

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09488

研究課題名(和文) ヒストン脱メチル化酵素LSD1による前白血病幹細胞の形成

研究課題名(英文) LSD1 overexpression contributes to the development of pre-leukemic stem cells of lymphoid origin.

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：LSD1はヒストンH3-K4およびK9を脱メチル化してエピジェネティックに遺伝子発現を調節する因子であり、神経芽細胞種、前立腺がんや乳癌など様々ながんで強発現していることが分かっている。最近の研究で、エピジェネティック因子は、自己複製能や多分化能を持つ全白血病幹細胞の形成し、骨髄性白血病の初期に関与していることが示されてきたが、このことが他の造血器腫瘍にもあてはまるかは分かっていない。本研究では、LSD1を強発現するトランスジェニックマウスを用い、LSD1の強発現がリンパ球系の前白血病幹細胞の形成に寄与することを示した。

研究成果の概要(英文)：Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) is a histone modification enzyme that removes methyl groups from mono- and di-methylated lysine-4 and -9 of histone H3 at enhancer regions to epigenetically activate or repress transcription of downstream target genes. A high expression of LSD1 was observed in various malignancies, such as neuroblastoma, prostate cancer and breast cancer.

Recent studies indicate that epigenetic regulators act at the initial step of myeloid leukemogenesis to form pre-leukemic hematopoietic stem cells (HSCs), which possess an increased self-renewal potential but retain multi-differentiation capacity. However, it remains unknown whether this theory is applicable to other malignancies. In this study, LSD1 does not affect the lineage commitment during malignant transformation. Emergence of myeloid malignancies was not observed. From these results, we propose that LSD1 overexpression contributes to the development of pre-leukemic stem cells of lymphoid origin.

研究分野：分子生物学・造血器腫瘍

キーワード：ヒストン脱メチル化酵素 前白血病幹細胞 ゲノム不安定性

1. 研究開始当初の背景

ある種のエピジェネティック変異により自己複製が亢進しているが、分化能は保たれている造血幹細胞を前白血病性幹細胞と呼ぶ。最近の報告では、70歳以上の高齢者の10~20%に検出されるとされ、白血病や造血障害の早期発見や発症予防の観点から注目されていた(NEJM 371: 2488, 2014)。

前白血病性幹細胞の形成にはDNAメチル化関連因子であるDNMT3A, TET2, IDH1/2などの変異が関与することが示されていた(Nat. Rev. Cancer 15: 15, 2015)。これらの遺伝子変異を有する前白血病性幹細胞に、FLT3-ITDやNPM1cの変異などが加わるとAMLやMDSを発症することが、臨床的にも実験的にも証明されていた(Nature 506: 328, 2014ほか)。しかしながら、他の遺伝子異常が前白血病性幹細胞の形成に関与する可能性やAML/MDS以外の造血器腫瘍でも前白血病性幹細胞が存在するかどうかについては、まだ不明の部分が多かった。

2. 研究の目的

LSD1はヒストンH3-K4およびK9を脱メチル化して遺伝子発現を調節する。LSD1には4種類のisoformが存在するが、それらの発現や機能の違いはまだ十分に解明されていない。申請者らは、造血幹・前駆細胞にLSD1の最も短いisoformを強発現するトランスジェニック・マウスを作製したところ、定常状態での造血には異常は見られなかったが、放射線照射によって早期かつ高頻度にT細胞性リンパ芽球性リンパ腫・白血病を発症した。

以上より、LSD1の発現異常が前白血病性幹細胞の形成に関与すると推察された。そこで本研究課題では、LSD1トランスジェニック・マウスを用い、2次的遺伝子異常の付加による白血病の発症とそのタイプを確認し、LSD1の最も短いisoformを強発現した造血幹・前駆細胞が前白血病状態にあることを証明する。最終的には、このisoformをマーカーとして前白血病状態の早期発見、またその特異的阻害剤を開発する。

3. 研究の方法

(1)Oncogenicな遺伝子異常を有するマウスとの交配実験による白血病の発症とそのタイプの解析:申請者らはLSD1の最も短いisoformを発現した造血幹・前駆細胞は前がん状態にあり、種々の二次的oncogenic insultsを受けることで白血病を発症すると考えている。現在投稿中の論文では、LSD1トランスジェニック・マウスに二次的損傷として放射線照射を行った。本研究課題では、遺伝子異常による性質が明らかになっているp53およびBCR/ABLトランスジェニック・マウスを用いる。実際に、p53変異を持つ細胞株(TALL-1, CEM, HL60, KG-1, THP-1, K562)やBCR/ABLをはじめとする染色体転座をもつ細胞株(K562, THP-1, MV4-11, PL21)でLSD1

が強発現していることは確認できている。p53はアポトーシス・細胞周期・DNA修復機構に關するがん抑制遺伝子で、そのノックアウト・マウスは3~6か月齢までに白血病やリンパ腫を含む様々な悪性腫瘍が発生する。一方、BCR/ABLは慢性骨髄性白血病(CML)の95%以上、急性リンパ性白血病(ALL)の約20%で検出される融合遺伝子で、BCR/ABLトランスジェニック・マウスは8~12か月齢までに顆粒球の増生を中心とする慢性期のヒトCMLに極めて良く似た病態を示す。この2種類のマウスを用い、LSD1トランスジェニック・マウスとの交配実験を行い、腫瘍のタイプと発症のメカニズムを明らかにする。

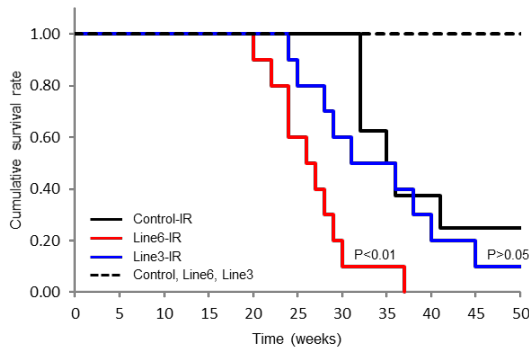
(2)LSD1強発現が白血化の基盤的異常となるメカニズムの解明:申請者らは、LSD1の発現が低レベルに保たれていることが造血幹細胞のゲノム安定化に必須で、発現異常によってゲノムの不安定性から白血病発生に至るという仮説をもとに研究を行っている。そこで、白血病発症前のLSD1トランスジェニック・マウスの骨髄細胞を用いて染色体分析とアレイ解析を行い、染色体転座や欠失・増幅などの異常が生じていないかを調べる。

生後8~12週のLSD1トランスジェニック・マウスから骨髄細胞を採取し、放射線やエトポシドなどでDNA損傷を与え、-H2AXをマーカーとした損傷部位におけるDNA修復関連因子(RNF8/RNF168, BRCA1, 53BP1など)の集積に異常がないかを共焦点顕微鏡やFACSを利用して解析する。

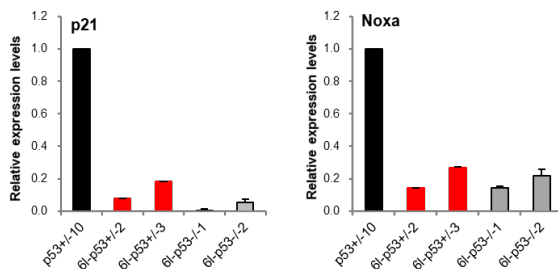
(3)LSD1強発現が白血化の基盤的異常となるメカニズムの解明:平成28年度から継続して行う。Hox遺伝子群は様々な生物の個体発生~体軸形成に重要な遺伝子で、造血幹細胞ではその発現は低く抑えられ、白血病細胞では強発現することが知られている。HoxA遺伝子群の発現調節機構はいまだ不明な点が多いが、3C技術とコンピューター解析を駆使した研究で、発現抑制時のHoxAクラスターの立体構造とその中心へのCTCFインスレーターの集積が報告されている。申請者らは、LSD1トランスジェニック・マウスのSca-1陽性骨髄造血前駆細胞においてHoxA遺伝子群の発現が亢進していることを見いだしており、LSD1による造血幹・前駆細胞の自己複製能の亢進に寄与していると考えている。LSD1によるHoxA遺伝子群の発現増強のメカニズムとして、LSD1がCTCFインスレーターに結合し、インスレーター機能を障害しているという仮説を立てた。この仮説を証明するため、LSD1トランスジェニック・マウス由来の造血幹・前駆細胞およびヒト白血病細胞株を用い、LSD1とCTCFの結合、およびCTCF binding siteへのLSD1の結合を免疫沈降法とクロマチン免疫沈降法で調べる。

4. 研究成果

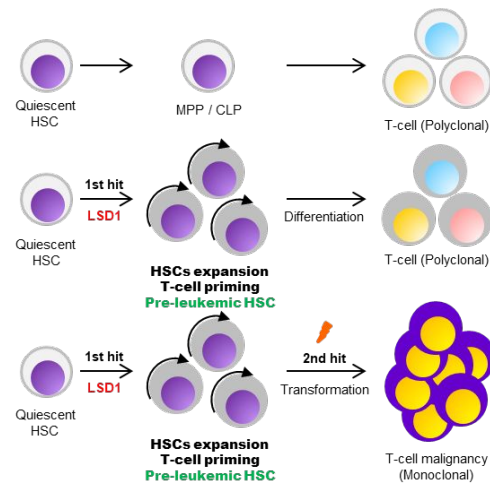
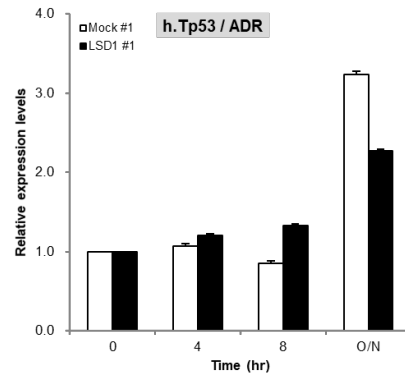
LSD1 はヒストン H3-K4 および K9 を脱メチル化して遺伝子発現を調節する。LSD1 は白血病化した細胞株で強発現していることは報告されているが、白血病化における役割は十分に解明されていない。申請者らは、造血幹・前駆細胞に LSD1 を強発現するトランスジェニック・マウスを作製したところ、定常状態での造血には異常は見られなかったが、放射線照射によって早期かつ高頻度に T 細胞性リンパ芽球性リンパ腫・白血病を発症した。これらより、LSD1 の発現異常が前白血病幹細胞の形成に関与すると考え、研究を行った。



まず、LSD1 トランスジェニック・マウスに放射線照射以外の白血病に多く見られる遺伝子異常 (P53 および BCR/ABR) を次的遺伝子異常として付加し、白血病の発症とそのタイプを確認した。BCR/ABL 融合遺伝子を有するトランスジェニック・マウスとの交配では、LSD1 強発現により骨髄性白血病は発症しなかった。また、T 細胞に特有な CD3 の発現が亢進しているものの腫瘍細胞の系列決定には至らなかった。しかしながら、p53+/- マウスとの交配実験では p53 およびその下流の遺伝子 p21 や Noxa の発現を低下させ、ゲノムの不安定性を惹起していると考えられた。



最終年度は、実際に LSD1 がゲノム不安定性を惹起するメカニズムの解明に着手した。LSD1 は p53 のプロモーターに結合し、ヒストン H3-K4 の脱メチル化を介して p53 の発現を抑制することを確認した。また、LSD1 を強発現するマウス造血前駆細胞に薬剤により DNA 損傷を与えると、コントロールと比べ優位に DNA 損傷に応答した p53 の発現上昇がみられなかった。以上の事から、LSD1 の強発現はリンパ球系前白血病幹細胞の形成に寄与していることが分かった。



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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

平成 28 年日本血液学会
平成 28 年分子生物学会
平成 27 年日本血液学会
平成 27 年分子生物学会

〔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：
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 医学部・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：

(4) 研究協力者

()