

令和 3 年 4 月 16 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08352

研究課題名(和文) 白血病発症過程におけるDNA脱メチル化関連分子の果たす機能的役割の統合的理解

研究課題名(英文) Integrative understanding of the functional role of DNA demethylation-associated molecule in the process of leukemic initiation

研究代表者

小埜 良一 (Ono, Ryoichi)

三重大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：40422414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、白血病を含めた悪性腫瘍の発症の分子機構において、重要な役割を果たしていることが次々に報告されてきている、エピジェネティックな遺伝子発現の制御機構に着目し、いくつかの白血病マウスモデル系を駆使して、様々な分子生物学的解析を行った。その結果、急性前骨髄球性白血病に関しては、*in vitro*のモデル系において、DNAの脱メチル化関連分子の一つの発現喪失がその発症に寄与する可能性が示唆された。一方で、急性骨髄性白血病に関しては、上記分子の発現喪失は、主たる分子病態に影響を来たさなかった。エピジェネティックな制御分子の機能的側面の複雑さの一端をとらえたと考え、更なる詳細な解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

白血病は、血液の「がん」であり、強力な治療法が開発された今日においても、根治が困難なケースが存在する。そうした場合の切り札の一つが、白血病細胞に非常に特徴的な性質を攻撃する分子標的療法である。本研究では、近年白血病の発症に重要な役割を担うことが判明してきた、ゲノムDNAの化学的修飾の一つ、メチル化に関連した解析を行い、ある種の白血病では、そうしたメチル化を取り除く分子が白血病発症に一定の寄与をしているようであるが、別のタイプではしてないと考えられ、この種の分子を分子標的とするには、さらなる詳細な解析を要すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the epigenetic mechanism controlling gene expression, which has been reported to play an important role in the molecular mechanism of oncogenesis including leukemogenesis, and performed various molecular biological analyses using several leukemia mouse model systems. Consequently, it was suggested that ablation of one of DNA demethylation-associated molecules contributed to the development of acute promyelocytic leukemia in an *in vitro* model system. On the other hand, in acute myeloid leukemia, ablation of the above molecule did not affect the main molecular pathogenesis. It is considered that we have found a part of the complexity of the functional aspects of epigenetic regulatory molecules, and we are planning to do further detailed analysis.

研究分野：血液腫瘍学

キーワード：造血器腫瘍

1. 研究開始当初の背景

(1) ゲノム DNA のメチル化等を含むエピジェネティックな遺伝子発現制御機構は、様々な生物学的プロセスにおいて、重要な役割を担っている(Chen T ら. *Nat Rev Genet*,15:93-106, 2014)。近年、従来詳細不明であった DNA の能動的脱メチル化経路における、申請者らが白血病関連遺伝子として単離同定した(Ono ら. *Cancer Res*, 62:4075-4080, 2002)LCX/TET1 を含む TET family (TET1-3)の関与が報告されて(Nabel CS ら. *Science*, 333:1229-1230, 2011)以来、TET 分子の役割に注目した分子生物学的研究が精力的に行われてきた。その結果、例えば Tet1 では、ES 細胞において未分化性の維持及び自己複製能と関連した重要な役割を果たすことや、生体でも発生段階、造血系、神経系、腫瘍発症などにおいて重要な役割を有することなど、興味深い知見が急速に蓄積されている(Wu X ら. *Nat Rev Genet*,18:517-534, 2017)。一方、各 Tet KO マウスの解析などから、腫瘍発症における Tet1 の役割に関して相反する報告がされたり、そもそも TET が単なる脱メチル化関連酵素ではない可能性、TET の酵素活性によって 5-methyl-C(5mC)から生じる 5-hydroxy-methyl C (5hmC)が、「不要なメチル化を防止する」等を意味する新たなエピジェネティックコードである可能性、複数アイソフォームのある Tet1/3 では各アイソフォームの使い分けが重要である可能性など、新たな疑問点も出現している(Rasmussen KD ら. *Genes Dev*, 30:733-50, 2016)。こうした背景から、Tet1 の、腫瘍細胞のコンテキストに応じて果たす機能的役割を明確にし、その上で、その作用と関連したトランスクリプトームと相関するエピゲノム上の変化を同定し、アイソフォームなどとも関係した未解明の分子機構などの想定などにおける、さらなる解析の必要性があった。

(2) 一方で、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研究(Ono ら. *Blood*, 122:1271-1283, 2013)において、異常な高発現を来すことの判明した分子の一つに、Tet1 が含まれていたため、注目し、そのコンディショナルノックアウトマウスを作製し、種々の分子生物学的解析を進めてきた。その過程で、Tet1 の多面的な分子機能の可能性から、別の発症分子機構を有する白血病モデル系における検討により、Tet1 の白血病発症の分子メカニズムにおける役割を多角的に解析する必要性も生じていた。そうした中で、急性前骨髄性白血病の発症において、Tet 分子の対極に位置する DNA methyltransferase 3A が必須の役割を果たしているとする先行研究(Cole CB ら. *J Clin Invest*, 126:85-98, 2016)が報告されたことから、DNA メチル化の制御がその分子病態において重要であると考えられる病態を想定し、急性前骨髄性白血病と従来のモデル系の急性骨髄性白血病における統合解析を立案した。

2. 研究の目的

本研究は、申請者が独自に作製しておいた Tet1 コンディショナルノックアウトマウスを用いて、Tet1 における特徴的な白血病発症メカニズムを想定して、Tet1 の高発現を来す白血病モデル(Ono ら. *Blood*, 122:1271-1283, 2013)等を含めた複数のモデル系を新たに構築し、白血病発症の分子病態の解析を行い、先行して得てきている解析結果と比較検討して、腫瘍細胞のコンテキストと相関する Tet1 の役割を解明し、その結果を踏まえて、エピゲノム制御のみならず、他の可能性も想定した機能解析を行い、TET 分子群の機能的役割に関する統合的理解に役立てることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 申請者が独自に樹立した Tet1 コンディショナルノックアウト (*Rosa26-CreERT2/Tet1^{fllox/fllox}*)マウスから、骨髄の造血幹細胞、未分化造血前駆細胞、骨髄球系前駆細胞など種々の分化段階の細胞を、FACS Aria で分画採取し、急性前骨髄性白血病の主要な原因キメラ遺伝子 *PML-RARA* と、急性骨髄性白血病の原因キメラ遺伝子の一つ *MLL-ENL* を、レトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入する。導入後、既報(Ono ら. *Mol Cell Biol*, 37:e00585-16, 2017)のように Colony replating assay により、サイトカイン存在下で無限継代可能な不死化細胞を作製する。その際、幾つかのタイミングで、ノックアウトを誘導し、不死化能における表現型への影響を解析する。

(2) (1) と対照しつつ、Tet1 コンディショナルノックアウトマウスと、条件的 *MLL-ENL* 発現による幹細胞特異的白血病発症モデルマウスを交配した複合型遺伝子改変マウスに関しても、(1) と同様に種々の分化段階の細胞を、FACS Aria で分画採取して、*MLL-ENL* の発現とノックアウトを同時に誘導しつつ、Colony replating assay により、サイトカイン存在下で無限継代可能な不死化細胞の作製を試み、不死化能と関連する表現型への影響を検討する。

(3) 一方で、*in vivo* 実験系として、これらの遺伝子導入した種々の造血系細胞を用いて、骨髄移植し、骨髄キメラマウスを作製する。幾つかのタイミングで、ノックアウトを誘導し、白血病発症能における表現型への影響を解析する。同様に、複合型複合型遺伝子改変マウスに関しても、骨髄キメラマウスを作製して、ノックアウトによる影響の解析も行っていく。また、適宜、二次移植による解析も進める。

(4) こうして得られた、種々の不死化細胞や白血病細胞において、表現型への影響も踏まえた、遺伝子発現解析やプロモーターのメチル化等に関する解析を行い、*Tet1* の脱メチル化関連機能との相関に関する検討を行う。

4. 研究成果

(1) まず、*Tet1* コンディショナルノックアウトマウスの造血幹・前駆細胞に、レトロウイルスを用いて *PML-RARA* キメラ遺伝子や、不死化実験系が確立されている *MLL-ENL* キメラ遺伝子を遺伝子導入し、サイトカイン存在下のメチルセルロース培地で継代を二回繰り返すことで、不死化細胞が製作できることを確認した。そして、不死化細胞の培地に、ノックアウトを誘導する4-ヒドロキシタモキシフェンを添加し、コロニー形成能に関する影響を検討した。添加後約1週間の時点で、コロニー形成細胞からゲノムDNAを抽出し、PCRを行って、ゲノムDNA上において想定通りの組み替えが生じ、ノックアウトが効率よく誘導されていることを確認した。*PML-RARA* による不死化細胞では、コロニー形成能が有意とはいえないものの、増強されている傾向が認められたが、*MLL-ENL* による不死化細胞に関しては、コロニー形成能における明確な影響は認められなかった。

(2) 一定の影響が生じた可能性のある *PML-RARA* の遺伝子導入実験に関して、生体内における白血病発症能への影響を検討するために、レトロウイルスで *PML-RARA* を遺伝子導入した *Tet1* コンディショナルノックアウトマウスの造血幹・前駆細胞を、野生型マウスに骨髄移植し、生着後にタモキシフェンを投与して、ノックアウトを誘導し、白血病発症能の検討を行うこととした。ノックアウト自体は、末梢血のゲノムDNAの遺伝子解析により、効率的に起こっていることを確認したが、長期経過観察中、経時的に末梢血中の血球数や表面抗原の発現パターンに有意な変化を見いだすことはできず、両群ともヒトの病態に類似した白血病を発症することはなかった。また、ヘテロ欠損を誘導するノックアウトマウス由来の造血幹・前駆細胞を用いるなど、幾つかの条件検討も行ったが、比較可能な白血病発症モデルマウスが得られなかったため、今後 *PML-RARA* を発現するトランスジェニックマウスと *Tet1* コンディショナルノックアウトによる複合型遺伝子変異マウスの解析を行う予定である。

(3) 次に、*MLL-ENL* による白血病発症の分子機構について、詳細な分子生物学的検討を進めた。まず、別の *MLL* キメラ遺伝子を用いた先行研究グループの報告などに基づき、*MLL-ENL* を遺伝子導入した造血幹・前駆細胞における *Tet1* の発現レベルを検討し、上昇傾向を認め、*MLL-ENL* においてもその下流で *Tet1* の発現上昇を来していることが示唆された(図1)。そこで、改めて、*MLL-ENL* を大過剰発現することなく、造血幹細胞及び前駆細胞で、確実に一定量を発現し、不死化能の検討が可能となる、*Tet1* コンディショナルノックアウトマウスと条件的 *MLL-ENL* 発現による幹細胞特異的白血病発症モデルマウスを交配した複合型遺伝子改変マウスに関しての解析を行った。

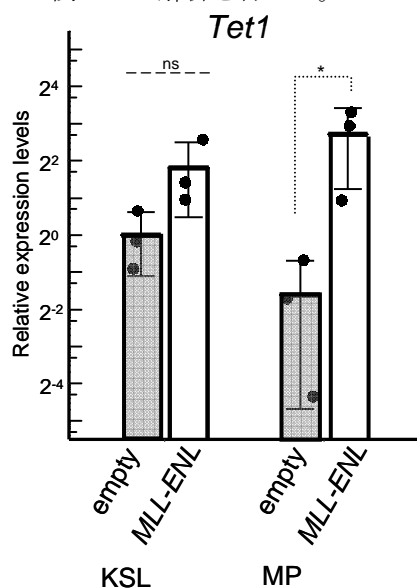


図1 *MLL-ENL* を遺伝子導入した造血幹細胞(KSL)及び骨髄球系前駆細胞(MP)における *Tet1* の発現レベル。(ns, 有意差なし; *, $p < 0.05$)

(4) 複合型遺伝子改変マウスから造血幹・前駆細胞を採取し、上記同様にして、不死化能の検討を行った(図2)。*MLL-ENL* の発現誘導と同じタイミングで、ノックアウトを誘導して、表現型に関する解析を行ったが、コロニー形成能や形態学的に差は認められず、細胞表面マーカーの発現パターンにも違いはなかった。さらに、幾つかの関連遺伝子群の発現レベルを検討し

たが、*MLL-ENL* による白血病の分子病態に対する、ノックアウトによる影響は見出されなかった。

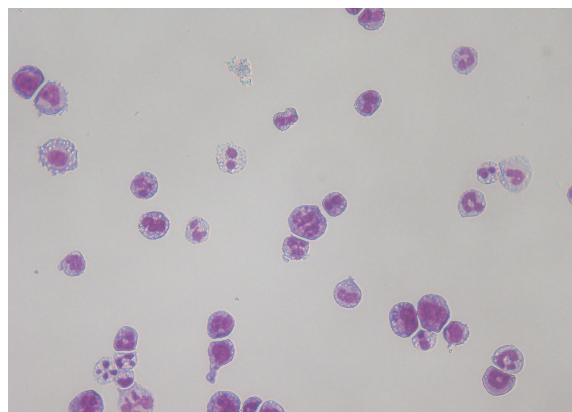
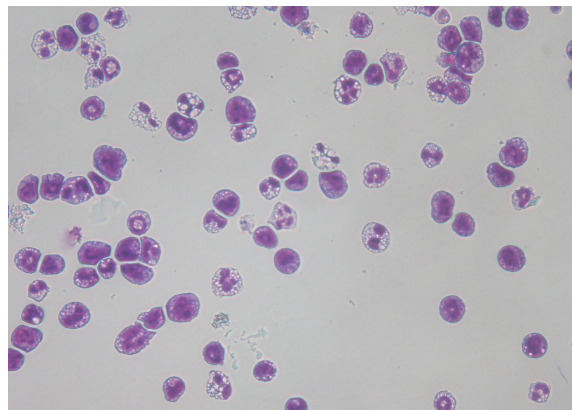
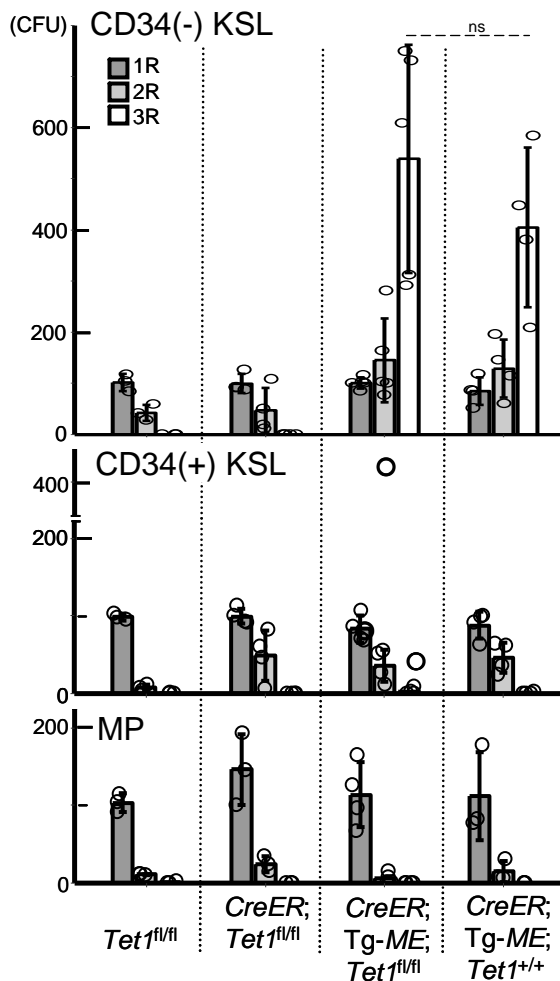


図2 複合型遺伝子改変マウス由来の造血幹(CD34(-)KSL)・未分化前駆(CD34(+)KSL)・骨髓球系前駆(MP)細胞における不死化能の検討。(左)各細胞由来のコロニー数。1-3R, 1st-3rd round of plating. n.s., 有意差なし(右) *Tet1* ノックアウト誘導(上)あるいは野生型(下)の不死化細胞のサイトスピン標本。

(5) 生体内における白血病発症能に関しても、複合型遺伝子改変マウスから骨髓を採取して、骨髓移植を行って、骨髓キメラマウスを作製し、*MLL-ENL* の発現誘導と同じタイミングで、ノックアウトを誘導して、解析を進めた(図3)。白血病による生存時間、生じた病型、白血病細胞の形態及び細胞表面マーカーの発現パターンにおいて、有意な差異は認められなかった。また、上記同様に関連遺伝子群の発現レベルも検討したが、予想外に *MLL-ENL* の発現レベルがノックアウトを誘導した場合に発現が上昇し、結果に影響を及ぼしている可能性が示唆された。一方で、白血病細胞の二次移植においても、ノックアウトの有無に伴う生存時間等の差異を検出することはなく、以上から、先行研究から想定されてきた *Tet1* の酵素活性を標的とする分子標的療法に関しては、今後におけるさらなる解析の必要性が考えられた。

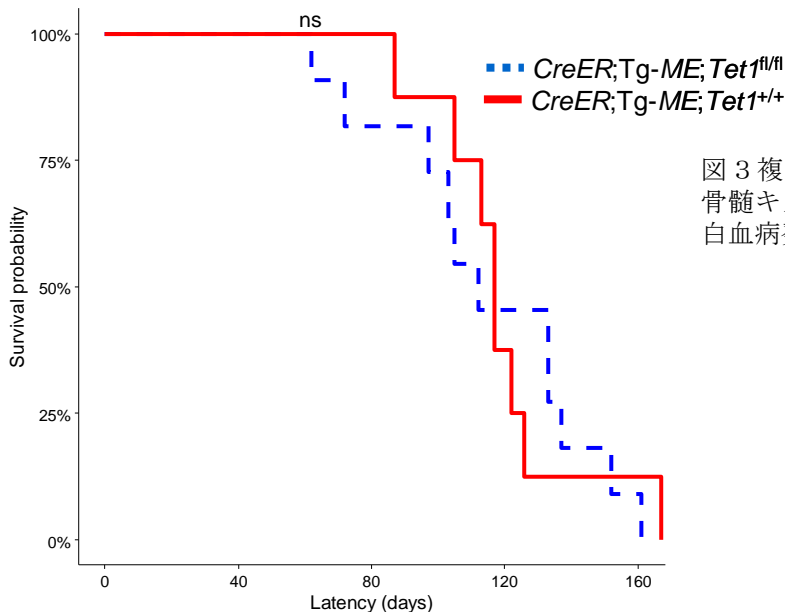


図3 複合型遺伝子改変マウス由来骨髓キメラマウスにおける生体内白血病発症誘導の生存時間解析。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ono R, Masuya M, Inoue N, Shinmei M, Ishii S, Maegawa Y, Maharjan BD, Katayama N, Nosaka T.	4. 巻 16
2. 論文標題 Tet1 is not required for myeloid leukemogenesis by MLL-ENL in novel mouse models.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS One	6. 最初と最後の頁 e0248425
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0248425	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Maharjan BD, Ono R, Nosaka T.	4. 巻 54
2. 論文標題 Eya2 is critical for the E2A-HLF-mediated immortalization of mouse hematopoietic stem/progenitor cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 981-990
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2019.4673	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sawaki A, Miyazaki K, Yamaguchi M, Takeuchi T, Kobayashi K, Imai H, Tawara I, Ono R, Nosaka T, Katayama N.	4. 巻 111
2. 論文標題 Genetic polymorphisms and vincristine-induced peripheral neuropathy in patients treated with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone therapy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 686-691
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-020-02832-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 小埜良一、野阪哲哉.	4. 巻 78
2. 論文標題 血液腫瘍モデル動物の現状と展望.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本臨床	6. 最初と最後の頁 152-158
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ono R, Masuya M, Shinmei M, Ishii S, Maegawa Y, Maharjan BD, Katayama N, Nosaka T.
2. 発表標題 Tet1 is not necessarily essential for MLL-ENL-induced myeloid leukemia.
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

http://www.medic.mie-u.ac.jp/microbiol/index.html 三重大学大学院医学系研究科 感染症制御医学・分子遺伝学
--

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------