

令和元年5月9日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09846

研究課題名(和文)造血細胞の運命を決定するエンハンサーの同定とその制御機構の解明

研究課題名(英文) Identification and regulation mechanism of enhancers for hematopoietic cell fate decision

研究代表者

河原 真大 (Kawahara, Masahiro)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：80617449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：白血病細胞において、造血に関わる転写因子の発現を調節する複数のエンハンサーが抑制されていることを見出した。転写因子とヒストン修飾因子LSD1との相互作用が、エンハンサー抑制に必要であった。この相互作用を阻害すると、白血病細胞の骨髄系細胞への分化誘導が引き起こされた。しかし、エンハンサーをロックアウトすると、白血病の分化誘導は起こらなくなった。即ち、エンハンサー上での転写因子とLSD1との相互作用が、白血病維持に重要であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

白血病は、蛋白をコードする遺伝子の変異の積み重ねによって生じ、そうした変異を標的とした新規薬剤の開発が近年進められている。しかし我々の研究は、エンハンサーと呼ばれる遺伝子本体の外側にあるゲノム領域が異常に制御されると、遺伝子発現プログラムが変化し、白血病の維持に関わるらしいことを明らかにした。そして、エンハンサーを抑制するメカニズムが、白血病治療の新たな標的となりうることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the current study, we found that several enhancers which regulate transcription factors involved in hematopoiesis are suppressed in leukemia cells. The interaction between transcription factors and a histone modifier LSD1 is indispensable in suppression of the enhancers. Disruption of the interaction caused the induction of myeloid differentiation in leukemia cells. However, the myeloid differentiation was impaired by knockout of the enhancers. Collectively, the interaction between transcription factors and LSD1 on the enhancers plays an important role in the sustenance of leukemia.

研究分野：血液腫瘍学

キーワード：白血病 造血分化 エンハンサー ヒストン修飾

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

造血とは、造血幹細胞が細胞運命決定を繰り返して分化し、前駆細胞を経て成熟血球を高効率に産生するシステムである。この造血分化システムは、主要な転写因子によって精緻に制御されるが、その破綻は白血病などの造血器腫瘍を引き起こす。これまで、転写因子は主に、その標的遺伝子のプロモーターに作用して発現調節を担うと考えられてきた。しかし近年、遺伝子座から離れた場所にある発現調節領域「エンハンサー」の調節にも重要であることが明らかになった。

エンハンサーは、エピジェネティック(特にヒストン修飾)に制御されることが明らかになってきた。ヒストン修飾 H3K4me1, H3K4me2 によってアイドリング状態に入り、ヒストン修飾 H3K27Ac によって活性化される。こういったヒストン修飾は、ヒストンメチル化酵素(HMTs)・脱メチル化酵素(KDMs)およびヒストンアセチル化酵素(HATs)・脱アセチル化酵素(HDACs)によって可逆的に調節されることが明らかになってきた。また、分化を決定づける遺伝子のエンハンサーが分化段階特異的にヒストン修飾を受け活性化すること、その特異的エンハンサー領域には主要転写因子の結合モチーフがエンリッチされること、ヒストン修飾制御異常による異常なエンハンサー活性化が白血病の原因となること、などが明らかになりつつあった。

このような国内外における研究の流れにおいて、我々はヒストン修飾因子である LSD1(KDM1A)に着目して研究を展開してきた。LSD1 は、ヒストン修飾 H3K4me1, H3K4me2 を脱メチル化する酵素で、CoREST を介して HDAC1, HDAC2 とも複合体を形成するため、H3K27Ac の脱アセチル化にも関与する。従って、LSD1 はエンハンサーを負に調節する因子と想定されるが、LSD1 阻害とエンハンサーに注目した報告は当初皆無であった。一方我々は、新規の LSD1 阻害剤が分化誘導を引き起こして抗白血病効果を発揮すること、その際に造血に関わるマスター転写因子の遺伝子座近傍にあるスーパーエンハンサー(活性型エンハンサーが密集する領域)が活性化されることを見出していた。しかしながら、LSD1 阻害による抗白血病効果と分化誘導、スーパーエンハンサーの活性化といったそれぞれの現象を統合的に理解するには至っていなかった。

2. 研究の目的

以上のような背景から、LSD1 を中心としたスーパーエンハンサーの制御メカニズムを明らかにすることを本研究の中心的目的とした。

3. 研究の方法

(1) 質量分析法による LSD1 結合蛋白の網羅的同定

白血病細胞の溶解物を用いて LSD1 に対する免疫沈降を行い、その免疫沈降産物を液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS/MS)にて網羅的に解析した。

(2) クロマチン免疫沈降法による LSD1 およびその結合蛋白のスーパーエンハンサー上へのリクルート状況の解析

LSD1 および で同定した分子を対象にクロマチン免疫沈降(CHIP)を施行した。その産物を用いて、以前に同定した転写因子遺伝子座近傍のスーパーエンハンサー領域を対象とした定量 PCR(ChIP-qPCR)を施行し、LSD1 や で同定した分子が標的スーパーエンハンサー上にどの程度リクルートしているのかを数値化し、LSD1 阻害剤によってどのように変化するのかを解析した。

4. 研究成果

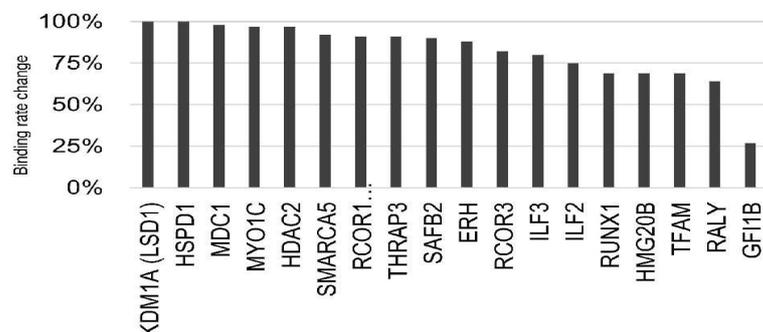
(1) LC-MS/MS による LSD1 結合蛋白の網羅的同定

白血病細胞株 HEL において LSD1 に対する免疫沈降産物から LC-MS を行った結果、54 個の因子が LSD1 結合蛋白として同定された。その中には、LSD1 と複合体を形成することが知られているヒストン修飾因子(HDAC1 や HDAC2 など)や補因子(CoREST, HMG20A, HMG20B など)が含まれる一方、転写因子(GF11B や RUNX1)も含まれていた。

次に、LSD1 阻害剤を加えることで、これら分子と LSD1 との結合がどのように変化するのかを LC-MS/MS で解析した。【図1】

すると、LSD1 阻害剤

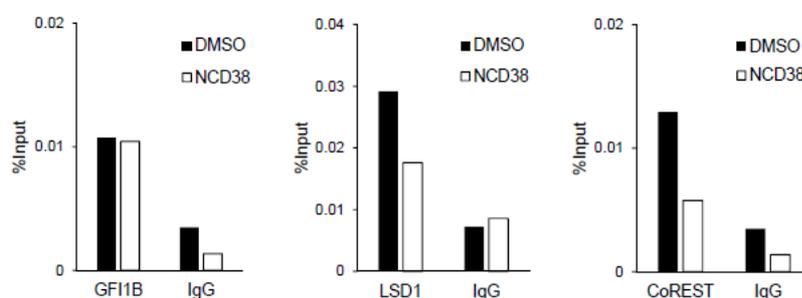
によって、RUNX1 と LSD1 との結合は弱く解除され、GF11B と LSD1 との結合は強く解除された。一方で LSD1 と他のヒストン修飾因子、補因子との結合はほとんど影響を受けなかった(図1)。これらの結果は、免疫沈降産物によるウェスタンブロット法でも確認された。



(2) ChIP-qPCR による LSD1 およびその結合蛋白のスーパーエンハンサー上へのリクルート状況の解析

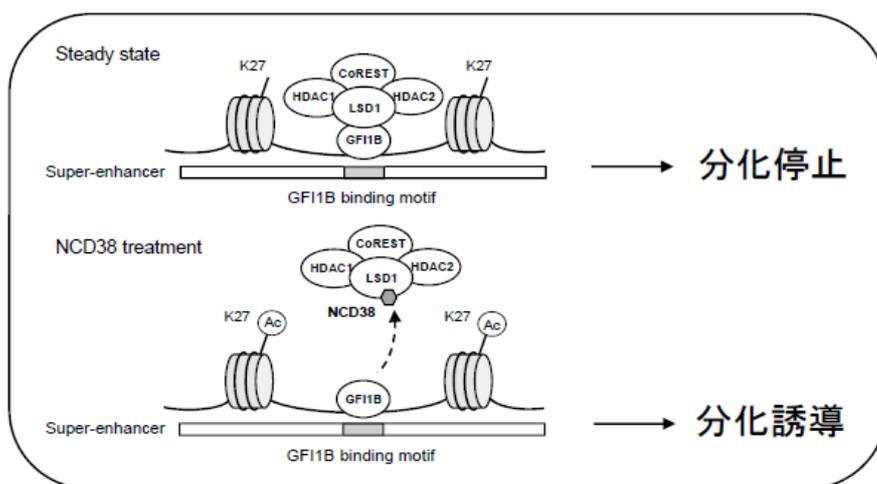
LSD1 阻害剤による LSD1 と GF11B との結合解除が分子細胞生物学的にどのような意義をもつのかを明らかにすることを試みた。転写因子 ERG の遺伝子座近傍のスーパーエンハンサー (ERG-SE) が LSD1 阻害剤によって活性化され ERG の発現亢進に寄与することを以前我々は同定していた。そこで ERG-SE 上で LSD1, CoREST, GF11B のリクルート状況が LSD1 阻害剤によってどのように変化するかを ChIP-qPCR で解析した。その結果、GF11B の ERG-SE 上へのリクルートは阻害剤の有無で変化しない一方で、LSD1 と CoREST の ERG-SE 上へのリクルートは阻害剤によって減少することが判明した(図 2)。同様の結果は、別の転写因子 GF11 の遺伝子座近傍のスーパーエンハンサー (GF11-SE) 上においても確認された。

【図2】



以上から、以下のようなスキームが考えられた。すなわち、GF11B と LSD1 は、協調して分化に必須の転写因子のスーパーエンハンサーを抑制することで、白血病細胞の分化停止に重要な役割を果たしていると考えられた。そして、阻害剤による選択的な結合解除は、LSD1 によるスーパーエンハンサー抑制の解除もたらし、分化に必須な転写因子の発現を上昇させて、分化誘導に寄与すると考えられた (図 3)。

【図3】



5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 15 件)(* correspondence)

- 1) Sakai S, Nishida A, Ohno M, Inatomi O, Bamba S, Sugimoto M, Kawahara M, Andoh A. Astaxanthin, a xanthophyll carotenoid, prevents development of dextran sulphate sodium-induced murine colitis. *J Clin Biochem Nutr.* 2019 Jan;64(1):66-72. doi: 10.3164/jcbn.18-47.
- 2) Takahashi K, Bamba S, Morita Y, Nishida A, Kawahara M, Inatomi O, Sugimoto M, Sasaki M, Andoh A. pH-Dependent 5-Aminosalicylates Releasing Preparations Do Not Affect Thiopurine Metabolism. *Digestion.* 2019 Jan 2:1-9. doi: 10.1159/000495690. [Epub ahead of print]
- 3) Sakai S, Nishida A, Ohno M, Inatomi O, Bamba S, Sugimoto M, Kawahara M, Andoh A. Ameliorating effects of bortezomib, a proteasome inhibitor, on development of dextran sulfate sodium-induced murine colitis. *J Clin Biochem Nutr.* 2018 Nov;63(3):217-223. doi: 10.3164/jcbn.18-42.
- 4) Imai T, Inoue R, Kawada Y, Morita Y, Inatomi O, Nishida A, Bamba S, Kawahara M, Andoh A. Characterization of fungal dysbiosis in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.* 2019 Feb;54(2):149-159. doi: 10.1007/s00535-018-1530-7.
- 5) Takahashi K, Bamba S, Kawahara M, Nishida A, Inatomi O, Sasaki M, Tsujikawa T,

Kushima R, Sugimoto M, Kitoh K, Andoh A. Magnified single-balloon enteroscopy in the diagnosis of intestinal follicular lymphoma: a case series. *Intest Res.* 2018 Oct;16(4):628-634. doi: 10.5217/ir.2018.00003.

6) Hosoba S, Kito K, Teramoto Y, Adachi K, Nakanishi R, Asai A, Iwasa M, Nishimura R, Moritani S, Kawahara M, Minamiguchi H, Nanba E, Kushima R, Andoh A. A novel mutation causing type 1 Gaucher disease found in a Japanese patient with gastric cancer: A case report. *Medicine (Baltimore).* 2018 Jul;97(27):e11361. doi: 10.1097/MD.00000000000011361.

7) Bamba S, Takahashi K, Imaeda H, Nishida A, Kawahara M, Inatomi O, Sugimoto M, Sasaki M, Andoh A. Effect of fermented vegetable beverage containing *Pediococcus pentosaceus* in patients with mild to moderate ulcerative colitis. *Biomed Rep.* 2018 Jul;9(1):74-80. doi: 10.3892/br.2018.1099.

8) Baba O, Horie T, Hakuno D, Nakashima Y, Nishi H, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Nishino T, Ide Y, Nakazeki F, Koyama S, Kimura M, Hanada R, Kawahara M, Kimura T, and Ono K. MicroRNA-33 regulates the population of peripheral inflammatory Ly6Chigh monocytes through dual pathways. *Mol Cell Biol.* 2018 Jun 28;38(14). pii: e00604-17. doi: 10.1128/MCB.00604-17.

9) Yamamoto R, Kawahara M, Ito S, Satoh J, Tatsumi G, Hishizawa M, Suzuki T, and Andoh A. Selective dissociation between LSD1 and GF11B by a LSD1 inhibitor NCD38 induces the activation of ERG super-enhancer in erythroleukemia cells. *Oncotarget.* 2018 Apr 20;9(30):21007-21021. doi: 10.18632/oncotarget.24774. eCollection 2018 Apr 20.

10) Kusaka S, Nishida A, Takahashi K, Bamba S, Yasui H, Kawahara M, Inatomi O, Sugimoto M, Andoh A. Expression of human cathelicidin peptide LL-37 in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol.* 2018 Jan;191(1):96-106. doi: 10.1111/cei.13047.

11) Nishino K, Nishida A, Inoue R, Kawada Y, Ohno M, Sakai S, Inatomi O, Bamba S, Sugimoto M, Kawahara M, Naito Y, Andoh A. Analysis of endoscopic brush samples identified mucosa-associated dysbiosis in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.* 2018 Jan;53(1):95-106. doi: 10.1007/s00535-017-1384-4.

12) Ohno M, Nishida A, Sugitani Y, Nishino K, Inatomi O, Sugimoto M, Kawahara M, Andoh A. Nanoparticle curcumin ameliorates experimental colitis via modulation of gut microbiota and induction of regulatory T cells. *PLoS One.* 2017 Oct 6;12(10):e0185999. doi: 10.1371/journal.pone.0185999. eCollection 2017.

13) Fujii M, Nishida A, Imaeda H, Ohno M, Nishino K, Sakai S, Inatomi O, Bamba S, Kawahara M, Shimizu T, Andoh A. Expression of Interleukin-26 is upregulated in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2017 Aug 14;23(30):5519-5529. doi: 10.3748/wjg.v23.i30.5519.

14) Furuya A, Kawahara M, Kumode M, Ohira Y, Usui A, Nagai S, Hosoba S, Minamiguchi H, Kito K, Andoh A. Central nervous system involvement of acute promyelocytic leukemia, three case reports. *Clin Case Rep.* 2017 Mar 29;5(5):645-653. doi: 10.1002/ccr3.919. eCollection 2017 May

15) Sugino N, Kawahara M, Tatsumi G, Kanai A, Matsui H, Yamamoto R, Nagai Y, Fujii S, Shimazu Y, Hishizawa M, Inaba T, Andoh A, Suzuki T, Takaori-Kondo A. (* correspondence) A novel LSD1 inhibitor NCD38 ameliorates MDS-related leukemia with complex karyotype by attenuating leukemia programs via activating super-enhancers. *Leukemia.* 2017 Nov;31(11):2303-2314. doi: 10.1038/leu.2017.59.

〔学会発表〕(計 12 件)

招待講演

河原 真大 演題名「急性骨髄性白血病治療の新たな挑戦」

近畿血液地方会招待講演 2018年11月10日

国際学会発表

1) Goichi Tatsumi, Masahiro Kawahara, Akinori Kanai, Hirotaka Matsui, Ryusuke Yamamoto, Masakatsu Hishizawa, Toshiya Inaba, Takayoshi Suzuki, Akira Andoh and Akifumi-Kondo Takaori. Aberrant Repression of GF11 Super-Enhancer By LSD1 Plays an Important Role in Leukemia Programs in Acute Myeloid Leukemia. The 59th ASH Annual Meeting and Exposition (Dec9-12,2017) Atlanta, USA 一般演題

2) Chonabayashi K, Kawahara M, Watanabe A, Nakamura M, Nishizawa M, Takaori-Kondo A, Yamanaka S, MD, and Yoshida Y. iPS Technology Revealed the Genetic and Functional Diversity Present in a Secondary AML Patient. The 58th ASH Annual Meeting and Exposition (Dec3-6,2016) San Diego, USA 一般演題

国内学会発表

1) Yukako Teramoto, Wataru Saika, Ai Asai, Masaki Iwasa, Aya Fujishiro, Rie

- Nishimura, Masahiro Kawahara, Hitoshi Minamiguchi, Katsuyuki Kito, Akira Andoh. Mogamulizumab and radiation therapy in two patients with relapsed mature T-cell neoplasm after related PBSCT. 第 41 回日本造血細胞移植学会総会、大阪、2019 年 3 月
- 2) Yukako Teramoto, Masaki Iwasa, Ai Asai, Aya Fujishiro, Rie Nishimura, Masahiro Kawahara, Hitoshi Minamiguchi, Katsuyuki Kito, Akira Ando. Two cases with primary plasma cell leukemia. 第 80 回日本血液学会学術集会, 大阪, 2018 年 10 月
- 3) Saika M, Iwasa M, Nagai S, Asai A, Nishimura R, Furuya A, Kawahara M, Minamiguchi H, Kito K, Andoh A. sIL-2 receptor is one of the predictive marker of spontaneous regression in MTX-LPD. 第 79 回日本血液学会学術集会, 東京, 2017 年 10 月
- 4) Asai A, Nagai S, Usui A, Kumode M, Iwasa M, Nishimura R, Kawahara M, Minamiguchi H, Kito K, Andoh A. 当院における用量調整 VRD 療法. 第 79 回日本血液学会学術集会, 東京, 2017 年 10 月
- 5) Tatsumi G, Kawahara M, Kanai A, Matsui H, Yamamoto R, Hishizawa M, Inaba T, Suzuki T, Andoh A, and Takaori-Kondo A. GF11 enhancer silenced by LSD1 is important for myeloid differentiation blockage in AML. 第 78 回日本血液学会学術集会, 横浜, 2016 年 10 月
- 6) Kumode M, Usui A, Ohira Y, Nagai S, Hosoba S, Furuya A, Segawa H, Kawahara M, Minamiguchi H, Kito K, and Andoh A. Report of three cases of acute promyelocytic leukemia with CNS relapse. 第 78 回日本血液学会学術集会, 横浜, 2016 年 10 月
- 7) Hosoba S, Iwasa M, Minamiguchi H, Usui A, Kumode M, Nagai S, Ohira Y, Furuya A, Hayashi Y, Segawa H, Kawahara M, Kito K, and Andoh A. A case report of multiple myeloma with central nervous system involvement. 第 78 回日本血液学会学術集会, 横浜, 2016 年 10 月
- 8) Tatsumi G, Kawahara M, Matsui H, Hishizawa M, Inaba T, Suzuki T, and Takaori-Kondo A. The silence of GF11 enhancer by LSD1 is associated with myeloid differentiation block in AML. 第 75 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2016 年 10 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：辰巳剛一、浅井愛

ローマ字氏名：Goichi Tatsumi, Ai Asai

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。