

造血幹細胞のゲノム安定性維持と発がん・染色体転座

自治医科大学 分子病態治療研究センター 幹細胞制御研究部

和田 妙子

【目的】

申請者は、転写抑制複合体としてエピジェネティクス制御に重要な役割を果たすヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) とヒストン H3-K4 脱メチル化酵素 LSD1 の発現が、造血幹細胞・前駆細胞においてきわめて低いレベルに抑制されていることを明らかにしている。これまでの研究で、HDAC 低発現が造血前駆細胞において多様な遺伝子の発現確保すなわち多能性の維持に寄与していること、また HDAC の時期的・量的発現異常が急性骨髄性白血病における分化停止に関与していることを示した。以上の知見から申請者は、HDAC と LSD1 の発現が低レベルに保たれていることが造血幹細胞のゲノム安定化に必須で、これらの発現異常によってゲノムの不安定性から染色体転座が惹起され、白血病が発生するという仮説を立てた (図 1)。本課題においては、この仮説を立証するため、正常造血幹細胞・前駆細胞と白血病細胞における HDAC/LSD1 複合体の質的・量的違いを明らかにし、前者における発現を人為的に変化させることでゲノムの不安定性が惹起されることを *in vitro* および *in vivo* の系で確認する。最終的に、HDAC や LSD1 の阻害剤で染色体転座の形成やがんの予防効果を検討し、放射線または薬剤による白血病治療後の染色体転座に対する新規治療の開発に貢献することを目標とする。

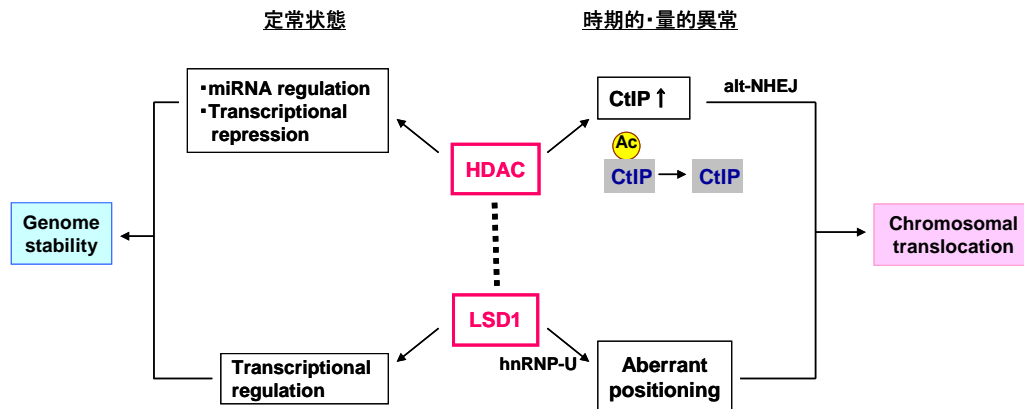


図 1、染色体転座形成における HDAC と LSD1 の役割 (仮説)

【方法】

1、正常血液細胞や白血病細胞株における LSD1 の発現をタンパク・mRNA レベルで解析する。また、哺乳類における LSD1 には 4 つのアイソフォームが存在し、機能的には co-factor の一つである CoREST との結合能力に差があることが報告されている (Zibetti C et al., J. Neuroscience 30:2521, 2010)。そこで、各細胞での LSD1 のアイソフォームの発現パターンに違いがあるか否かを PCR 法にて解析する。

2、放射線照射によって LSD1 の発現が変化するか否かをウェスタンブロッティング法によりを調べる。

- 3、放射線照射後の LSD1 と DNA 修復関連因子の結合を免疫沈降法にて確認する。
- 4、DNA 二重鎖切断部位への LSD1 のリクルートを共焦点顕微鏡にて確認する。
- 5、放射線照射による染色体転座形成への LSD1 アイソフォームの影響を RT-PCR 法にて解析する。
- 6、造血幹細胞に特異的に LSD1 を強発現するトランスジェニック・マウスを作製し、LSD1 発現変化の染色体転座形成への影響を *in vivo* で解析する。

【結果】

1、LSD1 の発現は正常血液細胞においては極めて低く、白血病細胞株では強発現していることが、タンパク・mRNA レベルで確認できた (図 2)。とくに染色体転座を有する白血病細胞では、転座を有しない白血病細胞株に比べ LSD1 の発現が強かった。哺乳類の LSD1 には図 2 に示した 4 つのアイソフォームが存在するが、血液細胞には 2a-8a- (-/-) と 2a+8a-(+/-) の 2 種が存在していることが分かった。特に、正常細胞に比べ白血病細胞で (-/-) が強く発現していた (図 3)。

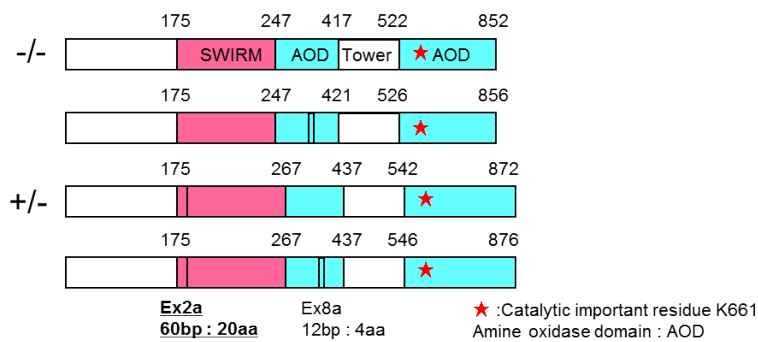


図 2、LSD1 アイソフォーム

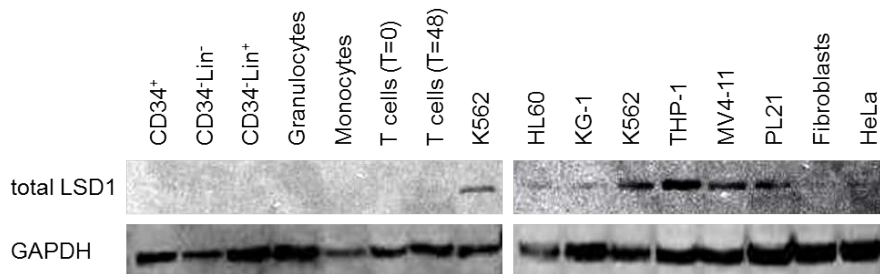


図 3、LSD1 アイソフォームの発現解析 (ウェスタンブロッティング)

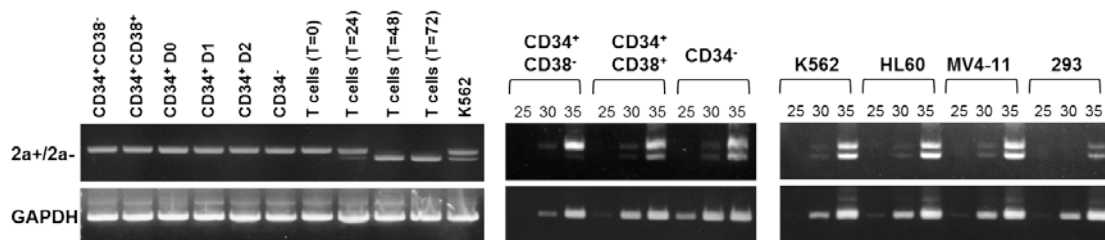


図 4、LSD1 アイソフォームの発現解析 (RT-PCR)

- 2、放射線照射を行った 293 細胞を用い LSD1 タンパクの発現を調べたが大きな変化は確認できなかった。
- 3、放射線照射を行った 293 細胞を用い LSD1 抗体で免疫沈降後、DNA 修復関連因子 (CtIP, Xrcc4) の発現変化を調べたが、大きな変化は無かった。

4、LSD1 は通常は細胞の核全体に分布しているが、放射線照射後は γ -H2AX と共局在する傾向が見られた (図5)。

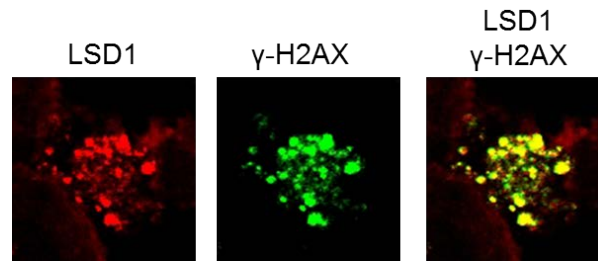


図5、二重鎖切断部位へのLSD1の局在

5、LSD1 アイソフォーム(-/-, +/-)を強発現させた293細胞に放射線照射を行い、その後のBCR-ABL, AML1-ETO, EWS-ERG 融合遺伝子の有無を調べると、放射線照射後2日後にLSD1 融合遺伝子の形成が見られた。対照群では認められなかった (図6)。

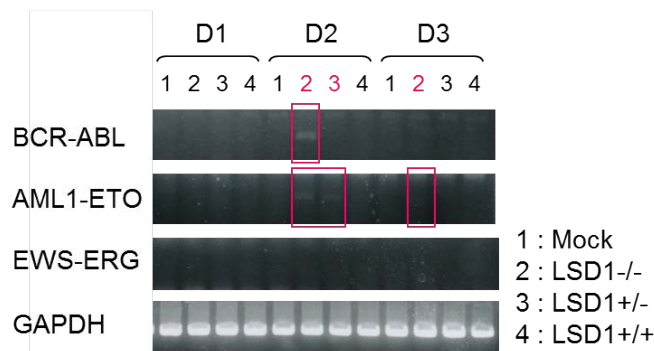


図6、LSD1 アイソフォームの染色体転座形成能

【まとめ・考察】

血液細胞におけるLSD1には2つのアイソフォームが存在し、正常細胞ではそれらの発現は低く、白血病細胞では強発現していることが分かった。この2つのアイソフォームは *In vitro* の系で、染色体転座を誘導する傾向がみられた。このことを明らかにするため、*In vitro* および *In vivo* の系で定量を行う必要があると考え、現在、造血幹細胞に特異的にLSD1を強発現するトランスジェニックマウスを作製している。

【参考文献】

1) Zibetti C, Adamo A, Binda C, Forneris F, Toffolo E, VerPELLI C, Ginelli E, Mattevi A, Sala C, Battaglioli E.: Alternative splicing of the histone demethylase LSD1/KDM1 contributes to the modulation of neurite morphogenesis in the mammalian nervous system. **J Neurosci.** 30(7):2521-32, 2010