためには脱メチル化治療のみでは不十分である可能性が考えられる。

【結論】

AML における *NR4A3* 発現低下の機序として、遺伝子内 DNA 高メチル化の関与が示唆された。*NR4A3* 発現の再活性化は、有望な治療戦略であり、今後さらなる *NR4A3* 発現抑制機序の解明が必要である。