

京都大学	博士（医学）	氏名	辰 巳 剛 一
論文題目	LSD1-mediated repression of <i>GFI1</i> super-enhancer plays an essential role in erythroleukemia (LSD1 を介した <i>GFI1</i> スーパーエンハンサーの抑制が赤白血病において重要な役割を果たす)		
(論文内容の要旨)			
<p>造血分化の過程は転写因子 (TFs) により精密に制御され、その制御異常は白血病発症に関与する。TFs は協調あるいは拮抗しながらネットワークを構成し、分化段階特異的に活性化するエンハンサーにより調整されている。特に、分化に重要な TFs の結合モチーフを複数持つスーパーエンハンサー (SE) が大きな役割を果たしており、この SE の制御異常が白血病発症にも深く関わるのが近年判明してきた。</p> <p>LSD1 は、HDAC1・HDAC2 などと複合体を作り SE の活性を低下させるヒストン修飾調整因子である。急性骨髄性白血病 (AML) では、60%以上の症例で LSD1 が過剰発現していると報告されている。また、新規に開発された複数の LSD1 阻害薬は、実際に抗白血病効果を有することが示されてきた。しかし LSD1 による SE の抑制が白血病にどのように関わっているかの詳細は依然明らかになっていない。赤芽球/巨核球系白血病細胞を用いた先行研究では、骨髄分化に重要な転写因子である GFI1 の SE (<i>GFI1</i>-SE) が、LSD1 により著しく抑制されていることを明らかにした。そこで本研究では、赤白血病における LSD1 を介した <i>GFI1</i>-SE の制御機構の詳細な検討を行った。</p> <p>まず複数の赤芽球/巨核球系白血病細胞株に、LSD1 阻害薬 (NCD38・NCD25) の投与を行った。その結果、<i>GFI1</i>-SE の活性化が白血病細胞の骨髄分化誘導及び抗白血病効果と密接に関わることを確認した。次に <i>GFI1</i>-SE の塩基配列を詳細に調べたところ、種を超えて保存された領域 (CA) が存在することを発見した。さらにこの CA 内に、複数の骨髄分化に重要な TFs (RUNX1, GATA1, TAL1, CEBPA, GFI1/GFI1B) の結合モチーフが集中していることが判明した。そこでこれらの TFs の重要性の確認のため、<i>GFI1</i>-SE 内の各 TF モチーフ変異ベクターを用いたレポーターアッセイを実施した。その結果、LSD1 阻害薬による <i>GFI1</i>-SE の活性化には、これらの TFs の協調が必要不可欠であることが明らかとなった。また、クロマチン免疫沈降法 (ChIP-qPCR) を用いて、LSD1 阻害薬投与によりこれらの TFs や LSD1 複合体の <i>GFI1</i>-SE への集積がどのように変化するかを検討した。すると、LSD1 阻害薬投与で明らかな TFs の集積変化は認めなかったが、LSD1 複合体構成因子 (LSD1, CoREST, HDAC1, HDAC2) はすべて <i>GFI1</i>-SE から解離することが示された。</p> <p>次に、ゲノム編集技術 (CRISPR/Cas9) を用いて、ヒト赤白血病細胞株 (HEL) で <i>GFI1</i>-SE を欠損したサブクローン (<i>GFI1</i>-SE KO 株) を作成し、GFI1 発現や骨髄分化に与える影響を調べた。その結果、<i>GFI1</i>-SE KO 株では、コントロール株と比して LSD1 阻害薬による GFI1 発現の低下、及び骨髄分化誘導の著明な減弱を認めた。さらに、コントロール株と <i>GFI1</i>-SE KO 株を用いて、NCD38 投与の有無で遺伝子発現プロファイルの比較を行った。すると、好中球分化制御に関わる遺伝子群や CEBPA ネットワークに関わる遺伝子群の発現は、コントロール株で NCD38 投与すると亢進するが、NCD38 投与下の <i>GFI1</i>-SE KO 株では低下した。一方で、赤芽球分化に関わる遺伝子群や GATA1 ターゲット遺伝子群、また AML サブタイプ中の赤白血病や MDS 関連の AML に特異的な遺伝子群の発現は、コントロール株で NCD38 投与すると低下するが、NCD38 投与下の <i>GFI1</i>-SE KO 株では亢進した。</p> <p>以上の結果から、LSD1 阻害薬投与による <i>GFI1</i>-SE の活性化は <i>GFI1</i>-SE から LSD1 複合体が解離することで誘導されることが示唆された。また、この <i>GFI1</i>-SE 活性化により、赤芽球分化から好中球分化への分化系列のスイッチに関与するプログラムが惹起され、赤白血病や MDS 関連の白血病に関わるプログラムが障害されることが明らかとなった。LSD1 により抑制された状態の <i>GFI1</i>-SE は赤白血病維持に重要な役割を果たしていることから、<i>GFI1</i>-SE は機能的に腫瘍抑制性に働くと考えられる。また将来的には、</p>			

赤白血病患者における <i>GFI1</i> -SE の活性が、LSD1 阻害薬の効果を予測する因子に応用できる可能性が示唆された。
（論文審査の結果の要旨）
スーパーエンハンサー（SE）は、近傍遺伝子の転写を調節する非コード DNA 領域である。転写因子（TF）結合配列が集中し、造血分化に重要な TF ネットワークの制御に深く関わる。LSD1 は、HDAC 等と複合体を形成し SE を抑制するヒストン修飾因子で、その阻害剤は抗白血病効果を発揮する。しかし LSD1 による SE 抑制が、白血病の分子病態にどのように関わるのかは不明であった。
本論文では、好中球分化に必須の TF である GFI1 の SE（ <i>GFI1</i> -SE）に注目し、赤白血病細胞における重要性を検討した。まず、LSD1 阻害剤による <i>GFI1</i> -SE 活性化が、顆粒球系への分化誘導と抗白血病効果に関連することを示した。次に <i>GFI1</i> -SE の制御機構をレポーターアッセイとクロマチン免疫沈降法で検討した結果、 <i>GFI1</i> -SE は複数の TF により協調的に制御されるものの、その活性化には TF の新たなリクルートではなく、LSD1 複合体が <i>GFI1</i> -SE から乖離することが必要であった。更にゲノム編集技術を用いて <i>GFI1</i> -SE を欠損した赤白血病細胞を樹立し、LSD1 阻害剤に暴露させると顆粒球系への分化誘導が著しく障害された。最後に <i>GFI1</i> -SE 欠損が LSD1 阻害剤による分子プログラムの変動にどう影響を及ぼすのかを GSEA で検討した。その結果、赤血球系から顆粒球系へのプログラム転換が障害され、赤白血病や MDS 関連白血病を支えるプログラムが維持された。
以上の研究は、LSD1 による <i>GFI1</i> -SE の抑制が赤白血病の維持に重要であり、非コード DNA 領域の異常が白血病を支える重要な分子病態の一つとなりうることの解明に寄与するところが多い。
したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。
なお、本学位授与申請者は、令和2年1月14日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。
要旨公開可能日： 年 月 日以降