

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591390

研究課題名(和文) エピゲノム制御分子を介した白血病の分子病態の解明

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanism in leukemogenesis through an epigenome regulator

研究代表者

小埜 良一 (ONO, RYOICHI)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40422414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、白血病発症と密接に関連するエピゲノム異常に着目し、その制御分子の一つについて、条件的遺伝子欠損マウスを作製し、白血病発症マウスモデルと組み合わせた異常造血の解析や正常造血系の解析を行った。その結果、標的分子の条件的欠損を誘導したところ、白血病発症に関する決定的影響は見出されていないものの、造血幹細胞の自己複製や分化に関する興味深い知見が見出され、現在、詳細な分子生物学的解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：In this study, to focus on epigenetic alterations closely associated with leukemogenesis, I have generated conditional knockout mice of an epigenome regulator, analyzed malignant hematopoiesis of these mice combined with my leukemogenic mouse model, and characterized normal hematopoiesis of the mice. Conditional ablation of the target molecule induced no critical phenotypic changes in leukemogenesis, but led to interesting findings concerning self-renewal and differentiation of hematopoietic stem cells. I am further investigating the molecular mechanisms at the moment.

研究分野：血液内科学

キーワード：白血病

1. 研究開始当初の背景

(1) 白血病など造血器腫瘍の発症の分子メカニズムにおいて、染色体転座、特定遺伝子の変異などのゲノム DNA における塩基配列自体の変異に加え、近年、DNA のメチル化やヒストンのメチル化及びアセチル化などに関連する様々なエピゲノムにおける異常も、同様に重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた(Rodríguez-Paredes M, Esteller M, Nat. Med., 17:330-339, 2011)。実際に、ある種の造血器腫瘍において、機能変異が見出されているエピゲノム制御分子として、DNA 脱メチル化に参与する TET2 などは、その変異を再現した遺伝子改変マウスモデルで、腫瘍の発症が生じ、発症における様々な分子機構が解析されている(Moran-Crusio K et al., Cancer Cell, 20:11-24, 2011;他 3 報)。一方で、そうした変異のないエピゲノム制御分子として、ヒストン脱メチル化酵素活性を有する LSD1 などでは、その機能を喪失させるノックアウトマウスモデルと別の白血病マウスモデルを組み合わせ、白血病発症に重要な役割を果たすことなど、重要な知見が得られてきている(Harris WJ, et al., Cancer Cell, 21:473-487, 2012)。さらに、エピゲノムの異常に起因する分子経路を標的とした分子標的療法の可能性も、創薬の観点から注目されている。

(2) 基礎研究における、エピゲノム制御の分子機構も、近年急速に進行している。そうした中でも、DNA メチル化の制御における分子機構の解明は大幅に進展し、その制御に関わる分子群として、TET2 や DNMT3a のような疾患と直接関連する分子群が同定され、その分子生物学的性状の解析も精力的に進められている。しかしながら、こうした分子群は多彩で有り、詳細な機能解析もなされていないものも少なくなく、疾患との関連性にも未解明な点がまだ多く残されている。

(3) しばしば、腫瘍における癌幹細胞は、異常な形質をもたらす上で、ES 細胞に類似した stemness に関連する分子機構を利用していることが知られている。ES 細胞は、近年、エピゲノム制御分子が重要な役割を果たしていることが次々に報告されているが、そうした分子の一つで、我々の先行研究における幹細胞由来の白血病で異常高発現を来す(未発表データ)分子に着目した。この白血病関連エピゲノム制御分子(以下 Leukemia-related epigenetic regulator; Ler)は、機能的には、DNA メチル化制御に関わる分子群の類縁分子に分類されるとされているが、それ以外の分子機序を介してエピジェネティックな働きも示唆されるなど未解明な点が少なくない上、白血病と関連した詳細な分子生物学的検討も、ほとんどなされていなかったため、以下のような研究に着手した。

2. 研究の目的

(1) こうした研究当初開始の背景を踏まえ、本研究では、まず、これまで報告のない Ler の条件的ノックアウトマウスを新規に作製し、これまでに確立し報告してきた白血病モデルマウスや白血病幹細胞の実験系(Ono et al., J Clin Invest, 115:919-929, 2005; Ono et al., Leukemia, 23:2197-2209, 2009; Ono et al., Blood, 122:1271-1283, 2013)と組み合わせ、白血病発症において Ler が果たす分子生物学的な役割を明らかにする。

(2) 正常造血における Ler の役割についても、上記異常造血における役割の解明の対照として、分子生物学的な解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 定法に基づき、以下のようにして、 $Ler^{flox/flox}$ マウスを制作する。まず、Ler の機能に重要なドメインをコードする遺伝子配列領域に loxP 配列が順方向に 2 箇所挿入されるように、PCR 法で増幅してサブクローニングした Ler のゲノム塩基配列断片を用いて、targeting vector を構築し、ES 細胞に遺伝子導入を行う。適宜薬剤選択を行い、得られた各クローンについて、PCR 法や Southern blot 法にて、正確に導入されたクローンを選抜する。さらに、核型の異常がないことを確認した後、blast cyst injection 法で、キメラマウスを得る。キメラマウスは、ES 細胞と同系統のマウスと交配し、(以下も同様に)PCR 法等にて解析して、Germ line transmission が判明した F1 マウスを得る。F1 マウスは Flp deleter マウスと交配し、frt 配列で挟まれた targeting vector 由来の ES 細胞の選択薬剤耐性遺伝子カセットの除去が判明した F2 マウスを得る。F2 マウス同士を交配し、Flp を有さず、loxP 配列を両アレルに有することが判明した F3 マウスを $Ler^{flox/flox}$ マウスとする。なお、F1 で純系に戻り、以下全て同一系統のマウスとの交配となるため、戻し交配は行わない。

(2)(3) 以下に先行して、 $Ler^{flox/flox}$ マウスの造血幹・前駆細胞を採取して、レトロウイルスを用いて CreER を遺伝子導入して、タモキシフェンで Cre 活性を誘導し、in vitro のコロニー活性における影響を検討する。また、Cre の誘導前後に、レトロウイルスにて白血病関連遺伝子を導入して、Ler の機能欠損に伴う影響を、in vitro のコロニーアッセイを用いた不死化能に対する影響や、in vivo の骨髄移植における病型に対する影響について、解析する。

(3) 一方で、生体により近い知見が得られる Ler の個体レベルでの条件的ノックアウトを実現するために、薬剤で Cre 活性を誘導可能な MX-Cre トランスジェニックマウスや Rosa26-CreERT2 ノックインマウスと $Ler^{flox/flox}$ マウスを交配し、 $Ler^{flox/flox}$ conditional knockout (MX-cKO);

CreERT2-cKO)マウスを完成させる。それぞれ poly (I:C)やタモキシフェンを投与し、血球系細胞における loxP 配列間の相同組み換えを確認する。

(4)(2)同様に、Cre の活性を誘導した後に、cKO マウスの骨髓細胞を採取して、レトロウイルスにて白血病関連遺伝子を導入し、Ler の機能欠損に伴う影響を、in vitro のコロニーアッセイを用いた不死化能に対する影響や、in vivo の白血病発症モデルにおける病型に対する影響について、解析する。

(5) cKO マウスで、Cre の活性を誘導した後に、経時的に末梢血、骨髓、脾臓、胸腺など造血系における表現型を解析する。元々、幹細胞で高発現していることから、cKO 由来造血幹細胞を骨髓移植して、正常造血に関する自己複製能や分化能も検討する。

4. 研究成果

(1) ES 細胞に targeting vector を遺伝子導入して、適宜薬剤選択を行い、96 クローンを得た。まず、PCR 法を用いて、短腕側に関し、スクリーニングして、35 クローンを獲得し、これらに関して遠位 loxP 配列の保持を検討し、23 クローンを得た(図1)。

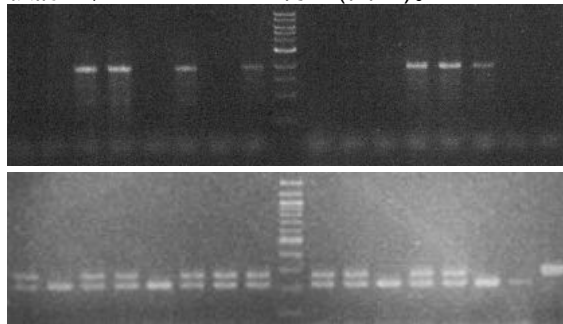


図1 各 ES クローンのスクリーニングの代表的な結果(上段:短腕、下段:loxP 配列)。上段ではバンドの検出できたものが陽性である。下段では、一番右が targeting vector そのもの、右から二番目が野生型ゲノム DNA で、ヘテロに遺伝子導入された結果、2 本バンドを検出できたものが遠位 loxP 配列を保持している。

次に 23 クローンに関して、長腕側も PCR 法で予備的に検討して、16 クローンが判明し、その内の 12 クローンについて、細胞の増殖に影響のない 6 クローンを選抜した。この 6 クローンは全て核型に関する顕著な異常は認められず、Southern blot 法にて遺伝子再構成を検討した(図2)。

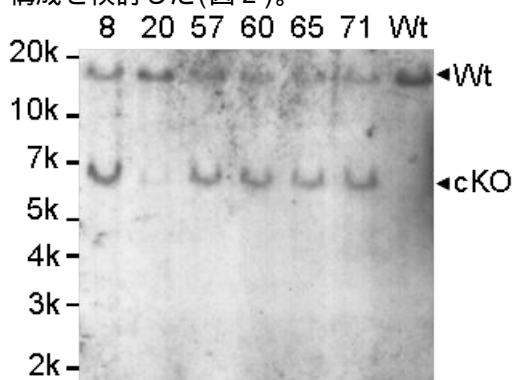


図2 最終選抜 ES クローンにおける遺伝子再構成の検出。6 クローン中、クローン 20 以外の 5 クローンで、想定通りの再構成を検出した。(なお、この図に示したのは 5' 側プロンプによる結果であるが、3' 側や選択薬剤のプロンプを用いても、想定通りの結果を確認できている。)

クローン 57,60,65,71 について、blast cyst injection を行った結果、いずれからもキメラマウスが得られた。ES 細胞と同系統のマウスと交配し、クローン 57,71 の F1 に関して、Germ line transmission が確認された。Flpe マウスとの交配で選択薬剤耐性遺伝子カセットを除去したマウス同士を交配して、Flp は有さず、loxP 配列を両アレルに有することが判明した $Ler^{flox/flox}$ マウスを 2 line ほど樹立し、以下の検討に用いた。

(2) 樹立した flox マウスから、造血幹・前駆細胞を採取し、レトロウイルスを用いて Cre 活性による相同組み換えを確認した。この細胞は、colony replating assay にて不死化には至らなかった。次に、*MLL-ENL* 融合遺伝子を同様に遺伝子導入し、colony replating assay にて不死化をはかる過程で Cre 遺伝子も導入して検討した(図3)。造血前駆細胞のそれと比較して、造血幹細胞を含む細胞分画では、不死化後に Cre 活性誘導において、コロニー形成能が低下する傾向があった(図4)。さらに、骨髓移植実験による in vivo の検討を行う予定であったが、以下に述べる相反する結果が得られたため、行わなかった。

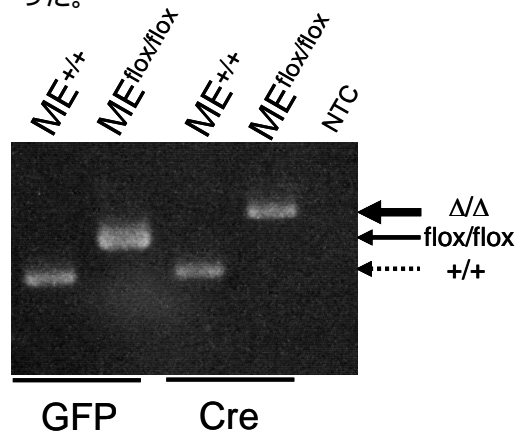


図3 Creによる flox/flox 領域の相同組み換え。上段に示す各 genotype について *MLL-ENL* による不死化細胞(ME)に、下段に示す遺伝子を導入して得られた細胞のゲノム DNA を定法に従って 3 プライマー-PCR で解析した結果を示す。

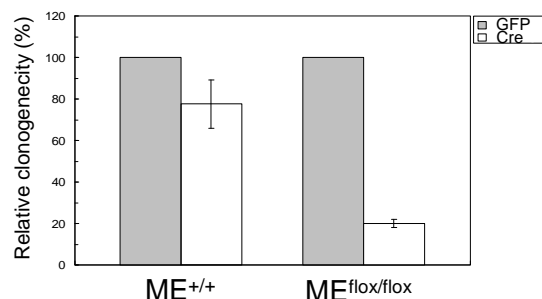


図4 ノックアウトによるコロニー形成能の変化。各 genotype について *MLL-ENL* による不死化細胞(ME)に、GFP または Cre を導入し細胞のコロニー形成能の結果を示す。

(3) MX-Cre トランスジェニックマウスとの交配による、Mx-cK0 マウスの樹立は困難であったが、最終的に樹立した。一方、CreERT2 ノックインマウスの入手自体に予想外の時間を要したが、予定通り、CreERT2-cK0 マウスも樹立した。どちらの cK0 マウスも Cre 活性誘導により、想定通りの再構成を認めた。なお、こうした経緯のため、主に Mx-cK0 マウスを以下の解析に用いた。

(4) あらかじめ Cre 活性を誘導した Mx-cK0 マウスから、造血幹・前駆細胞を採取し、(2) 同様にレトロウイルスを用いて、*MLL-ENL* 融合遺伝子など白血病関連遺伝子を遺伝子導入して不死化する過程における影響を検討した。(2) の結果に反して、全く影響が認められなかった。(2) では Cre の細胞毒性が否定しきれないこともあり、第三の系として、現在 CreERT2-cK0 マウスにおける検討で最終的な結論を得る予定である。さらに、既報の *MLL-ENL* 白血病発症モデルマウス(Ono et al., 2013)との交配実験でも、現在までの観察期間及び匹数において、白血病発症能を減弱させるデータは得られていない。

(5) 造血系全般に関しても、主に MX-cK0 マウスを用いて、in vivo における影響を検討した。これまで解析した範囲では、生理的条件下において、明らかな末梢血球、骨髓造血幹・前駆細胞、脾臓及び胸腺細胞における明らかな影響は検出できなかった。ただし、観察期間が十分ではない可能性も有り、引き続き、さらなる経時的追跡を行っていく予定である。一方、骨髓細胞移植モデルにおいては、自己複製能や多分化能に影響を及ぼしていることを示唆する予備的データも得られており、今後、詳細な解析を行う予定である。

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3件)

Ono R, Masuya M, Nakajima H, Enomoto Y, Miyata E, Nakamura A, Ishii S, Suzuki K, Shibata-Minoshima F, Katayama N, Kitamura T, and Nosaka T. Plzf drives MLL-fusion-mediated leukemogenesis specifically in long-term hematopoietic stem cells. *Blood*, 122:1271-1283, 2013, 査読有.

Shimozawa N, Ono R, Shimada M, Shibata H, Takahashi I, Inada H, Takada T, Nosaka T, and Yasutomi Y. Cynomolgus monkey

induced pluripotent stem cells established by using exogenous genes derived from the same monkey species. *Differentiation*, 85: 131-139, 2013, 査読有.

Liu B, Ohishi K, Orito Y, Nakamori Y, Nishikawa H, Ino K, Suzuki K, Matsumoto T, Masuya M, Hamada H, Mineno J, Ono R, Nosaka T, Shiku H, and Katayama N. Manipulation of human early T lymphopoiesis by coculture on human bone marrow stromal cells: potential utility for adoptive immunotherapy. *Exp Hematol*, 41: 367-376, 2013, 査読有.

[学会発表](計4件)

Kobayashi K, Yamaguchi M, Miyazaki K, Imai H, Yokoe K, Ono R, Nosaka T, and Katayama N. Expression of LM03 and SNAP25 in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Cells and Its Relation to Clinical Features. 第56回アメリカ血液学会、2014年12月7日、米国カルフォルニア州サンフランシスコ.

小埜良一、榎屋正浩、片山直之、野阪哲哉. 白血病発症における Plzf による異常な自己複製をもたらし新規分子機構の解析. 第76回日本血液学会学術集会、2014年11月2日、大阪国際会議場(大阪府大阪市).

小埜良一、野阪哲哉. An aberrant self-renewal program driven by Plzf is critical for leukemic transformation of hematopoietic stem cells by MLL fusion gene. 第65回日本細胞生物学会大会、2013年6月20日、愛知県産業労働センター ウィンクあいち(愛知県名古屋市).

小埜良一、榎屋正浩、中島秀明、榎本豊、宮田恵里、中村彰秀、石井聡美、鈴木圭、片山直之、北村俊雄、野阪哲哉. MLL 融合遺伝子は Plzf による異常な自己複製機構を介して造血幹細胞を癌化する. 第74回日本血液学会学術集会、2012年10月19日、京都国際会館(京都府京都市).

[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：
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
<http://www.medic.mie-u.ac.jp/microbiol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小埜 良一 (ONO RYOICHI)
三重大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：40422414

(2) 研究分担者

なし
()

研究者番号：

(3) 連携研究者

野阪 哲哉 (NOSAKA TETSUYA)
三重大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：30218309