

緑の風記念三重医学研究会振興会賞（基礎医学・看護学部門）

報告者 氏名(年齢) 小椋 良一 (48歳)

所属・職名 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・准教授

○受賞の感想と今後の抱負

今回、緑の風記念三重医学研究会振興会賞という荣誉ある賞を受賞させていただき、誠にありがとうございます。私は、母校の医学部卒業後、当初小児の血液・腫瘍内科領域に従事し、その治療における進歩と限界の両者を経験した後、限界の克服につながるであろう基礎研究に軸足を移して、白血病における分子病態の解明を進めてまいりました。この度の受賞を励みにし、臨床に還元できる成果を目指して、研究に邁進していく所存です。

○受賞テーマ

白血病発症をもたらす異常な幹細胞性の獲得及びその維持におけるDNA脱メチル化制御分子Lcxの果たす役割の解明

○研究の概要と将来展望

白血病は、何らかの重要な遺伝子変異によって、正常造血系細胞が白血病幹(起源)細胞に形質転換し、そこから、正常な造血系の制御を逸脱した無秩序な白血病細胞の供給がなされる病態である。中でも、急性骨髄性白血病においては、正常造血系と類似した、少数の白血病幹細胞を頂点とする階層ピラミッドモデルが想定されており、白血病幹細胞の根絶による完治を目指す上で、白血病幹細胞そのものの分子基盤を理解することは、非常に重要である。興味深いことに、白血病幹細胞は、正常造血幹細胞やES細胞と共通する分子生物学的性状を有することが明らかにされており、未分化性の維持や自己複製能のような幹細胞における特徴的性質である「幹細胞性」を、異常に獲得し、維持していると考えられる。こうした幹細胞性の制御を行う分子機構として、近年精力的に解析されているものの一つのが、ゲノムDNAのメチル化やヒストンの修飾を介したエピジェネティックなメカニズムである。

Lcx(/Tet1)は、当初、申請者が白血病関連遺伝子として単離、同定した遺伝子である。その後の機能解析により、ES細胞や造血幹細胞において、特異的に高発現していることや、Lcxタンパク質は、ゲノムDNA中のメチル化シトシンを5-ヒドロキシメチル化シトシンに変換する酵素活性を有し、メチル化シトシンの能動的脱メチル化経路への関与が想定されることから、新たなエピゲノム制御分子の一つとして、位置づけられてきた。また、ある種の白血病幹細胞モデル実験系でも高発現していることを、申請者やほかの研究グループによっても見いだされており、正常な、及び異常な幹細胞性において、重要な役割を果たしていることが示唆されている。ところが、従来の白血病マウスモデルでは、白血病発症における異常な幹細胞性に必須な遺伝子とされたが、ノックアウトマウスでは、造血幹細胞でむしろ幹細胞性が高まるという、一見相反する結果が得られている。一方で、ファミリー遺伝子の一つ、TET2もLCXと類似した分子生物学的性状を有するが、ある種の造血器腫瘍で、高頻度に機能喪失変異が報告されている。さらに、これまで報告された実験系において、標的遺伝子領域のゲノムDNAのメチル化の変化に関する、明確に説明可能な分子機構は、明らかにされていない。また、従来型のノックアウトマウスを用いる解析では、Lcxの発生段階における様々な役割を喪失することによる影響が排除されておらず、ヒトの白血病発症とは異なる結果が得られている可能性もある。

そこで、本研究では、まず、先に申請者の樹立した、造血幹細胞由来の白血病を誘導的に発症可能なマウスと、最近新たに独自に構築したLcxのコンディショナルノックアウトマウスを組み合わせ、白血病発症誘導時に、Lcxも同時にノックアウト可能な複合遺伝子改変モデルマウスを構築する。この複合遺伝子改変マウスで、よりヒトの発症病態に近い生体内白血病発症実験系における、発生段階の影響を排除した成体レベルにおけるLcxの機能喪失の影響を、白血病発症にいたる潜伏期や、発症時の白血病細胞の分子生物学的性状に関して、正確に評価する。また、造血系に焦点を当てた、正確な解析を行うため、複合遺伝子改変マウスの骨髄細胞を野生型マウスに骨髄移植した骨髄キメラマウスを用いた解析も同様に行っていく。他方で、あらかじめ複合遺伝子改変マウス由来の造血幹細胞分画を、骨髄細胞から、セルソーター装置を用いて採取し、*in vitro*における白血病発症誘導刺激を行って、サイトカイン存在下培養実験で、無限増殖を獲得する不死化能に関しても、分子生物学的性状について、対照マウス由来のものと比較検討する。こうして、判明したLcxの機能喪失に伴って生じる、白血病発症能における分子生物学的影響について、複合遺伝子改変マウス由来の白血病細胞や不死化細胞と、その対照細胞について、RNA-seqによる網羅的発現解析を行う。重要と考えられる発現の変化を見いだした遺伝子については、Bisulfite-seqやその改変手法による、ゲノムDNAにおけるプロモーターを含めたその遺伝子の関連領域におけるメチル化及び5-ヒドロキシメチル化DNAの変動の検出を試みていく。同時に、クロマチン免疫沈降(ChIP)-seqで同遺伝子領域近傍における、Lcxの局在も確認しつつ、可能であれば、いくつかの重要なヒストン修飾の変化についてもChIP-seqで検討し、ゲノムDNA全体のメチル化、5ヒドロキシメチル化DNAの変化も、メチル化/ヒドロキシメチル化DNA免疫沈降-seq法などにより、検討を進めていきたい。このようにして、正常な造血幹細胞が白血病幹細胞へと形質転換していく過程を念頭に置いた詳細な分子生物学的解析を行い、Lcxが異常な幹細胞性の獲得や維持において、どのような役割を果たしているのかを明らかにする。

○本研究に関連する代表的な原書学術論文 (5編)

論文名

1. Ono R, Taki T, Taketani T, Taniwaki M, Kobayashi H, and Hayashi Y. *LCX, leukemia-associated protein with a CXXC domain, is fused to MLL in acute myeloid leukemia with trilineage dysplasia having t(10;11)(q22;q23)*. *Cancer Res.*, 62: 4075-4080, 2002.
2. 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.
3. Ono R, Nakajima H, Ozaki K, Kumagai H, Kawashima T, Taki T, Kitamura T, Hayashi Y, and Nosaka T. *Dimerization of MLL fusion proteins and FLT3 activation synergize to induce multiple-lineage leukemogenesis*. *J. Clin. Invest.*, 115: 919-929, 2005.
4. 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.
5. Ono R, Kumagai H, Nakajima H, Hishiya A, Taki T, Horikawa K, Takatsu K, Satoh T, Hayashi Y, Kitamura T, and Nosaka T. *Mixed-lineage-leukemia (MLL) fusion protein collaborates with Ras to induce acute leukemia through aberrant Hox expression and Raf activation*. *Leukemia*, 23:2197-2209, 2009.

○応募者略歴

学歴

平成7年3月 東京大学医学部医学科 卒業

平成16年3月 東京大学大学院医学系研究科生殖・発達・加齢医学専攻博士課程 修了、医学博士

職歴、研究歴

平成7年6月 東京大学医学部附属病院小児科、研修医。同年10月 関東労災病院小児科、研修医。平成8年10月 東京大学医学部附属病院小児科、研修医。平成9年4月 太田西の内病院小児科、常勤医師(医員)。平成10年10月 埼玉県立小児医療センター血液・腫瘍科、常勤医師(レジデント)。平成12年3月 同退職。

平成12年4月 東京大学大学院医学系研究科生殖・発達・加齢医学専攻博士課程 入学。平成15年4月 日本学術振興会特別研究員(DC2、平成16年4月PDに変更)。平成16年3月 東京大学大学院 修了(医学博士)。平成17年4月 東京大学医科学研究所 造血因子探索寄附研究部門、教員(助手相当)。同年9月 同 先端医療研究センター 細胞療法分野、リサーチフェロー。平成18年4月 日本学術振興会特別研究員(PD)。平成19年3月 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、助手(助教)。平成22年3月 同、講師。平成31年2月 同、准教授、現在に至る。

○専門分野

血液学、分子生物学

○医学博士、専門医資格など

平成16年3月25日 医学博士(東京大学)