

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09452

研究課題名(和文) 正常・異常造血におけるDNAメチル化制御分子を介した未分化性維持の新規分子機構

研究課題名(英文) Novel molecular mechanism of maintenance of stemness through a DNA methylation regulator in normal and malignant hematopoiesis

研究代表者

小埜 良一 (Ono, Ryoichi)

三重大学・医学系研究科・講師

研究者番号：40422414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、近年、重要な機能的役割が次々と明らかにされているエピジェネティックな遺伝子の制御機構において、いまだ未解明な点が多い一つのDNAメチル化制御分子に注目し、正常・異常造血における未分化性維持の分子機構の解析を行った。その結果、特に、新たに条件的遺伝子欠損や誘導型遺伝子発現を組み合わせるなどした白血病発症マウスモデルを構築し、分子生物学的解析を行ってみたところ、従来明らかになっていなかった研究対象分子の、異常造血と強く関連する興味深い性状が浮かび上がってきた。現在、この性状に関する、詳細な解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：Recently, emerging evidence has revealed the important role of epigenetic regulation of gene expression. In the present study, I analyzed molecular mechanism of maintenance of stemness in normal and malignant hematopoiesis through a DNA methylation regulator, in which little was still known about its function. Molecular and biological analysis of several new mouse models of leukemia using conditional ablation and inducible expression of the regulator highlighted an interesting characteristic closely associated with malignant hematopoiesis, which had not been elucidated yet. Currently, I am investigating this property extensively.

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) ゲノム DNA のメチル化やヒストンの各種修飾等のエピジェネティックな制御機構を介した遺伝子発現の調節は、様々な生物学的プロセスにおいて重要な役割を担っており、こうした制御の破綻は疾患を引き起こしうるものが、近年、次々と明らかにされている(Chen T, Dent SY. *Nat Rev Genet*,15:93-106, 2014)。実際に、ヒストンやゲノム DNA のメチル化の制御について、そのメチル化あるいは脱メチル化に関する酵素やエピジェネティックコードの同定、それに関連した種々の分子生物学的な機能解析が精力的に行われてきた。例えば、本研究の注目する造血器腫瘍においては、ゲノム DNA のメチル化酵素活性を有する DNMT3a やゲノム DNA の脱メチル化酵素活性を有する *TET2* の変異が比較的高頻度に認められることが判明した。この報告に基づき、実際の *TET2* の機能喪失型変異を遺伝子導入したマウスが作製され、骨髄球系またはリンパ球系における分化や増殖の異常を伴った類似病態を呈することも判明した。さらに、*TET2* の遺伝子変異を有するヒトの白血病の症例のクローン解析なども踏まえて、これらの変異の獲得が前白血病状態として位置づけられている(E Solary ら. *Leukemia*, 28:485-496, 2014)。

(2) 一方で、変異の報告のないエピジェネティック機能遺伝子に関しても、白血病を含めた悪性腫瘍の分子病態において、重要な役割を担っていることも明らかとなってきた。例えば、ヒストン脱メチル化酵素活性を有する *LSD1* に関して、そのノックアウトマウスモデルを用いるなどして、白血病の発症において重要であることが報告されている。(Harris WJ, et al., *Cancer Cell*, 21:473-487, 2012)。これらの知見から、エピジェネティックな遺伝子制御を介した分子経路を標的とする分子標的療法が、創薬の観点からも、注目を集めている。

(3) 本研究では、以前に報告した幹細胞特異的白血病発症モデルマウスを用いた先行独自研究において、異常高発現を来すことの判明した白血病関連エピゲノム制御分子(以下 *Leukemia-related epigenetic regulator*; *Ler*)に、引き続き、注目した。*Ler* は、ES/iPS 細胞における未分化性に重要な関与をしていることや、造血幹細胞においても高発現していることから、造血器腫瘍における重要な役割が想定され、別の先行関連研究では、我々とは全く異なる白血病発症モデルマウス系では必須の働きをしているとする報告がなされた。ところが、我々が既に独自に樹立した *Ler* のコンディショナルノックアウトモデルと既報の幹細胞特異的白血病発症モデルマウスと組み合わせたモデルマウスにおいて、当初同様と思われる結果が得られたが、その後解析を

進めていく過程で、既報とは明らかに異なる結果が得られた。以上のことから、正常造血のみならず、白血病発症の分子基盤における、*Ler* の役割の詳細な解析が必要と考えられ、以下のように、研究を行った。

2. 研究の目的

(1) こうした上記のこれまでの研究の経緯や背景を踏まえて、本研究では、我々独自のマウスモデルをベースにした交配を行い、造血幹細胞由来で、より生理的条件下に近い *in vivo* 白血病発症モデル系を構築し、その詳細な解析を通じて、白血病発症における *Ler* の分子生物学的役割を明らかにすることを目的とした。

(2) (1) の交配の過程で得られる、*Ler* コンディショナルノックアウトマウスを用いて、正常造血における *Ler* の役割の解明に取り組むことも目的とした。

3. 研究の方法

(1) *in vivo* での白血病発症及び *Ler* のノックアウトを実現するために、既に報告した誘導型 *MLL-ENL* 発現トランスジェニックマウスと、独自に作製し、種々の予備的検討を終えた *Ler*^{fllox/fllox} マウスと、*Mx-Cre* トランスジェニックマウスまたは *Rosa26-CreERT* ノックインマウスの二者あるいは三者の遺伝子を受け継ぐ白血病モデルマウスを、交配を通じて、作製する。得られた各種モデルマウスは、poly(I:C)またはタモキシフェンの腹腔内投与を行い、*Cre* の酵素活性による適切な組み替えが生じていることを、末梢血などを採取して、ゲノム DNA の PCR 等にて確認し、以下の解析に使用する。

(2) *Cre* 活性誘導後の、末梢血の血球数及び白血球分画や、骨髄の有核細胞数及び各種造血幹・前駆細胞の分画について、FACS 機器を用いるなどして、経時的にその推移を解析する。また、種々の分画の細胞を FACS Aria にて採取し、コロニーアッセイを行い、自己複製能を中心に検討する。

(3) 白血病発症モデルマウスでは、発症に至るか否かを慎重に観察・追跡し、発症して死亡する場合は、死亡に至る潜伏期間を記録し、死亡したマウスの骨髄、脾臓、胸腺等を解析して、白血病の表現型を評価する。また、得られた上記臓器由来のサンプルから、RNA やゲノム DNA を抽出し、網羅的な遺伝子解析に供する。

(4) 血球特異的な表現型及びその分子メカニズムを解析するため、各種モデルマウス由来の骨髄を採取して、致死放射線量を照射した同系マウスに対する骨髄移植実験を行う。移植後のレシピエントマウスは、4-5 週後に、末梢血を採取して、FACS 解析等にて生着を

確認し、以後、(2)(3)と同様に観察、追跡し、適宜必要な解析を行う。その際、移植前、移植後といった異なるタイミングで、ノックアウト及びMLL-ENL発現を行い、適宜比較検討を行う。また、in vivo における自己複製能を評価するため、二次移植を施行して、生着率等を評価していく。一方、定期的 5-フルオロウラシルの腹腔内投与実験も通じて、別の角度からも、造血幹細胞の自己複製能は評価する。

4. 研究成果

(1) まず、既に得ていた *Ler^{flox/flox}* マウスと *Mx-Cre* トランスジェニックマウス、または *Rosa26-CreERT* ノックインマウスの交配を行った。得られた各複合遺伝子改変マウスに対し、それぞれ poly(I:C)またはタモキシフェンの腹腔内投与を行い、末梢血の PCR を行ってみたところ、前者では組み替えが不十分であったのに対し、後者では組み替えの効率が良好であった。しかも、前者は、しばしば誘導以前の leak 活性に伴う background の組み替えが認められたため、以下の主要な実験においては、*Rosa26-CreERT* ノックインマウスの交配から得られた複合遺伝子改変マウスを実験に用いることにした。さらに、*Rosa26-CreERT* ノックインマウスあるいは、上記複合マウスと誘導型 *MLL-ENL* 発現トランスジェニックマウスを交配して得られた各白血病発症モデルマウスも以下の実験に用いた。また一部の実験では、flox/+の遺伝子座のマウスを用いて、ヘテロ欠損の影響も評価した。

(2) こうして構築した種々のコンディショナルノックアウトマウスや白血病発症モデルマウスに対して、タモキシフェンの腹腔内投与を行い、経時的観察を行った。白血病発症モデルマウスでは、ノックアウトの有無にかかわらず、同様な表現型の白血病を呈し、タモキシフェン投与後約1-4ヶ月程度で、全例死亡した(図1、2)。ところが、詳細に死因を解析すると、一部に心疾患を合併するものが含まれており、単に白血病による腫瘍死と断定できないと考えられたため、in vivo におけるさらなる詳細な解析は、骨髄移植にて骨髄キメラマウスを作製し、血球特異的な遺伝子改変における検討を次々項のように行うこととした。一方で、同様な時系列の範囲内では、検討した単なるコンディショナルノックアウトマウスに関しては、末梢血及び骨髄細胞における有意な変化は、出現しなかった。

(3) 次に、各種モデルマウス由来の骨髄から、種々の造血幹・前駆細胞を含む分画を採取し、4-ヒドロキシタモキシフェンを添加し、ノックアウトかつ、または *MLL-ENL* 発現を誘導しつつ、サイトカイン存在下にコロニーリプレATINGアッセイを行ってみた。以前、我々が報告したレトロウイルスによる Cre 活性を導入した結

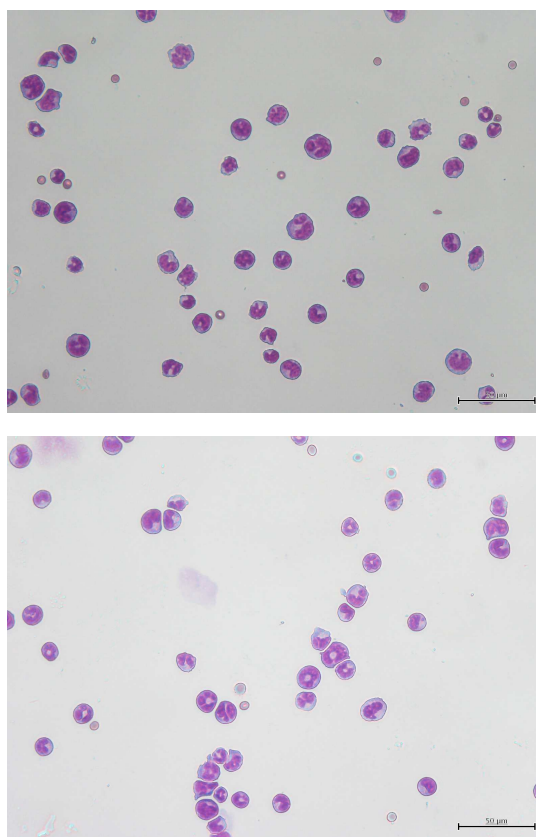


図1 白血病モデルマウスで生じた白血病細胞のサイトスピン標本。(上) ノックアウト由来、(下) 野生型由来。

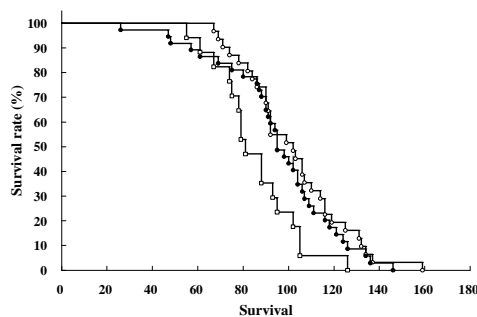


図2 白血病モデルマウスにおける、生存曲線。ノックアウト(黒丸)、ヘテロ欠損(白四角)、野生型(白丸)。横軸の単位は日数。

果と同様に、本研究の白血病モデルマウスの系でも、幹細胞を含む分画由来のみが不死化を来し、ノックアウトの有無は、有意な影響をもたらさなかった。この点は、先行関連研究とは相反する結果であった。しかも、方法論的に相似させるために、レトロウイルスを用いる不死化の実験系での検討も行ったが、同様に影響はなかった。従って、重要な知見の可能性があると考え、次項以下のような in vivo モデルからの研究を進めていくこととした。その一方で、単なるコンディショナルノックアウトでは、不死化を来すことはなかった。この結果と関連して、コンディショナルノックアウト

モデルマウスで、ロックアウト誘導後の定期的 5-フルオロウラシルの腹腔内投与実験においても、造血能の有意な変化に伴う影響は認められなかった。

(4) 以上の結果を踏まえながら、各種の複合遺伝子改変マウスの骨髄を、骨髄移植し、骨髄キメラマウスを作製し、タモキシフェン投与によるロックアウトかつ、または *MLL-ENL* 発現の誘導を行った。この実験系でも、コンディショナルロックアウトのみでは致命的腫瘍性疾患を生じることにはなかった。また、末梢血及び骨髄細胞においても、対照群と比較して、有意な変化は出現しなかった。そこで、少数例に関して、さらなる二次移植実験を行い、造血における自己複製能や分化能における検討を行って見たところ、興味深い影響の可能性が示唆される結果が得られた。この結果に関して、本研究の研究期間内に報告のあった他の研究グループの関連研究とも矛盾しない結果と考えられ、今後、検討数を増やし、再現性が確認されれば、その分子メカニズムの検討も行っていきたいと考えている。

(5) 一方で、白血病発症マウスモデルの骨髄を用いて構築した、骨髄キメラマウスにおいては、(3) の結果と関連して、ロックアウトした方が、白血病発症に至る潜伏期が短縮する傾向があった。この傾向は、ヘテロ欠損においても、同様であった。また、白血病の表現型を検討すると、幾つかの点での、興味深い差異の可能性が示唆された。こうしたことから、これまでに報告のない、何らかの新たな分子メカニズムの存在が想定されたため、網羅的遺伝子解析を施行した。その結果、白血病発症において重要な役割を果たす遺伝子において、その発現に有意な変化を生じているものが幾つか見つかかり(図3)、現在、エピゲノムにおける解析をふまえた統合的解析を行い、Ler の白血病発症における分子生物学的役割を詳細に検討しているところである。

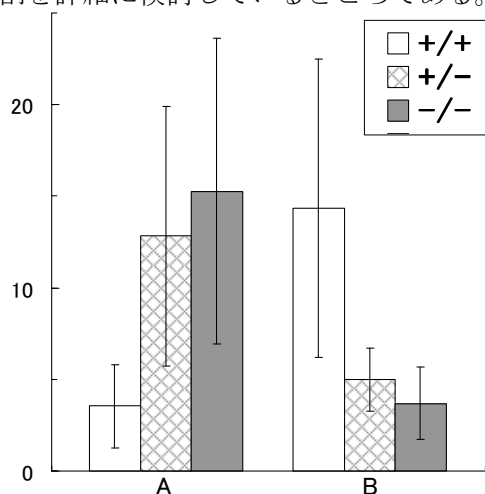


図3 白血病の潜伏期の変化と関連性が示唆される遺伝子 A, B の発現レベルの変化

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 4 件)

1. Ono R, Masuya M, Ishii S, Katayama N, and Nosaka T. Eya2, a target activated by Plzf, is critical for *PLZF-RARA*-induced leukemogenesis. *Mol. Cell. Biol.*, 37:e00585-16, 2017, 査読有, doi: 10.1128/MCB.00585-16.
2. Takeuchi, T, Yamaguchi M, Kobayashi K, Miyazaki K, Tawara I, Imai H, Ono R, Nosaka T, Tanaka K, and Katayama N. *MYD88*, *CD79B*, and *CARD11* gene mutations in CD5-positive diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer*, 123:1166-1173, 2017, 査読有, doi: 10.1002/cncr.30404.
3. Kobayashi K, Yamaguchi M, Miyazaki K, Imai H, Yokoe K, Ono R, Nosaka T, and Katayama N. Expressions of SH3BP5, LMO3, and SNAP25 in diffuse large B-cell lymphoma cells and their association with clinical features. *Cancer Med.*, 5:1802-1809, 2016, 査読有, doi: 10.1002/cam4.753.
4. Kitamura T, Watanabe-Okochi N, Enomoto Y, Nakahara F, Oki T, Komeno Y, Kato N, Doki N, Uchida T, Kagiya Y, Togami K, Kawabata KC, Nishimura K, Hayashi Y, Nagase R, Saika M, Fukushima T, Asada S, Fujino T, Izawa Y, Horikawa S, Fukuyama T, Tanaka Y, Ono R, Goyama S, Nosaka T, Kitaura J, and Inoue D. Novel working hypothesis for pathogenesis of hematological malignancies: combination of mutations-induced cellular phenotypes determines the disease (cMIP-DD). *J. Biochem.* 159:17-25, 2016, 査読有, doi: 10.1093/jb/mvv114.

[学会発表] (計 4 件)

1. Ono R, Masuya M, Ishii S, Katayama N, and Nosaka T. Eya2 is critical for an aberrant self-renewal in *PLZF-RARA*-induced leukemogenesis. 第 79 回日本血液学会学術集会, 2017 年 10 月 22 日, 東京国際フォーラム(東京都千代田区).
2. Takeuchi T, Yamaguchi M, Kobayashi K, Miyazaki K, Imai H, Ono R, Tawara I, Nosaka T, Tanaka K, and Katayama N. *MYD88*, *CD79B*, and *CD79A* Gene

Mutations in CD5-Positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma. The 58th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, 2016年12月3日, カルフォルニア州サンディエゴ (米国).

3. 小椋良一、梶屋正浩、石井聡美、片山直之、野阪哲哉. PLZF 関連白血病発症における新規分子機構の解析. 第78回日本血液学会学術集会, 2016年10月15日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).
4. 小林 恭子, 山口 素子, 宮崎 香奈, 今井 裕, 小椋 良一, 野阪 哲哉, 片山 直之. びまん性大細胞型B細胞リンパ腫細胞における SH3BP5, LM03, SNAP25 発現と臨床病態との関連. 第77回日本血液学会学術集会, 2015年10月10日, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市).

〔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:
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

小椋 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

(4) 研究協力者

なし

()