

平成 30 年 5 月 11 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21646

研究課題名(和文)ポリコム標的遺伝子Glis2による白血病幹細胞の分化制御機構の解明

研究課題名(英文)Regulation of leukemic stem cell differentiation by Glis2

研究代表者

高松 絵美(市原絵美)(Takamatsu-Ichihara, Emi)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・特任研究員

研究者番号：80771592

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、ポリコム抑制複合体構成因子Ring1A/Bのターゲット遺伝子Glis2による白血病幹細胞制御のメカニズムについて解析を行った。MOZ-TIF2白血病マウスモデルを用いてRing1A/Bダブルノックアウト後とRing1A/B,Glis2トリプルノックアウト後の白血病幹細胞を解析し比較を行うことで、Ring1A/BがGlis2の発現抑制を介して白血病幹細胞の分化を抑制していることを明らかにした。また、Glis2の下流の分化制御遺伝子としてspiBを同定した。

研究成果の概要(英文):Glis2 is a zinc finger transcription factor, and its expression is repressed by polycomb group proteins Ring1A/B in leukemia cells. To clarify the significance of repression of Glis2 by Ring1A/B in leukemia cells, we determined the effect of Glis2 deletion on the phenotype of Ring1A/B-deleted leukemia cells. Deletion of Ring1A/B induced differentiation and elimination of leukemic stem cell in MOZ-TIF2 AML mice. On the other hand, additional deletion of Glis2 prevented differentiation of leukemic stem cells induced by Ring1A/B deficiency. These results suggest that Glis2 is an important target of Ring1A/B involved in maintenance of undifferentiated state of leukemic stem cells. Moreover, we identified spiB as a crucial target of Glis2 in the regulation of leukemic cell differentiation.

研究分野：分子生物学

キーワード：Glis2 Ring1A/B

1. 研究開始当初の背景

白血病幹細胞は抗がん剤に対し抵抗性を示すことから、治療後も残存し再発の原因になると考えられている。白血病の治療成績を向上させるためには、再発の元となる白血病幹細胞を根絶させる新たな治療法の開発が必要である。近年、白血病幹細胞制御の分子メカニズムが徐々に明らかにされてきており、白血病幹細胞を直接の標的とした治療薬開発への応用が期待されている。

そのような中でわれわれは難治性白血病の原因となる MOZ-TIF2 融合遺伝子を導入したマウスモデルを用いて、白血病幹細胞制御の分子メカニズムの解明を目指してきた。これまでの研究から、MOZ-TIF2 白血病細胞においてポリコム抑制複合体構成因子 Ring1A/B を欠損させると白血病細胞の分化が誘導され幹細胞性が失われること、そして Glis2 遺伝子の発現量が上昇することが明らかとなっていた。

2. 研究の目的

本研究では白血病細胞における Glis2 の機能について詳細な解析を行い、Ring1A/B による白血病幹細胞制御機構における Glis2 の重要性を明らかにしたい。

3. 研究の方法

(1) Ring1A/B と Glis2 による白血病幹細胞制御機構の解析

Ring1A/B 欠損時の白血病幹細胞の消失に Glis2 の発現上昇が寄与しているのかどうかを明らかにするために、Ring1A/B を欠損させても Glis2 の発現が上昇しない Ring1A/B, Glis2 トリプル KO マウス (Ring1A^{-/-}; Ring1B^{f/f}; Glis2^{f/f}; CreERT2) を作成した。Ring1A/B, Glis2 トリプル KO マウス由来の造血幹/前駆細胞に MOZ-TIF2 を導入することで作成した白血病細胞を用いて、コロニーアッセイ等の in vitro 実験やマウスへの移植実験を行った。Ring1A/B, Glis2 トリプル KO 白血病細胞の比較対象として Ring1A/B ダブル KO マウスから同じ方法で作成した白血病細胞を用いた。

(2) Glis2 の下流因子の探索

Glis2 による白血病幹細胞制御の分子メカニズムを明らかにするために、Glis2 を過剰発現させた白血病細胞を用いてマイクロアレイ解析を行い、Glis2 の下流で発現が変動している遺伝子を調べた。

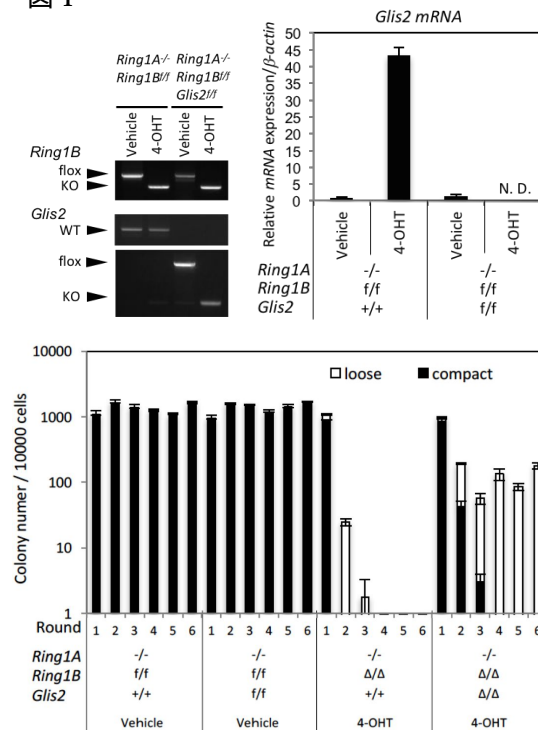
4. 研究成果

(1) Ring1A/B と Glis2 による白血病幹細胞制御機構の解析

4-OHT の処理により MOZ-TIF2 白血病細胞から Ring1A/B を欠損させると、半固形培地上でのコロニー形成能が完全に消失したが、Glis2 の同時欠損により Glis2 の発現上昇を阻止すると、コロニー形成が部分的に回復した (図

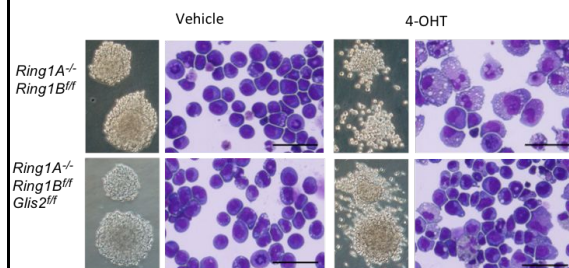
1)。

図 1



4-OHT 処理後 5 日目にギムザ染色により白血病細胞の形態を確認すると、Ring1A/B の欠損ではすべての白血病細胞で分化が誘導されていたが、Glis2 を同時に欠損させた白血病細胞では、一部の細胞は分化したものの未分化な形態を示す細胞が多数維持されていた (図 2)。

図 2

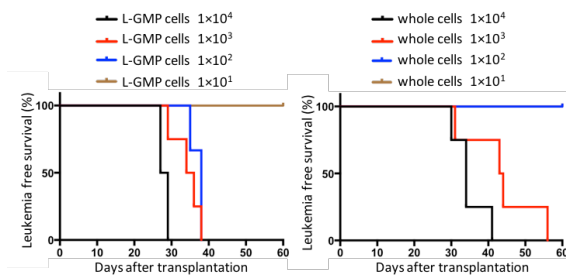


Glis2 の同時欠損によって Ring1A/B 欠損による分化誘導を部分的にはあるが阻止できたことから、Ring1A/B 欠損時の白血病細胞の分化誘導には Glis2 の発現上昇が重要であることが明らかとなった。

次に、MOZ-TIF2 白血病マウスモデルを用いて Ring1A/B と Glis2 による白血病幹細胞制御について解析を行った。まず、MLL 関連白血病マウスモデルにおいて白血病幹細胞が濃縮されていることが報告されている L-GMP 分画が、MOZ-TIF2 白血病マウスにおいても幹細胞濃縮分画であるかどうかを確認するために dilution assay を行った。WT の MOZ-TIF2 白

血病マウスの BM 細胞 (whole cells) から L-GMP 分画の細胞 (L-GMP cells) をセルソーターでソーティングし、10000 個、1000 個、100 個、10 個の L-GMP cells を放射線照射後のマウスに移植した。コントロールとして同数の whole cells の移植を行った。その結果、100 個以上の L-GMP cells を移植したマウスは 40 日以内に速やかに白血病を発症したが、100 個の whole cells を移植したマウスは全例が白血病を発症しなかった。したがって、L-GMP 分画では白血病幹細胞が約 10 倍濃縮されていることが示された (図 3)。

図 3



MOZ-TIF2 白血病マウスモデルにおいても L-GMP 分画が白血病幹細胞濃縮分画であることが示されたことから、まず Ring1A/B 欠損後の L-GMP 分画をフローサイトメトリーで解析することにより、Ring1A/B 欠損が白血病幹細胞へ与える影響について調べた。白血病を発症したマウスへのタモキシフェンの投与により Ring1A/B を欠損させると、L-GMP 分画の細胞の割合が大きく低下した。この結果から、Ring1A/B が白血病幹細胞維持に重要であることが示された (図 4)。一方で、Ring1A/B に加えて Glis2 を同時に欠損させたマウスでは、BM 全体における白血病細胞数は大きく低下していたものの、L-GMP 分画が選択的に残存した結果、L-GMP 分画の細胞数は維持されていた (図 5)。

図 4

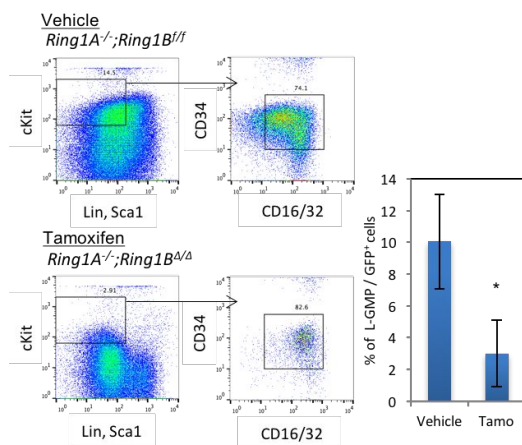
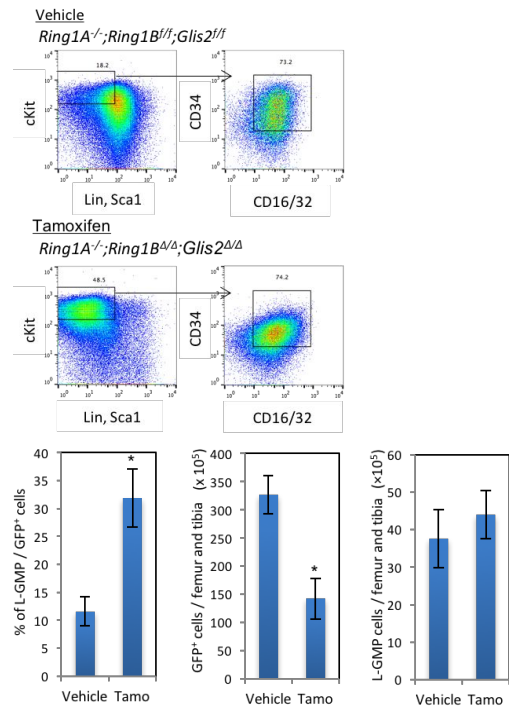


図 5

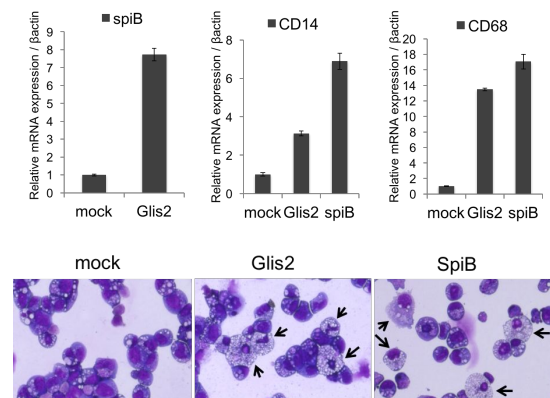


Ring1A/B と Glis2 を同時に欠損させることで、Ring1A/B 欠損時にみられた L-GMP 分画の消失が阻止されたことから、Ring1A/B による白血病幹細胞の維持には Glis2 の発現抑制が重要であることが示唆された。

(2) Glis2 の下流因子の探索

Glis2 を白血病細胞に強制発現させると細胞の分化が誘導されるため、Glis2 の発現抑制は白血病幹細胞の分化抑制に寄与していると考えられる。Glis2 による細胞分化制御の分子メカニズムを明らかにするために、MOZ-TIF2 白血病細胞に Glis2 を過剰発現させた細胞を用いてマイクロアレイ解析を行った。その結果、Glis2 の過剰発現により発現が上昇している遺伝子として spiB を同定した。spiB を白血病細胞に過剰発現させると Glis2 と同様に分化が誘導されたことから、Glis2 は spiB の発現制御を介して分化を制御している可能性が示唆された (図 6)。

図 6



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1件)

Haruko Shima*, Emi Takamatsu-Ichihara*
(*equally contributed), Mika Shino,
Kazutsune Yamagata, Takuo Katsumoto,
Yukiko Aikawa, Shuhei Fujita, Haruhiko
Koseki, and Issay Kitabayashi. Ring1A and
Ring1B inhibit expression of Glis2 to
maintain murine MOZ-TIF2 AML stem cells.
Blood, 査読あり, 131(16), 1833-1845, 2018,
<https://doi.org/10.1182/blood-2017-05-787226>

〔学会発表〕(計2件)

(1) Emi Takamatsu-Ichihara, Haruko Shima,
Kazutsune Yamagata, Shuhei Fujita, Yukiko
Aikawa, Issay Kitabayashi. The roles of
Glis2 in leukemic and hematopoietic stem
cells. The 5th JCA-AACR Special Joint
Conference, 2016年7月14日, 千葉県・浦
安市

(2) Emi Takamatsu-Ichihara, Shuhei Fujita,
Haruko Shima, Daisuke Honma, Nobuaki
Adachi, Atsushi Iwama, Haruhiko Koseki,
Kazushi Araki, Issay Kitabayashi.
RING1A/B and EZH1/2 are promising
therapeutic targets to eradicate leukemic
stem cells in acute myeloid leukemia. 第
75回日本癌学会学術総会, 2016年10月8日,
神奈川県・横浜市

6. 研究組織

(1)研究代表者

高松 絵美(市原絵美)

(Emi Takamatsu-Ichihara)

国立がん研究センター・

研究所・特任研究員

研究者番号：80771592