

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860794

研究課題名(和文)染色体転座形成のエピジェネティック機構の解明

研究課題名(英文)Mechanisms of chromosomal translocations through the epigenetic regulation.

## 研究代表者

和田 妙子(Wada, Taeko)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：30382956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストン脱メチル化酵素LSD1の白血病発症における役割について解析した。LSD1の最も短いアイソフォームを造血幹/前駆細胞に強発現するトランスジェニック・マウスを作製し、骨髄細胞を解析すると未分化造血幹細胞の増加が見られた。胸腺でTリンパ球の過形成が見られたが、白血病は発症しなかった。放射線照射を行うと、休止期造血幹細胞にLSD1を発現するラインで早期かつ高頻度にTリンパ芽球性リンパ腫/白血病を発症した。以上から、造血幹細胞におけるLSD1の強発現は、白血病発症の1次的異常であり、さらなる変異により白血病が発症すると考えられた。LSD1は、造血器腫瘍の進展阻止や治療の標的分子として期待される。

研究成果の概要(英文)：We demonstrate that LSD1 overexpression is a founder abnormality for the development of T-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma (T-LBL). Overexpression of the shortest isoform of LSD1, which is selectively repressed in quiescent HSCs and demethylates histone H3K9 more efficiently than other isoforms, increases self-renewal potential via up-regulation of the HoxA family, but retains the multi-differentiation ability with a skewed differentiation to T-cell lineages at transcriptome levels in HSCs. Transgenic mice overexpressing LSD1 in HSCs did not show obvious abnormalities but developed T-LBL at very high frequency after irradiation. LSD1 overexpression appears to be the first hit in T-cell leukemogenesis and provides an insight into novel strategies for early diagnosis and effective treatment of the disease.

研究分野：血液学・分子生物学・薬学

キーワード：前白血病幹細胞 エピジェネティクス T細胞性リンパ芽急性白血病 ヒストン脱メチル化酵素

## 1. 研究開始当初の背景

染色体転座によって生じる融合遺伝子は、慢性骨髄性白血病をはじめ種々の造血器腫瘍の原因として知られている。さらに最近、肺癌や前立腺癌などの固形腫瘍でも染色体転座が見られることがわかり、治療的意義も含めて大きな注目を集めている。染色体転座形成のメカニズムの解明は、より有効で安全な治療やがんの予防法の開発に大きく役立つことが期待されるが、その詳細はほとんど明らかにされていない。これまでの疫学的研究などから、放射線による DNA 二重鎖切断を修復する際に、誤って別の染色体同士を結合してしまうことが転座形成の本態と推測されるが、その際に関与する分子やそれらの働きを明らかにすることが必要である。

LSD1 はヒストン H3 の lysine-4 を脱メチル化する酵素で、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) と複合体を形成し、遺伝子発現を抑制する。2008 年に Rosenfeld らは、LSD1 が染色体構造をダイナミックに改変し、別々の染色体に位置するプロモーターを会合させ、転写を複合的に調節していることを示した (Cell 132: 996, 2008; PNAS 105: 19199, 2008)。また LSD1 は androgen 受容体と結合し、その転写能を制御するが、androgen 受容体は前立腺癌における染色体転座形成に重要な働きをしていることが報告されている (Cell 139:1069, 2009; Nat. Genet. 42:668, 2010)。また申請者は最近、LSD1 が白血病細胞株で強発現し、特に慢性骨髄性白血病および染色体転座を有する急性骨髄性白血病細胞で強発現していることを見いだした。一方、ヒト正常造血幹細胞・前駆細胞および正常顆粒球・単球・リンパ球においては発現は低レベルであった。以上の知見から申請者は、放射線等による DNA 二重鎖切断部位に転写を抑制するためにリクルートされた LSD1/HDAC 複合体が染色体転座を誘導するという仮説を立てた。その際に LSD1/HDAC の強発現と複合体コンポーネントの質的変化が必要条件と考えている。本研究においては、この仮説を証明し、転座形成のメカニズム解明の一助とする。

本研究は、これまで申請者が行ってきた発がんならびに腫瘍性維持の分子メカニズムに関するエピジェネティクス研究の過程で新たに発見した「転座を有する白血病細胞におけるヒストン脱メチル化酵素 LSD1 の特異的発現亢進」を手がかりに、染色体転座形成のメカニズムという古くて新しいテーマにアプローチしようとするものである。そして最終的には、より有効で安全な治療やハイ・リスク群におけるがん予防法の開発の理論的基盤を提供することを目的とする。

## 2. 研究の目的

染色体転座は種々の悪性腫瘍の原因となることが知られており、その形成の分子メカニズムの解明はがんの有効な治療や予防法

の開発に役立つと考えられる。

LSD1 はヒストン H3 の lysine-4 を脱メチル化する酵素で、HDAC と複合体を形成し、遺伝子発現を抑制する。一方、LSD1 が染色体構造をダイナミックに改変すること、前立腺癌で染色体転座に関与している androgen 受容体と結合することが報告されている。申請者は最近、転座を有する白血病細胞において LSD1 が特異的に強発現していること、また LSD1 が DNA 二重鎖切断部位に局在することを確認した。以上より、DNA 二重鎖切断部位に転写を抑制するためにリクルートされた LSD1 が染色体転座を誘導するという仮説を立てた。本研究はこの仮説を検証し、最終的に染色体転座形成のメカニズムを解明することを目的とする。

具体的には、DNA 二重鎖切断部位における LSD1 の局在を確認する。正常細胞と転座を有する白血病細胞における LSD1 の質的・量的異常について解析する。LSD1 の強発現とロックダウンシステムを用いた *in vitro* の系とトランスジェニック・マウスを用いた *in vivo* の系で、LSD1 の発現変化に伴う染色体異常の頻度、さらには白血病発症の有無を調べる。LSD1 阻害剤による染色体異常出現の抑止効果を確認する。

## 3. 研究の方法

### (1) LSD1 アイソフォームの同定とその機能解析

白血病細胞株における LSD1 の発現解析  
正常血液細胞と白血病細胞株における LSD1 の発現をウェスタンブロッティングと RT-PCR 法で調べた。また、Oncomine データベースを用いて臨床検体での発現を細胞株のデータと比較した。

血液細胞に発現する LSD1 アイソフォームの同定と発現パターンの解析  
哺乳類の LSD1 には alternative splicing によって exon 2 と 8 に挿入が入ることで生じる 4 種の isoform が存在することが報告されている。そこで、正常造血前駆細胞と白血病細胞における LSD1 アイソフォームの発現をアイソフォーム特異的なプライマーを用いて qRT-PCR 法にて調べた。

LSD1 アイソフォームの機能解析 (*In vitro*)  
これらアイソフォームのヒストン脱メチル化活性に違いがあるかどうか調べるためにリコンビナントの LSD1 を作製し、*in vitro* の再構成系でヒストン脱メチル化活性を検出した。また、293細胞に LSD1 アイソフォームを強発現し細胞内でのヒストン脱メチル化活性をヒストンメチル化抗体を用いたウェスタンブロッティング法で調べた。さらに、造血幹/前駆細胞における機能を明らかにするため、マウス骨髄細胞に LSD1 アイソフォームを強発現させコロニー形成能と造血幹/前駆細胞の自己複製に関わる遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法にて調べた。

### (2) LSD1 の白血病発症における役割の解

析

造血幹/前駆細胞に及ぼす影響

未分化造血幹細胞に本来極めて発現が低いLSD1の最も短いアイソフォームが強発現することが白血病の発症につながるのではないかと考えた。そこで、Sca-1プロモーターを用いてLSD1の最も短いアイソフォームを造血幹/前駆細胞に特異的に強発現するトランスジェニック・マウスを作製した。発現量の異なる2ラインの造血幹/前駆細胞の性質をFACSを用いて解析した。さらに骨髄Sca-1陽性細胞を単離し、アレイ解析とGene Ontology解析を行った。

正常造血に及ぼす影響

12週齢のトランスジェニック・マウスから骨髄細胞および胸腺細胞を採取し、lineage markerを用いたFACS解析を行い、分化が正常に起こっているか解析した。さらに長期的な観察で、白血病を発症するかどうか調べた。

2次的損傷を与えた場合に発症する白血病のタイプの解析

トランスジェニック・マウスを何も処理しないグループと放射線照射群にわけ経過観察を行った。発病したマウスから骨髄・脾臓・胸腺・肝臓細胞を採取しFACSと病理解析を行い、造血器の異常の有無を確認した。またできた腫瘍細胞でヒトLSD1の発現を確認し、造血器腫瘍の原因がLSD1によるものであることを確認した。

#### 4. 研究成果

LSD1 (KDM1A) はヒストンH3K4およびH3K9を脱メチル化する酵素で、標的遺伝子の発現をエピジェネティックに制御する。LSD1は神経芽細胞種・前立腺癌・乳癌など様々ながんが強く発現しているが、発がんの機序については不明の点が多い。今回、LSD1の白血病発症における役割について、トランスジェニック・マウスを独自に作成して解析した。

(1) LSD1発現は正常ヒト造血幹/前駆細胞においては極めて低く、Tリンパ芽球性リンパ腫/白血病を含む白血病細胞で強く発現していた。哺乳類のLSD1にはalternative splicingによってexon 2と8に挿入が入ることで生じる4種のisoformが存在するが、その最も短いisoformの発現は造血幹/前駆細胞において極めて低く、白血病細胞では強く発現していた。このisoformを造血幹/前駆細胞に導入したところ、自己複製能の亢進が観察された。

(2) そこでこの最も短いisoformを造血幹/前駆細胞に強く発現するトランスジェニック・マウス[C57BL/6J-Tg(Ly6A-KDM1A\_v2)]を作製した。発現レベルの異なる2つのラインが得られ、低発現ラインは休止期造血幹細胞が、高発現ラインは造血幹・前駆細胞が増加していることがわかった。また、骨髄Sca-1陽性細胞のアレイ解析を行うと、HoxAファミ

リー、造血幹細胞の制御やT細胞系列への分化にかかわる遺伝子の発現が増加していた。

採取した造血幹・前駆細胞は自己複製が亢進していたが分化は正常で、マウスも造血障害や白血病の自然発症は見られなかった。放射線照射を行うと、低発現ラインが早期かつ高頻度にT細胞性リンパ芽球性リンパ腫/白血病を発症した(発表論文、図1)。現在、これらのマウスからT細胞を採取し、染色体転座の有無を調べている。

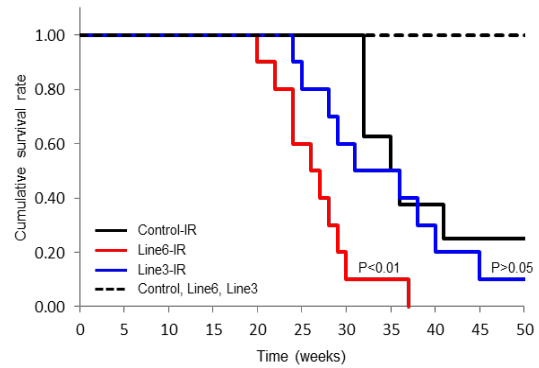


図1、放射線照射後の生存曲線

(3) 以上よりLSD1の強発現は、造血幹細胞をpre-leukemic stem cellにトランスフォームするという、白血化の初期に関与していることが推察された。造血幹細胞におけるLSD1の最も短いisoformの強発現は、白血病発症の1次的遺伝子異常(1<sup>st</sup> hit)であり、単独では白血化には至らないが、さらなる変異(2<sup>nd</sup> hit)が加わることでfull-blownの白血病が発症すると考えられた(図2)。LSD1の最も短いisoformは、Tリンパ芽球性リンパ腫/白血病を始めとする造血器腫瘍の進展阻止や治療の標的分子として期待される。

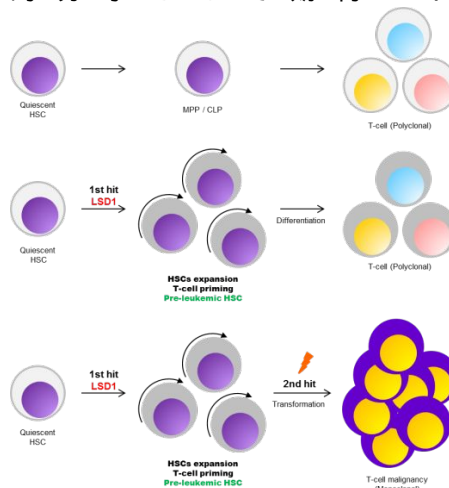


図2、LSD1による白血病発症モデル

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1件)

Wada T, Koyama D, Kikuchi J, Honda H, Furukawa Y.: Overexpression of the shortest isoform of histone demethylase LSD1 primes hematopoietic stem/progenitor cells for malignant transformation. Blood. 査読あり Epub ahead of print DOI: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2014-11-610907>

〔学会発表〕(計 1件)

和田 妙子 The shortest isoforms of histone demethylase LSD1 is implicated in leukemogenesis. 日本血液学会、2013年10月11日～2013年10月13日、さっぽろ芸文館

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

和田 妙子 (WADA, Taeko)  
自治医科大学・幹細胞制御研究部・助教  
研究者番号：30382956

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：