

令和 2 年 6 月 21 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09942

研究課題名(和文) 白血病幹細胞Hippo pathwayによる遺伝子変異獲得と耐性機序の解明

研究課題名(英文) The analysis of gene mutation acquisition and chemotherapy resistant mechanism by Hippo pathway of leukemia stem cells

研究代表者

猪口 孝一 (Inokuchi, Koiti)

日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授

研究者番号：10203267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト骨髄系細胞株に関して細胞密度の上昇によってMST1/2、LATS1/2の発現が上昇し、YAPやTAZのリン酸化が亢進した。また免疫染色において細胞密度の上昇によってYAPやTAZの核内から細胞質へ移動した。

KG1aとKASUMI細胞株のLSC様細胞や、TF-1細胞株とマウス骨髄間質細胞由来細胞株MS-5を共培養し出現するLSC様細胞においてMST1/2、LATS1/2の発現が亢進し、YAPやTAZのリン酸化が亢進した。これらのLSC様分画と非LSC様分画をGenechipにて解析を行ったが、WNT/ β -cateninやTGF- β /Smadsシグナルの活性化は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血器腫瘍におけるHippo pathwayの機能を報告した研究はほとんどない。今回の解析結果を基盤にして白血病細胞内での遺伝子変異多様性獲得に至るプロセスを解明することに発展すると思われる。そしてHippo pathwayによるLSCの維持機構やHippo pathwayの抑制によりLSC機能を失ったdriver 遺伝子変異を獲得した娘白血病細胞が再びLSC機能を獲得する機序が明らかになる可能性があり、最終的にこれらを標的とした分子標的薬が開発され再発/治療抵抗性AMLの治療成績向上に貢献できると思われる。

研究成果の概要(英文)：In human myeloid leukemia cell lines, we confirmed that expression of MST1/2 and LATS1/2 increased and phosphorylation of YAP and TAZ was enhanced by a rise in cell density. In leukemic stem cell (LSC) like cells of KG1a and KASUMI cell lines, and TF-1 cell line with MS-5 cell lines derived from mouse marrow interstitial cells, we confirmed that expression of MST1/2 and LATS1/2 increased and phosphorylation of YAP and TAZ was enhanced. We analyzed these LSC and non-LSC-like fractionation using Genechip, but the activation of WNT/ β -catenin and the TGF- β /Smads signal was not found.

研究分野：造血器腫瘍

キーワード：急性骨髄性白血病 白血病幹細胞 Hippo pathway

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病(AML)の治療における最大の問題は再発/治療抵抗性である。AMLは多くの抗癌剤の開発や支持療法確立、造血幹細胞移植の発展によって治癒が期待できる疾患になったが、再発をきたす症例は未だに多く、これらの再発症例では当初は有効であった抗癌剤にさえも治療抵抗性となり予後不良になる。我々はAMLクローンの遺伝子変異多様性獲得による治療抵抗性サブクローンの出現が臨床的に再発/治療抵抗性の原因となっていることを見出した(Leukemia. 2011;25(9):1423-32, Leukemia. 2013;27(5):1044-52, Leukemia. 2016;30(3):545-54, Haematologica. 2016;101(9):1074-81.)。

このAMLクローンの遺伝子変異多様性の獲得には白血病幹細胞(LSC)から分化をした娘白血病細胞が付加的な driver 遺伝子変異を獲得するだけでなく、LSC自身が新規遺伝子変異を獲得し腫瘍として進化している可能性が考えられる。一つのLSCから発生する娘白血病細胞がそれぞれ付加的な driver 遺伝子変異をランダムに獲得したのであれば一症例における遺伝子変異クローン数は膨大な数となるはずであるが、我々の検討ではAML1症例あたりの平均遺伝子変異数は3前後でまた白血病の遺伝子変異クローン数も2-3つ程度であることからLSCが新規の遺伝子変異を獲得していくつかの娘LSCを発生し症例全体のクローンを構成しているのではないかと予想する(Leukemia. 2016;30(3):545-54)。しかしLSCは正常造血幹細胞(HSC) niche を構築する微小環境を模倣し、細胞分裂静止期を維持することで抗癌剤の殺細胞作用から回避すると考えられているが、細胞分裂静止期を維持しているAML-LSCがどのようにして上述のような遺伝子変異多様性を持つようになるのかは明らかになっていない。

LSCの維持には細胞の微小環境より供給されるWNT/ β -catenin やTGF- β /Smads signaling pathway など複数の細胞内シグナル伝達が関与することが報告されている。最近になりHippo pathwayによる細胞増殖の統括的な制御機構が明らかにされLSCの維持に関与をしているのではないかと注目されてきている。Hippo pathwayは細胞接触や機械的ストレス刺激によって活性化するMSTやLATSの2つのキナーゼを中心としたリン酸化カスケードから構成される。MSTやLATSキナーゼは転写共役因子YAPならびにTAZをリン酸化しこれらを核内から細胞質に移行させプロテオソームで分解促進する。YAPやTAZは核内で細胞周期を促進しアポトーシスを抑制しているが、これらが核外へ移動することで細胞周期は静止しアポトーシスが亢進する。最近になりHippo pathwayの抑制がES細胞やiPS細胞の多機能性の維持・獲得に重要な役割を果たしていることが明らかになった。多くの腫瘍細胞においてもHippo pathwayの抑制やそれに伴う核内のYAP/TAZの増加が認められることが報告され、腫瘍幹細胞の自己複製能の維持に関与することが明らかになった。さらに乳癌や神経膠芽腫の中でも高分化の腫瘍細胞がHippo pathwayの破綻によって自己複製能が高まり腫瘍幹細胞様の性質を再獲得することも示されている。

AMLに関してはLSC分画の細胞においてYAPの増加が生じていること(PLoS One. 2013; 8(10):e78453)や、AML症例を対象とした解析においてYAP/TAZに多様なリン酸化パターンが観察され一部の異常リン酸化パターンが予後と関連していることが報告されている(55th ASH.2013.No.1337)。しかし、AML-LSCにおけるHippo pathwayの役割は依然として明らかになっていない。そこで我々はAMLが遺伝子変異多様性を獲得する機序として細胞分裂静止期を維持しているAML-LSCが進化をして遺伝子変異多様性を獲得するのではなく、driver 遺伝子変異を獲得したLSC機能を失った娘白血病細胞(non-LSC)が何らかの機序で再びLSC機能を獲得しているのではないかと仮説を考えた。Hippo pathwayは骨髄微小環境からの細胞接触や機械的ストレス刺激によってHSCやLSCの細胞周期制御に関与をしている可能性があること、Hippo pathwayの抑制がiPS細胞のリプログラミングならびに幹細胞の多機能性獲得に重要な役割を果たしていること、乳癌や神経膠芽腫においてHippo pathwayの抑制がLSC機能の再獲得に関与していることなどからAML-LSCが遺伝子変異多様性を獲得する機序としてHippo pathwayが強く関与していると予想した。

2. 研究の目的

AMLのLSCやnon-LSCにおけるHippo pathwayの役割を明らかにし、AMLがどのようにして遺伝子変異多様性を獲得するのかを明らかにするのが目的である。

3. 研究の方法

1. ヒト骨髄系細胞株(HL60やMV411など自立型細胞株やTF-1やF-36Pなどのサイトカイン依存性細胞株)に関してReal time PCR法やWestern blot法を用いてHippo pathwayにおけるMST1/2、Sav1、LATS1/2、Mob1、TAZ、YAPの遺伝子・蛋白発現解析やリン酸化活性解析を行う。

2. これらの細胞株において細胞密度の上昇によってHippo pathwayの活性化が亢進するのかを上述の様にReal time PCR法やWestern blot法を用いて確認をする。また免疫染色法で低密度培養下ではTAZやYAPが細胞核内に局在しているが、細胞密度の上昇によって細胞質に移動し、再び細胞密度を低下させることで再び核内に移動するのかを確認する。

3.

4. 研究成果

1. ヒト骨髄系細胞株(自立型細胞株: HL60, MV411, K562, KASUMI, KG1a, サイトカイン依存性細胞株: TF-1, F-36P)に関してReal time PCR法とWestern blot法でMST1/2, Sav1, LATS1/2, Mob1, TAZ, YAPの遺伝子発現を解析した。上述の細胞株においていずれも細胞密度の上昇によってMST1/2, LATS1/2の発現が亢進し、YAPならびにTAZのリン酸化の亢進が確認され

た。また免疫染色において細胞密度の上昇によって YAP ならびに TAZ の核内から細胞質への移動が認められた。

2. KG1a と KASUMI において LSC 様分画 CD34 陽性 CD38 陰性分画とそれ以外の分画における Hippo pathway の発現を解析すると LSC 様分画 CD34 陽性 CD38 陰性分画では MST1/2、LATS1/2 の発現が亢進し、YAP ならびに TAZ のリン酸化の亢進が確認された。

3. TF-1 は IL3 や GM-CSF 依存性細胞株だが、マウス骨髄間質細胞由来細胞株 MS-5 と共培養をするとサイトカイン非依存性となり LSC 様細胞が増加する。LSC 様細胞は増加する際に MST1/2、LATS1/2 の発現が亢進し、YAP ならびに TAZ のリン酸化の亢進が確認された。

4. Hippo pathway の活性化が WNT/ β -catenin や TGF- β /Smads signaling pathway を活性化させ LSC の維持に関与をしているのかを確認するために、KG1a と KASUMI の LSC 様分画と非 LSC 様分画、TF-1 細胞の MS-5 との共培養による LSC 様分画の誘導前後の Genechip にて網羅的発現解析を行ったが、WNT/ β -catenin や TGF- β /Smads signaling pathway の活性化は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujiwara Yusuke, Yamaguchi Hiroki, Yui Shunsuke, et al.	4. 巻 41
2. 論文標題 Importance of prognostic stratification via gene mutation analysis in elderly patients with acute myelogenous leukemia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Laboratory Hematology	6. 最初と最後の頁 461 ~ 471
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ijlh.13025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sakaguchi Masahiro, Yamaguchi Hiroki, Najima Yuho, et al.	4. 巻 2
2. 論文標題 Prognostic impact of low allelic ratio FLT3-ITD and NPM1 mutation in acute myeloid leukemia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 2744 ~ 2754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2018020305	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Terada Kazuki, Yamaguchi Hiroki, Ueki Toshimitsu, et al.	4. 巻 57
2. 論文標題 Usefulness of BCR gene mutation as a prognostic factor in acute myeloid leukemia with intermediate cytogenetic prognosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes, Chromosomes and Cancer	6. 最初と最後の頁 401 ~ 408
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/gcc.22542	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Omori Ikuko, Yamaguchi Hiroki, Miyake Koichi, Miyake Noriko, Kitano Tomoaki, Inokuchi Koiti	4. 巻 52
2. 論文標題 D816V mutation in the KIT gene activation loop has greater cell-proliferative and anti-apoptotic ability than N822K mutation in core-binding factor acute myeloid leukemia	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Experimental Hematology	6. 最初と最後の頁 56 ~ 64.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exphem.2017.05.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yui Shunsuke, Kurosawa Saiko, Yamaguchi Hiroki, et al.	4. 巻 96
2. 論文標題 D816 mutation of the KIT gene in core binding factor acute myeloid leukemia is associated with poorer prognosis than other KIT gene mutations	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Annals of Hematology	6. 最初と最後の頁 1641 ~ 1652
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00277-017-3074-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Terada Kazuki, Yamaguchi Hiroki, Ueki Toshimitsu, et al.	4. 巻 97
2. 論文標題 Full-length mutation search of the TP53 gene in acute myeloid leukemia has increased significance as a prognostic factor	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Annals of Hematology	6. 最初と最後の頁 51 ~ 61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00277-017-3143-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamato Genki, Yamaguchi Hiroki, Handa Hiroshi, Shiba Norio, Kawamura Machiko, Wakita Satoshi, Inokuchi Koiti, Hara Yusuke, Ohki Kentaro, Okubo Jun, Park Myoung-Ja, Sotomatsu Manabu, Arakawa Hirokazu, Hayashi Yasuhide	4. 巻 56
2. 論文標題 Clinical features and prognostic impact of PRDM16 expression in adult acute myeloid leukemia	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Genes, Chromosomes and Cancer	6. 最初と最後の頁 800 ~ 809
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/gcc.22483	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakaguchi Masahiro, Yamaguchi Hiroki, Kuboyama Marika, et al.	4. 巻 110
2. 論文標題 Significance of FLT3-tyrosine kinase domain mutation as a prognostic factor for acute myeloid leukemia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 566 ~ 574
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-019-02720-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakaguchi Masahiro, Nakajima Nana, Yamaguchi Hiroki, Najima Yuho, Shono Katsuhiro, Marumo Atsushi, Omori Ikuko, Fujiwara Yusuke, Terada Kazuki, Yui Shunsuke, Wakita Satoshi, Mitaya Miho, Arai Kunihito, Kitano Tomoaki, Doki Noriko, Ohashi Kazuteru, Inokuchi Koiti	4. 巻 13
2. 論文標題 The sensitivity of the FLT3-ITD detection method is an important consideration when diagnosing acute myeloid leukemia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Leukemia Research Reports	6. 最初と最後の頁 100198 ~ 100198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lrr.2020.100198	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Nana Nakajima, Hiroki Yamaguchi, Toshimitsu Ueki, et al.
2. 発表標題 急性骨髄性白血病におけるFLT3-ITDアレル比の予後因子としての重要性
3. 学会等名 第79回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nakagome Shun, Hiroki Yamaguchi, Toshimitsu Ueki, et al.
2. 発表標題 RUNX1変異陽性急性骨髄性白血病の臨床的特徴と治療成績
3. 学会等名 第79回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Atsushi Marumo, Hiroki Yamaguchi, Satoshi Yamanaka, et al.
2. 発表標題 急性骨髄性白血病における微少残存病変としてのNPM1変異高感度検出法の有用性
3. 学会等名 第79回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yui S, Yamaguchi H, Ueki T, et al.
2. 発表標題 The clinical features of Japanese de novo AML with RAS signal transduction pathway genes mutation.
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakajima N, Sakaguchi M, Najima Y, et al.
2. 発表標題 Prognostic impact of acute myeloid leukemia with low allelic ratio FLT3-ITD and NPM1 mutation.
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Date K, Marumo A, Kuboyama M, et al.
2. 発表標題 The presence of minimal residual disease, as determined by quantitation of NPM1-mutated transcripts, provided powerful prognostic information in acute myeloid leukemia.
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sakaguchi M, Yamaguchi H, Najima Y, et al.
2. 発表標題 Two cases of acute myeloid leukemia that FLT3-ITD became false-negative in standard PCR method.
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sakaguchi M, Yamaguchi H, Najima Y, et al.
2. 発表標題 Efficacy of allo-HSCT in CR1 for low allelic ratio FLT3-ITD and NPM1 mutation in AML.
3. 学会等名 第41回日本造血細胞移植学会総会.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kanda M, Wakita S, Arai Y, et al.
2. 発表標題 Analysis for Loss of Heterozygosity on 13q in Acute myeloid leukemia with FLT3-ITD.
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 Arai H, Wakita S, Ueki T, et al.
2. 発表標題 The clinical features of ASXL1 and EZH2 mutation positive Acute myeloid leukemia in a Japanese cohort.
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会.
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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	山口 博樹 (Yamaguchi Hiroki) (90297937)	日本医科大学・医学部・准教授 (32666)	