

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03579

研究課題名(和文) HOX関連白血病における15-PGDHによる白血病幹細胞制御機構の解明

研究課題名(英文) 15-PGDH regulates leukemia stem cell potential in HOX-associated myeloid leukemia

研究代表者

岩崎 正幸 (Iwasaki, Masayuki)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：70790913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：HOX関連白血病の白血病幹細胞におけるProstaglandin分解酵素15-PGDHの役割について検討した。我々は15-PGDHには、既知の癌抑制因子としての役割の他に腫瘍促進作用があることを見出した。さらに15-PGDHはMLL白血病の惹起と維持に必須であること、酵素活性非依存的に白血病幹細胞を制御していることを明らかにした。これらの成果は難治性造血器腫瘍の新たな分子標的療法を開発する基盤となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

15-PGDHは大腸癌や肺癌などの固形腫瘍においてがん抑制遺伝子として機能しているが、最近、15-PGDHはマウスモデルにおいて骨髄、大腸、肝臓の再生および修復に対し、負の働きをしていることが報告されて注目されている。本研究により、HOX関連白血病において15-PGDHは発症促進に働いており、他の腫瘍とは異なるメカニズムによって発がんに関与していることを見出した。これらの成果は、がんや再生医療における分子標的治療の開発を進める上で非常に意義があるものと思われる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the function of 15-PGDH, prostaglandin-degrading enzyme in HOX-associated leukemia stem cells. We found that 15-PGDH had an alternative function to promote oncogenesis in addition to its previously characterized tumor suppressor role. We also demonstrated that 15-PGDH was required for initiation and maintenance of MLL-mediated myeloid transformation, and 15-PGDH non-enzymatically regulated the leukemia stem cell potential. These findings provide a foundation to develop novel molecular targeted therapies for refractory hematological malignancies.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：白血病幹細胞 15-PGDH MEIS1 HOX MLL

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

白血病幹細胞は白血病の起源細胞であり、化学療法や放射線に対する抵抗性が強いいため、再発、転移の原因と考えられている。白血病の根治には、このがん幹細胞を治療の標的にすることが重要である。MLL(Mixed lineage leukemia)遺伝子の再構成をともなう白血病(MLL 白血病)は急性白血病的 5-10%、乳児白血病の 70%以上に認められ、予後は不良であることから新規治療法の開発が強く望まれている。MLL 白血病は HOX(homeobox)遺伝子と MEIS1 (myeloid ecotropic viral integration site 1)遺伝子の発現亢進がみられるが、我々はマウスモデルにおいて Meis1 の発現レベルが白血病の発症期間に大きく関与していること、さらに Meis1 の過剰発現は白血病幹細胞の頻度を著しく増加させることを見出し、白血病幹細胞における Meis1 の重要性を初めて明らかにした(Genes & Dev 2007)。我々は HoxA9/Meis1 を骨髓系前駆細胞に強制発現させて急性骨髄性白血病(AML)を発症するマウスモデルを用いた予備実験で、HoxA9/Meis1 AML の白血病幹細胞は GMP (granulocyte/macrophage progenitor)分画に濃縮されることを見出した。これを機に白血病幹細胞特異的に発現する遺伝子に興味を持つことになり、白血病 L-GMP と正常 GMP 分画細胞を用いたマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイリング解析を行うことに至った。

2. 研究の目的

白血病の根絶には白血病幹細胞を標的とした治療法の開発が重要であると認識されるようになった。しかしながら、白血病幹細胞は、正常造血幹細胞と多くの特徴を共有するため、正常造血幹細胞を傷害することなく白血病幹細胞だけを根絶させる治療法の開発を困難にしており、白血病幹細胞と正常造血幹細胞とを区別し、白血病幹細胞の特性を理解することが重要課題となっている。我々は、遺伝子発現プロファイリング解析によって HoxA9/Meis1 AML の白血病幹細胞特異的に発現している遺伝子として Prostaglandin 分解酵素として知られている 15-PGDH (15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase)を同定したが、白血病における報告はなく、その役割は分かっていない。本研究は HOX 関連白血病の白血病幹細胞における 15-PGDH の役割を明らかにし、新規治療法の開発へと展開するための研究基盤を確立することが目的である。

3. 研究の方法

(1)HoxA9 と MLL 白血病マウスモデルを用いて、マウス骨髓から造血前駆細胞を含む c-Kit 陽性細胞を採取し、HoxA9 または MLL 融合遺伝子と 15-Pgdh をレトロウイルスにより導入し、この感染細胞を放射線照射した同系マウスに移植して白血病の発症期間や限界希釈法を用いた 2 次移植により白血病幹細胞の頻度を検証する。

(2)患者検体由来の MLL 白血病細胞を用いて、shRNA により 15-PGDH をノックダウンさせた時、*in vitro* および *in vivo* において白血病発症能が抑制されるかを検証するために、コロニー形成能や免疫不全(NSG)マウスに異種移植して白血病再構築能の変化を調べる。

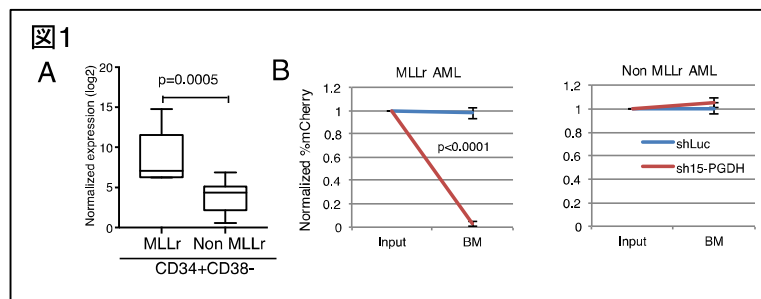
(3)我々は Meis1 欠損マウス由来の胎児肝(FL)細胞は MLL 融合癌遺伝子による不死化(形質転換)を誘導できないことを見出した(Genes & Dev 2007)。この実験系を用いて Meis1 標的遺伝子で不死化に必須な遺伝子を同定する目的で、さまざまな候補遺伝子を強制発現させて形質転換が回復するかを確かめる。

(4)15-Pgdh をノックダウンさせた MLL 白血病細胞を用いて RNA-seq による網羅的遺伝子発現プロファイリング解析を行い、Gene Set Enrichment Analysis(GSEA)を利用して 15-Pgdh による白血病幹細胞の未分化性維持および自己複製能に必須な経路やその制御に関与する遺伝子の同定を試みた。

4. 研究成果

(1)15-Pgdh を強制発現させると HoxA9 および MLL-AF10 白血病マウスの発症期間は短縮し、白血病幹細胞の頻度も著しく増加することから、白血病幹細胞の自己複製の維持に重要な役割をしていることが明らかとなった。

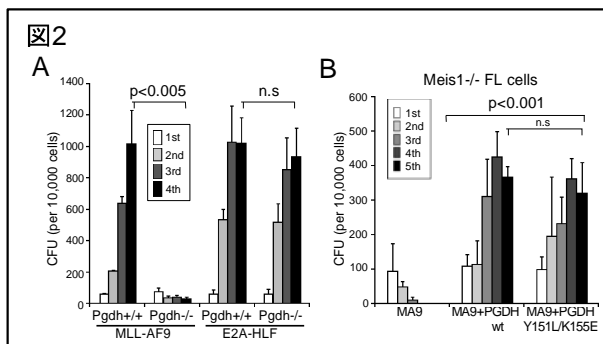
(2)患者検体由来の MLL 白血病細胞を用いた実験を行なった結果、MLL 白血病ではヒト白血病幹細胞濃縮分画である CD34+CD38-細胞特異的に 15-PGDH が高発現しているが、MLL 以外の白血病ではほとんど発現していない(図 1A)。shRNA により 15-PGDH をノックダウンしたところ、コロニー形成能が著しく減少し、白血病細胞の形態は未分化な細胞から最終分化した細胞に変化していた。15-PGDH をノックダウンさせた MLL 白血病細胞を NSG マウスへ 2 次異



種移植したところ、白血病を再構築しなかった。一方、MLL 以外の白血病細胞ではマウスに白血病を再構築した(図 1B)。このことから、15-PGDH はヒト MLL 白血病の発症および維持においても必須であることが明らかとなった。

(3) 15-Pgdh 欠損 FL 細胞に MLL-AF9 を発現させても不死化(形質転換)せず、移植マウスも白血病を発症しなかった。一方、HOX 非依存性白血病の E2A-HLF を発現させると 15-Pgdh 欠損細胞においても野生型細胞と同様に不死化した(図 2A)。これらのことから、マウス AML モデルにおいても 15-Pgdh は HOX 関連白血病の発症に必須であることが明らかとなった。

(4) HoxA9 白血病細胞において Meis1 の過剰発現によって 15-Pgdh の発現が誘導されることから、15-Pgdh は Meis1 の下流標的遺伝子であることが示唆された。Meis1 欠損 FL 細胞は MLL-AF9 による形質転換を誘導できないが、15-Pgdh の強制発現によってレスキューされるのか検証したところ、形質転換を確認できたことから、15-Pgdh は Meis1 の標的遺伝子であり、Meis1 の白血病発症の一部機能を補うことが明らかとなった(図 2B)。



(5) Meis1 欠損 FL 細胞を用いた MLL-AF9 による形質転換の回復実験を用いて、Meis1 の標的遺伝子として知られている Flt3 と c-Myb も 15-Pgdh と同様に回復できるのか検証したところ、Meis1 の機能を代替しなかった。白血病幹細胞の維持に Wnt/ β -catenin 経路が重要であることが知られているが、 β -catenin 強制発現によって形質転換の回復は確認できないことから、白血病幹細胞の維持に重要な Wnt/ β -catenin 経路は、Meis1/15-Pgdh による白血病幹細胞の誘導機構において関与していないことが分かった。

(6) Prostaglandin E2 は COX-2 により正に制御され、15-PGDH により負に制御されている。白血病における COX-2 の役割を明らかにするために、COX-2 を MLL 白血病細胞に強発現させたところ、細胞増殖やコロニー形成能に変化が見られなかった。また、15-PGDH の酵素活性に基づいて作られた阻害剤による HOX 関連白血病細胞の増殖およびコロニー形成能の変化を確認したところ、興味深いことに、細胞増殖とコロニー形成能の抑制は認められなかった。これらの所見から 15-PGDH の白血病発症に関わる機能は酵素活性によるものではないことが考えられる。そこで 15-PGDH の酵素活性責任領域の変異体を作製し、MLL-AF9 による Meis1 欠損 FL 細胞の形質転換の回復実験を行なったところ、野生型と同様に変異型でも形質転換を回復できることから、15-PGDH の白血病発症に関わる機能は酵素活性によるものではないことが明らかとなった(図 2B)。

(7) 15-Pgdh による白血病幹細胞の未分化性維持および自己複製能に必要な経路やその制御に関与する遺伝子を同定するために、15-Pgdh をノックダウンさせた MLL 白血病細胞を用いて RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を行い、コントロールとノックダウン細胞における遺伝子発現プロファイリングの違いを GSEA を用いて解析したところ、15-Pgdh は c-Myc の標的遺伝子群や NF- κ B シグナル経路の活性化に関与していることが明らかとなった。

15-PGDH は大腸癌や肺癌などの固形腫瘍においてがん抑制遺伝子として報告されており、我々の発見した白血病にみられる発がん促進機能とは相反する。最近、15-PGDH はマウスモデルにおいて、骨髄、大腸、肝臓の再生および修復に対し、負の働きをしていることが報告されて注目されている(Zhang et al. Science 2015)。本研究で我々は、MLL 白血病を含む HOX 関連白血病の白血病幹細胞に特異的に高発現している遺伝子として 15-PGDH を同定した。15-PGDH は MEIS1 の白血病発症における一部機能を代替して白血病幹細胞の自己複製の維持に重要な役割をしていることを明らかにした。こうした白血病発症に関わる機能は既知の酵素活性によるものではなく、他の腫瘍とは異なるメカニズムによって発がんに関与していることを明らかにした。これらの知見は、がんや再生医療における分子標的治療の開発を進める上で非常に意義があるものと思われる。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Crisafulli Laura, Muggeo Sharon, Uva Paolo, Wang Yulei, Iwasaki Masayuki, Locatelli Silvia, Anselmo Achille, Colombo Federico S., Carlo-Stella Carmelo, Cleary Michael L., Villa Anna, Gentner Bernhard, Ficara Francesca	4. 巻 104
2. 論文標題 MicroRNA-127-3p controls murine hematopoietic stem cell maintenance by limiting differentiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 1744 ~ 1755
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2018.198499	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 該当する

1. 著者名 Jeong Johan, Jager Astraea, Domizi Pablo, Pavel-Dinu Mara, Gojenola Linda, Iwasaki Masayuki, Wei Michael C., Pan Feng, Zehnder James L., Porteus Matthew H., Davis Kara L., Cleary Michael L.	4. 巻 3
2. 論文標題 High-efficiency CRISPR induction of t(9;11) chromosomal translocations and acute leukemias in human blood stem cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 2825 ~ 2835
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2019000450	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 該当する

1. 著者名 Schneidawind Corina, Jeong Johan, Schneidawind Dominik, Kim In-Suk, Duque-Afonso Jesus, Wong Stephen Hon Kit, Iwasaki Masayuki, Breese Erin H., Zehnder James L., Porteus Matthew, Cleary Michael L.	4. 巻 2
2. 論文標題 MLL leukemia induction by t(9;11) chromosomal translocation in human hematopoietic stem cells using genome editing	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 832 ~ 845
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2017013748	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Masayuki Iwasaki
2. 発表標題 Essential non-canonical role for 15-PGDH in MLL-rearranged AML stem cells
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masayuki Iwasaki
2. 発表標題 Essential non-canonical role for 15-PGDH in HOX-associated leukemia stem cells
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masayuki Iwasaki, Michael Cleary
2. 発表標題 Essential non-canonical role for 15-PGDH in MLL-rearranged AML stem cells
3. 学会等名 第79回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 岩崎正幸	4. 発行年 2017年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 6
3. 書名 MLL遺伝子再構成陽性急性骨髄性白血病幹細胞におけるCD93の発現（血液内科）	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	大里 元美 (Osato Motomi) (90314286)	熊本大学・国際先端医学研究機構・特別招聘教授 (17401)	
研究分担者	山本 浩平 (Yamamoto Kohei) (50451927)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教 (12602)	
研究協力者	 (Cleary Michael)		