

No.	24-1006	
研究課題名	造血幹細胞の加齢骨髓環境への適応制御	
研究代表者	宮城 聡（ 島根大学・教授 ）	
研究組織	受入教員	岩間 厚志（ 東京大学医科学研究所・教授 ）

東京大学医科学研究所国際共同利用・共同研究拠点事業  
共同研究報告書(年次終了・研究完了)【国内】

## 共同研究報告 (年次終了)

*Phf6* (Plant homeodomain like finger gene 6) は、クロマチン構造変換を介して遺伝子発現制御に関わる因子であり、骨髄異形成症候群 (Myelodysplastic Syndrome; MDS)、二次性急性骨髄性白血病 (Secondary Acute Myeloid Leukemia; sAML) で機能欠失型変異が報告されている。私達は、*Phf6* 欠損造血幹細胞 (Hematopoietic Stem Cells; HSC) は  $\text{TNF } \alpha$  への応答性が低く、競合的骨髄移植実験において野生型 HSC に対して競合優位性を示すことを報告した (Miyagi et al., *Blood*, 2019; Miyagi and Iwama, *Curr. Opin. Hematol.*, 2020)。この  $\text{TNF } \alpha$  応答性の低下がクローン性造血や MDS 発症の一因であると仮定し研究を行なっている。

我々は、PHF6 の機能制御機構を明らかにするため、生化学的な解析を行い、PHF6 会合分子として Pleckstrin Homology Domain Interacting Protein (PHIP) を同定した。PHIP は Cullin-RING ligases 複合体 (CRLc) の基質受容体である (この複合体を  $\text{CRLc}^{\text{PHIP}}$  と記載する)。白血病細胞株では、TET2 のクロマチンへのリクルートが、 $\text{CRLc}^{\text{DCAF1}}$  によるモノユビキチン化により制御されることが報告されている。また、クローン性造血で *PHIP* 遺伝子の体細胞変異は報告されている<sup>3</sup>。これらの背景から「 $\text{TNF } \alpha$  シグナルで活性化された  $\text{CRLc}$  により PHF6 がモノユビキチン化され、標的遺伝子座にリクルートされる」とのモデルを構築した。

## (I) モデルの検証 (PHF6のユビキチン化部位の同定)

昨年度、*PHIP* 欠損 K562 細胞 ( $\text{PHIP}^{\text{KO}}$ ) と親株 ( $\text{PHIP}^{\text{WT}}$ ) からユビキチン化ペプチドを濃縮し、ユビキチン化タンパク質のプロファイルを比較解析したが、ユビキチン化された PHF6 ペプチドは検出されなかった。現在、FLAG 抗体を用いたアフィニティー精製を行い、PHF6 の翻訳後修飾を同定予定である。さらに、*in vitro* で増幅した  $\text{Phip}^{\text{W/W}}$  と  $\text{Phip}^{\Delta/\Delta}$  HSC を用いて PHF6 の ChIP sequence を行い、PHIP が PHF6 の標的遺伝子座へのリクルートに及ぼす影響を検討予定である。

(II)  $\text{CRLc}^{\text{PHIP}}$  の造血組織における役割

これまでの研究から、造血細胞特異的な *Phip* 遺伝子欠損マウス ( $\text{Vav1}; \text{Phip}^{\Delta/\Delta}$ ) が、 $\text{Vav1}; \text{Phf6}^{\Delta/\Delta}$  と同様に、進行性の血小板減少、HSC の増幅とそれに伴う脾腫を呈することを見出している。今年度は、HSC の骨髄再構築能を競合的移植実験により解析した。この結果、 $\text{Phip}^{\Delta/\Delta}$  HSC が移植初期や 5-FU 投与下などの造血ストレス存在時に競合優位性を示すことを見出した。さらに、HSCs の RNA sequence を行い、 $\text{Phip}^{\Delta/\Delta}$  HSC と  $\text{Phf6}^{\Delta/\Delta}$  HSC が酷似した遺伝子発現変動を示し、加齢に伴い誘導される遺伝子群や炎症関連遺伝子群の発現低下が観察された。

以上の結果は、PHF6 と PHIP が同一経路で機能することを示しており、 $\text{CRLc}^{\text{PHIP}}$  が PHF6 の機能性制御に関わることを強く示唆する結果である。今後、PHIP の分子解析を通じて、 $\text{CRLc}^{\text{PHIP}}$  による PHF6 の制御機構を明らかにする。