

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：32202
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791089
 研究課題名（和文） 染色体転座におけるヒストン脱メチル化酵素の役割：ダイナミックな染色体構造の改変
 研究課題名（英文） The role of histone demethylase in chromosomal translocations：The dynamic modification of chromosomal structure
 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

研究成果の概要（和文）：

ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 は正常細胞にほとんど発現しておらず、白血病細胞では強発現していた。特に染色体転座を有する白血病細胞ではより強発現していた。さらに、血液細胞において LSD1 は2種のアイソフォームが存在し、そのうちの一方が未分化な造血前駆細胞の自己複製能を亢進することがわかった。このアイソフォームの量的異常が白血病化や染色体転座に関与しており治療標的になることが推測され、造血幹細胞特異的に LSD1 を強発現するトランスジェニックマウスと骨髄移植マウスモデルを用いて造血器異常について解析している。

研究成果の概要（英文）：

We found that the expression of histone demethylase LSD1 is very low in normal human hematopoietic stem/progenitor cells (HSPC) and considerably higher in AML cells. We identified that only two isoforms were expressed in hematopoietic cells. The shorter isoform increased the self-renewal of mouse LSK cells. Therefore, we suggest that the shorter isoform of LSD1 is implicated in leukemogenesis and could be a therapeutic target of myeloid leukemias. We analyse hematopoietic abnormalities of the transgenic mouse and bone marrow transplanted mouse specifically expressed LSD1 isoforms in mouse HSPC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液腫瘍学

キーワード：造血器腫瘍・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。

申請者らは造血器腫瘍を中心に、発がんならびに腫瘍性維持の分子メカニズムについて、エピジェネティクスの視点から研究を続けている。その最大の理由は、ジェネティックな異常が不可逆的で修復が困難であるのに対し、エピジェネティックな変化は可逆的で薬剤等による治療的介入が可能なことである。とくにエピジェネティックに転写を抑制するヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) に着目し、その正常造血ならびに造血器腫瘍の発生における役割を解析してきた。その一端として、造血幹細胞においては HDAC の発現が抑制されており、多能性の維持すなわち多様な遺伝子の発現を確保していること、急性白血病においては HDAC が強発現しており、分化の停止に関与していることを見いだした (研究業績 6)。さらに多発性骨髄腫や悪性黒色腫などの難治性悪性腫瘍でも HDAC が強発現していることを確認した (EMBO Rep. 13(2):142, 2012; J Biol Chem. 284(44):30673, 2009)。このように悪性腫瘍で強発現している HDAC は良い治療標的と考えられ、実際、HDAC 活性を阻害する種々の低分子化合物が抗がん剤として働くことが報告されている。申請者らも HDAC 阻害剤が抗 CD20 抗体リツキサンの効果増強作用や免疫療法のアジュバント効果を有し、新しいタイプの抗がん剤として期待できることを示した。一方、最近になって HDAC が DNA 修復にも関与するという報告がなされ、注目を集めている。

例えば Miller らは DNA 二重鎖切断部位に HDAC が早期にリクルートされ、損傷部位からの転写を停止させると同時に non-homologous end-joining による DNA 修復を促進することを示している (Nat. Struct. Mol. Biol. 17:1144, 2010)。

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。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)。また申請者らは最近、LSD1 が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 (未発表データ)。

以上の知見から申請者らは、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变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、これまで申請者ら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見いだした「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、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。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。申請者らは最近、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を見いだした。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、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、①DNA二重鎖切断部位におけるLSD1の局在を確認する。②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。③LSD1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。④LSD1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

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検証し、染色体転座が形成されるメカニズムを明らかにする。

(1) DNA二重鎖切断部位へのLSD1の局在について調べる。

LSD1がDNA二重鎖切断部位で果たしている役割についての報告は無い。そこで、正常細胞(線維芽細胞、Tリンパ球)を用い、放射線照射により生じたDNA二重鎖切断部位にLSD1がリクルートされるかどうかを、共焦点顕微鏡を用いて確認する。

(2) 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。

①これまでの予備研究で、転座を有する白血病細胞(K562細胞、THP-1細胞、MV4-11細胞、PL21細胞)では、LSD1が強発現していることが分かった。そのメカニズムを明らかにするため、LSD1プロモーター領域の解析・mRNAの安定性の定量などを行う。

LSD1は様々な癌で異なるアイソフォームが存在する。このアイソフォームはエキソン2に20アミノ酸、エキソン8に4アミノ酸が挿入される為に、コファクターとの結合能力に差があることが報告されている(The Journal of Neuroscience, 30:2521, 2010)。そこで、白血病細胞と正常造血前駆細胞でLSD1のアイソフォームの違いにより、機能の差、ひいては転座の形成に違いがあるかどうかを調べる。

②LSD1はHDACやCoRESTなど様々な因子と結合し、複合体を形成することが知られている。そこで、白血病細胞と正常造血前駆細胞でそのコンポーネントに違いがあるかどうかを、LSD1抗体を用いた免疫沈降法で解析する。

(3) *In vitro*の系で、LSD1の発現変化に伴う染色体転座の頻度の違いを定量する。

①白血球細胞に存在する LSD1 の中で、どのアイソフォームが転座に関与しているのか、またその強発現が必須なのかを解析する。正常造血前駆細胞やリンパ球に LSD1 アイソフォームを人為的に強発現し、放射線によって誘発される染色体変異が増えるかどうかを、FISH および gene binding を用いた染色体解析にて調べる。

②逆に siRNA を用いて LSD1 をノックダウンした場合に染色体異常が減少するかどうかを①と同様の方法で調べる。

③LSD1 はモノアミンオキシダーゼ阻害剤である pargyline や tranlycypromin によって細胞レベルで活性を阻害できることが知られている (PNAS 104:8023, 2007)。この系を用いて同様の実験を行い、放射線誘発染色体変異を抑制できるかどうかを確認する。

(4) *In vivo* の系で、LSD1 の発現変化に伴う染色体異常の頻度の違いを定量する。

①Sca-1 promoter を用いて血球系に特異的に LSD1 を強発現するトランスジェニック (Tg) マウスを本田浩章 博士 (広島大学 原爆放射線研究所) との共同研究で作製する。このマウスにおいて、放射線照射によって染色体転座が高頻度に出現するか染色体解析を行い確認する。合わせて長期間の観察で白血病発症の有無を確認する。また、染色体転座が生じた場合、LSD1 の DNA 結合配列を解析し、転座の起こりやすい位置を解析する。

②初年度の解析で白血病に特異的な LSD1 複合体コンポーネントが同定されれば、LSD1 との double Tg マウスを作製して①と同様の実験を行う。

(5) LSD1 阻害剤による染色体異常の抑制効果を判定する。

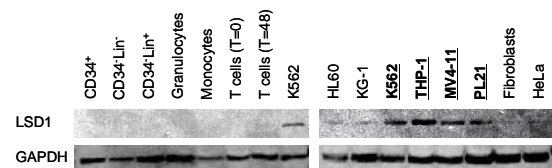
放射線または薬剤による白血病治療後の染色体転座は、臨床的に大きな問題となっている。そこで、1-①、②で作製した放射線

照射 Tg マウスに染色体転座が見られた場合、その転座の形成を LSD1 阻害剤 (pargyline, tranlycypromin) の予防的投与で抑制できるかを調べる。

4. 研究成果

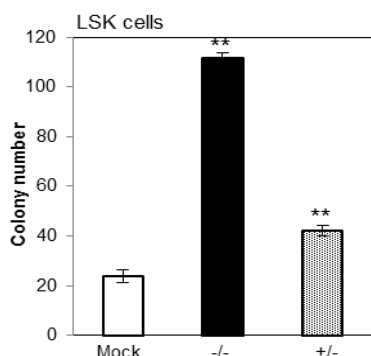
DNA 二重鎖切断部位における LSD1 の局在について γ -H2AX 抗体を用いた共焦点顕微鏡で調べた。正常 T 細胞において LSD1 の発現量は極めて低いが、放射線照射後に γ -H2AX と共局在する傾向が見られた。また、DNA 二重鎖切断による LSD1 の発現量を経時的に調べたが、変化はみられなかった。

次に、正常細胞と白血病細胞における LSD1 の質的・量的異常について調べた。LSD1 タンパクの発現を調べると正常細胞にほとんど発現しておらず、白血病細胞では強発現していた。特に染色体転座を有する白血病細胞ではより強発現していた。哺乳類に発現している



LSD1にはエクソン2とエクソン8にアミノ酸が挿入されることで生じる4つのアイソフォーム (2a-/8a-, 2a+/8a-, 2a-/8a+, 2a+/8a+) が存在する。RT-PCR法にて血液細胞に発現する LSD1を調べると、2a-/8a-と2a+/8a-の2種が存在していた。さらに、CD34+CD38の未分化な造血前駆細胞では2a-/8a-の発現が極めて低く白血病細胞では強発現していた。一方、HEK293細胞にHA-tagを付けたこの2つのアイソフォームを強発現させ、コファクターであるCoRESTとの結合を比較すると、2a-/8a-の方が強いことが分かった。また、H3K4とH3K9のヒストン脱メチル化活性を調べると、2a-/8a-の方が強いことが分かった。さらに、mLSK細胞のCFCアッセイを行うと、2a-/8a-において強い自己複製能が観察された。した

がって、白血病化にはこの2a-/8a-の量的異常が関与していることが推測され、現在骨髄移植モデルを用いて造血器異常について調べている。



一方、染色体異常の頻度の差をIn vivoの系で調べるため、Sca-1プロモーターを用いて造血幹細胞特異的にLSD1を強発現するトランスジェニックマウスを広島大学 原爆放射線研究所 本田浩章教授の指導のもと作製した。これらのマウスをコントロール群と放射線照射群にわけ、経時的に観察し解析を進めている。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計4件)

- (1) Kikuchi, J., Shibayama, N., Yamada, S., Wada, T., Nobuyoshi, M., Izumi, T., Akutsu, M., Kano, Y., Sugiyama, K., Ohki, M., Park, S.-Y. and Furukawa, Y.: Homopiperazine Homopiperazine derivatives as a novel class of proteasome inhibitors with a unique mode of proteasome binding. **PLoS One.** 11;8(4):e60649, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0060649. (査読あり)
- (2) Wada, T., Kikuchi, J. and Furukawa, Y.: Histone Deacetylase 1 Enhances microRNA Processing via Deacetylation of DGCR8. **EMBO Rep.** 13: 142-149, 2012. doi: 10.1038/embor.2011.247. (査読あり)
- (3) Furukawa Y., Hiraoka N., Wada T., Kikuchi J., Kano Y. Mechanisms of action and clinical effectiveness of the newly approved anti-cancer

drug bendamustine. **Nihon Yakurigaku Zasshi.** 138(1):26-32, 2011. https://www.jstage.jst.go.jp/article/fpj/138/1/138_1_26/_article (査読あり)

- (4) Mitsunaga K., Kikuchi J., Wada T., Furukawa Y. Latexin regulates the abundance of multiple cellular proteins in hematopoietic stem cells. **J Cell Physiol.** 227(3):1138-47, 2012. doi: 10.1002/jcp.22834. (査読あり)

〔学会発表〕(計2件)

- ①日本血液学会
- ②XXV IACRLRD

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0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0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

<http://www.jichi.ac.jp/stem/index.html>

http://rseeds.jichi.ac.jp/research_seeds/public/ResearchResultDetail.php?publicId=hwx2x4uhbivib6zka3rgm6fbaxrfg&resultCd=1§ionCd=12
1

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：