

ヒストン異常による血液がんの発症機序の探索

金子 千尋 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 千葉 滋 (筑波大学 医学医療系)

【背景】

ヒストンとは、ヒトをはじめとする真核生物の細胞内において、ゲノム DNA を折り畳み、クロマチンを構成するタンパク質である。クロマチンは大量のゲノム DNA を核内に収納するほか、構造変化によって DNA の露出領域を変え、転写因子や種々の酵素などの DNA への近づきやすさを調整することにより、転写、DNA 複製、DNA 修復等を制御する。ヒストンはこのクロマチンの構造変化に寄与し、エピジェネティックな真核生物の発生や成長の制御、恒常性の維持に重要な役割を果たす。

ヒストンは 4 種のコアヒストンと 1 種のリンカーヒストン H1 に分類される。コアヒストン H2A、H2B、H3、H4 は各 2 分子からなるヒストン八量体を構成し、その周りをらせん状に巻き付く DNA と共に、ヌクレオソーム・コア粒子を形成する。一方、リンカーヒストン H1 はヌクレオソーム・コア粒子を繋ぎ、クロマチン構造の折り畳みを促進する。なお、各コアヒストンの N 末端領域ヒストンテイルは、核内酵素によるアセチル化やメチル化等の翻訳後修飾を受けやすい。これらの修飾は種々の調節タンパク質の結合場所となるため、ヒストン修飾パターンに応じて異なる調節タンパク質がクロマチンに引き寄せられ、クロマチンの凝縮や弛緩が調節、細胞の必要に応じたクロマチンの構造変化が生じる。

近年、全ゲノム配列解析技術の発展により、様々な種類のがんにおいて、ヒストン遺伝子のアミノ酸配列を変化させる多数の変異が発見され、がんの発症や進行の要因となる「オンコヒストン」変異の探索が進められている(Nacev *et al.*, *Nature*, 2019; Bagert *et al.*, *Nat Chem Biol*, 2021)。神経腫瘍における H3 のヒストンテイルの体細胞変異 K27M は、H3K27 トリメチル化の喪失及び H3K27 アセチル化の増加を生じ、クロマチンの構造変化により、遺伝子発現異常を引き起こす(Krug *et al.*, *Cancer cell*, 2019)。濾胞性リンパ腫でみられる H1 の機能欠損はクロマチンの凝縮異常を生じ、大規模なクロマチンの弛緩によってヒストン修飾を変化させる(Yusufova *et al.*, *Nature*, 2021)。また、乳がんや卵巣がんにおける H2B の球状ドメインの体細胞変異 D51A/N は、ADP リボース化の異常により Lys 残基のアセチル化を阻害し、細胞増殖を促進する(Huang *et al.*, *Cancer Res*, 2022)。さらに、膀胱がんや頭頸部がんで見られる H2B の球状ドメインにおける体細胞変異 E76K は、H2B と H4 の相互作用異常を生じ、ヒストン八量体の形成不良によるヌクレオソーム・コア粒子の不安定性を亢進、クロマチンへの調節タンパク質の近づきやすさに変化を生じ、遺伝子発現異常を引き起こす(Bennett *et al.*, *Can Dis*, 2019)。しかし、これらは全オンコヒストンのうちの僅かにすぎず、多くのオンコヒストンによる発がんへの寄与は未だほぼ解明されていない。

造血細胞に体細胞変異が生じることでがん化した血液がんの多くは難治性であり、各がん患者に適した治療法の開発のため、より詳細な発がん機序の解明が求められる。

本研究では、ある血液がんの患者 1001 例の全エクソン解析によりリカレントに確認された、コアヒストン *HistoneX* 遺伝子の

体細胞変異に着目し、該当変異を導入した細胞株における遺伝子発現異常の解析、および血液がんにおける該当変異と他変異との共在を探索することにより、新規のヒストン異常による血液がんの発症機序を解明することを目的とする。

【材料・方法】

(1) *HistoneX* 遺伝子への 着目変異の導入

筑波大学附属病院由来のヒト骨髄血検体から単核球細胞を分離し、RNA 抽出、cDNA 合成の後、*HistoneX* 遺伝子を PCR により増幅した。増幅産物を pGEM-T Easy プラスミドに組み込み、ヒートショック法により大腸菌コンピテントセル (DH5α) に形質転換した。寒天培地上に形成された大腸菌コロニーを培養し、Mini prep 法により回収したプラスミドにおいて、Quick Change Mutagenesis kit を用いて、プラスミド内の *HistoneX* に着目変異を導入した。なお、変異導入前後にはプラスミドを制限酵素で処理し、電気泳動による切断パターンの確認により、*HistoneX* がクローニングされていることを確認した。更に、DNA シーケンス解析により、*HistoneX* がプラスミドに正の向きで組み込まれていること、導入変異以外に特異な変異や多型がないことを確認した。

(2) 変異型 *HistoneX* 過剰発現細胞の用意と遺伝子発現解析

変異型 *HistoneX* 導入プラスミドから切り出した変異型 *HistoneX* を、2 種の発現ベクター (pGCDNsamIRESGFP, pcDNA3.1) にサブクローニングにより組み込んだ。Maxi prep 法により、純度の高い変異型 *HistoneX* 導入発現ベクターを高収量回収した後、リン酸カルシウム法により、上記発現ベクターを 293T 細胞株に計 3 回トランスフェクションし、変異型 *HistoneX* を一過性に過剰発現させた。なお、野生型 *HistoneX* 導入プラスミドをトランスフェクションした、野生型 *HistoneX* 過剰発現細胞を野生型コントロール群とした。緑色蛍光タンパク質 GFP 遺伝子を発現する発現ベクター pGCDNsamIRESGFP をトランスフェクションした細胞株の GFP 蛍光割合により、全群において十分なトランスフェクション効率を確認した後、細胞を回収し、タンパク質と RNA を抽出した。抽出タンパク質を用いたウエスタンブロット法 (抗 *HistoneX* 抗体、抗βアクチン抗体使用) により、トランスフェクション細胞において *HistoneX* がタンパク質レベルで過剰発現していることを確認後、抽出 RNA を用いて変異型 *HistoneX* 過剰発現細胞 3 群と野生型コントロール細胞 3 群の RNA シーケンス解析を実施し、解析ソフト CLC11 等により変異型 *HistoneX* 導入により生じる遺伝子発現異常を探索した。

(3) COSMIC cell line project データベースを用いた変異共在の探索

オンライン上のデータベースである COSMIC cell line project を用い、ヒト造血器腫瘍由来の細胞株 175 種について、*HistoneX* 変異と他遺伝子変異との共在を探索した。

【結果・考察】

知的財産権の保護に関わるため、閉鎖型の審査会にて報告予定。