

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16741

研究課題名(和文)造血幹細胞の悪性化を生み出す「差異」の同定と、新たな治療概念の創出

研究課題名(英文) Identification of differences between hematopoietic stem cell and leukemia stem cell will lead to the creation of new therapeutic concepts

研究代表者

賈 維臻 (JIA, WEIZHEN)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：40791281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞の維持に関与する因子の探索を行い、Galectin-3 (Gal-3) を同定した。Gal-3欠損マウスを用いて造血幹細胞の機能を解析したところ、欠損マウスではG0期の造血幹細胞が減少しており、骨髄再構築能の低下を認められた。その分子機構ではAngiopoietin-1あるいはThrombopoietinが細胞表面のTie2あるいはMplを活性化し、下流のPI3K/AKTシグナルを經由してNF- $\kappa$ Bの核内に移行を促進することでGal-3の転写が誘導される。このように産生されたGal-3はSp1と結合して、p21の転写を促進する。細胞内のp21飽和により造血幹細胞の休眠状態を維持する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血幹細胞は単なる幹細胞としての生物学的な興味のみならず、白血病などがん幹細胞との関連性も強く示唆されており、造血幹細胞の分子機構を理解することはきわめて重要な課題である。本研究では造血幹細胞におけるGal-3がp21転写制御により細胞周期のG0期維持に寄与していることが認められ、造血幹細胞の休眠状態維持にとって重要であることを明らかにした。一方、Gal-3の発現制御が白血病幹細胞の増殖を抑制することを見出した。本研究成果を通して、有効な幹細胞の培養、移植、正常な幹細胞を守る抗がん剤治療、さらにはがん幹細胞への適用などへの応用に寄与できると推測される。

研究成果の概要(英文)：During our extensive exploration into the mechanism of hematopoietic stem cell (HSC) quiescence maintenance, we found that Galectin-3 (Gal-3) is highly expressed in quiescent HSCs. The percentage of long-term HSCs (LT-HSC) in the G0 phase decreased in bone marrow (BM) from Gal-3 knockout (KO) relative to wild-type mice and that lost reconstruction ability of LT-HSCs in Gal-3 KO mice. These results illustrate that Gal-3 regulates the cell-cycle of HSCs and plays a critical role in maintaining the quiescent state.

Our research on the mechanism of how Gal-3 maintains HSC quiescence found that angiopoietin-1 or thrombopoietin, secreted from BM niche cells, binds to the receptor Tie2 or Mpl on the surface of cells. Nuclear translocation of NF- $\kappa$ B mediated by activated PI3K/AKT pathway following stimulation by Tie2 or Mpl expressed in HSCs promotes the production of Gal-3, which then binds to Sp1 and induces p21 transcription which in turn results in the inhibition of cell-cycle progression.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：Galectin-3 造血幹細胞 白血病 細胞周期

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

白血病は「血液のがん」とも呼ばれる疾患である。臨床治療においては、化学療法によって比較的高い寛解導入率が得られているが、長時間寛解を維持できずに再発するケースが少なくない。その原因としては、白血病の根幹となる「白血病幹細胞」が化学療法に対する抵抗性を有しており、完全に死滅させることが困難なためと考えられている。一方で、白血病幹細胞の自己複製や未分化性の維持に関わる分子は造血幹細胞にも同様に重要であり、このような分子を治療標的にした場合には正常造血も障害を受ける。そのため、白血病幹細胞と造血幹細胞との「差異」を明らかにすることが白血病幹細胞を標的とした治療戦略の鍵となる。

近年、白血病幹細胞と造血幹細胞の間で、遺伝子発現、シグナル伝達及び細胞表面マーカーを比較した解析がなされており、その成果から rapamycin などの mTOR (Yilmaz O H et al., Nature 2006) 阻害剤や白血病幹細胞特異的に発現する CLL-1、CD96、TIM-3 に対する抗体療法が開発されている (van Rhenen A et al., Blood 2007; Hosen N et al., PNAS 2007; Kikushige Y et al., Cell Stem Cell 2010)。しかしながら、すべてのクローンを根絶しない限り、治療抵抗性のサブクローンが生存し、あるいは残存するサブクローンが変異することで治療抵抗性を獲得する可能性がある。その原因として治療戦略に結びつく分子機構の解明がいまだ不十分であることが挙げられる。そのため、新たな視点から「差異」の研究が必要である。

### 2. 研究の目的

- (1) 造血幹細胞の維持に關与する Galectin-3 (Gal-3) の詳細な分子機構を解明することにより、これまで不明であった造血幹細胞における Gal-3 の生理機能を解明する。
- (2) (1) で得られた結果から立脚して、正常な造血幹細胞と白血病幹細胞との間で、遺伝子発現やシグナル伝達など、両者の「差異」を明らかにすることにより、白血病幹細胞をターゲットにした、副作用を最小限に抑えた安全で効率的な白血病の治療への応用の可能性を検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 正常な造血幹細胞における Gal-3 発現及び局在の解析

フローサイトメーターを用いて、野生型マウス (8 週齢) の骨髄から造血幹細胞及び前駆細胞を単離し、Real-Time PCR 及び蛍光免疫染色を用いて Gal-3 遺伝子の mRNA 及び蛋白質の発現を検討した。

骨髄組織切片を 10 µm に薄切して、Gal-3、CD150 (造血幹細胞) 及び Endomucin (血管) の抗体で蛍光多重染色を行った。そして、蛍光顕微鏡下で Gal-3 陽性の造血幹細胞における血管内皮細胞寄与の定量的解析を行った。

#### (2) 正常な造血幹細胞における Gal-3 の機能の解明

フローサイトメーターを用いて、野生型及び Gal-3 遺伝子欠損マウスにおける造血幹細胞や前駆細胞などの未分化な細胞群の数や割合を定量的に比較することにより、Gal-3 遺伝子欠損マウスにおける造血異常を明確にした。

CAFC (Cobblestone Area Forming Cell) と CFU (Colony-Forming Units) アッセイにて、造血幹細胞の増殖及び分化能について解析を行った。

骨髄移植モデルにて、造血幹細胞の長期骨髄再構築能について評価を行った。

フローサイトメーター、蛍光多重染色及び Real-Time PCR を用いて、Gal-3 遺伝子欠損マウス由来の造血幹細胞における細胞周期及びアポトーシスを解析した。

造血幹細胞特異的に Gal-3 を過剰発現するトランスジェニックマウス (Vav1-Cre/Flox Gal-3 Tg ; Tie2-Cre/Flox Gal-3 Tg) を作製し、前述した実験にて証明された Gal-3 の機能について検証した。

(3) Gal-3 により造血幹細胞の休眠状態を維持する分子機構の解明

造血幹細胞休眠状態の維持に働くリガンドである Angiopoietin-1 (Ang-1), Thrombopoietin (Thpo), CXCL12 で野生型マウスから単離した造血幹細胞を刺激し、Gal-3 の発現変化や発現制御に寄与するシグナル経路が同定された。

同定されたシグナル経路の詳細を解析するため、in vitro 実験系で純化した造血幹細胞に下流因子を阻害することにより、Gal-3 の発現変化を Real-Time PCR や Western Blotting によって解析し、Gal-3 の発現制御に寄与するシグナル経路の詳細を明らかにした。

Gal-3 抗体を用いて ChIP (クロマチン免疫沈降)-PCR を行い、p21 プロモーター領域に結合するのかが確認した。

(4) 白血病幹細胞と正常な造血幹細胞における Gal-3 制御機構「差異」の同定及び抗腫瘍効果の評価

Regnase-1 を欠損させた白血病の発症マウスを用いて、白血病幹細胞における Gal-3 の維持機構を検討した。Real-Time PCR や Western Blotting を用いて、正常な造血幹細胞との「差異」に寄与する遺伝子と、その下流で白血病の維持に寄与しているシグナル伝達系を探索した。

白血病幹細胞特異的に Gal-3 を過剰発現するトランスジェニックマウス (Vav1-Cre/Flox Gal-3 Regnase-1 KO) を作製し、抗腫瘍効果の検討を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 休眠状態の長期造血幹細胞において Gal-3 が高発現している

造血幹細胞の単離法により、各分化段階での Gal-3 の発現を解析した。活性化した造血幹細胞と比較して、休眠状態の長期造血幹細胞では Gal-3 が高発現していることが明らかになった。さらに、Gal-3、CD150 (造血幹細胞) 及び Endomucin (血管) の抗体を用いて、マウスの骨髄組織を免疫染色したところ、Gal-3 陽性の造血幹細胞は大部分が血管近傍 (血管性ニッチ) に局在していることが認められた (図 1)。

(2) Gal-3 は成体骨髄での造血幹細胞の休眠状態の維持に必須である

Gal-3 遺伝子欠損マウスを用いて造血幹細胞の機能を解析したところ、Gal-3 欠損マウスでは休眠状態 (G0 期) の造血幹細胞が顕著に減少しており (図 2)、骨髄再構築能の低下が認められた。

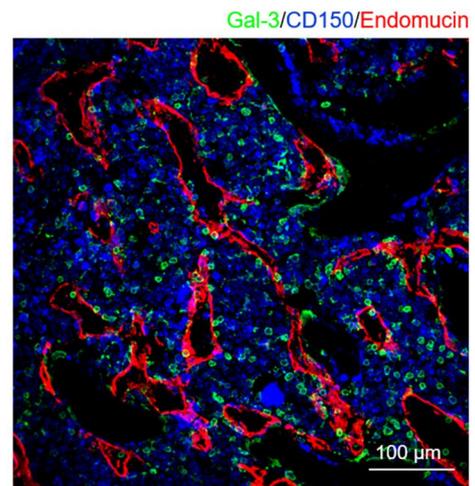


図1：骨髄におけるGal-3陽性造血幹細胞の局在

これにより、Gal-3 が細胞周期制御によって造血幹細胞の休眠状態を維持することが明らかになった。

(3) Gal-3 により造血幹細胞の休眠状態を維持する分子機構

骨髓ニッチ細胞から分泌される Ang-1 あるいは Thpo の結合により造血幹細胞表面の Tie2 あるいは Mpl が活性化し、さらに下流の PI3K/AKT シグナルを經由して NF<sub>k</sub>B の細胞核に移動を促進する。その後、核内 NF<sub>k</sub>B が Gal-3 のプロモーター領域と結合により、Gal-3 の転写を誘導する(図 3 左)。このように产生された Gal-3 は転写因子 Sp1 と結合して、p21 の転写を促進する。細胞内の p21 飽和により造血幹細胞の休眠状態を維持する(図 3 右)。

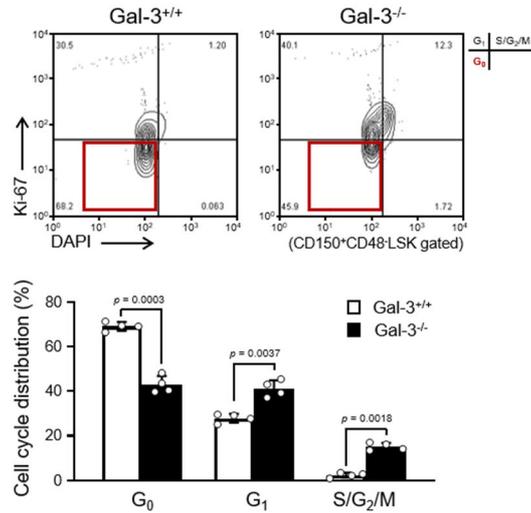


図2 : Gal-3欠損マウスでは休眠状態(G0期)の造血幹細胞が顕著に減少した

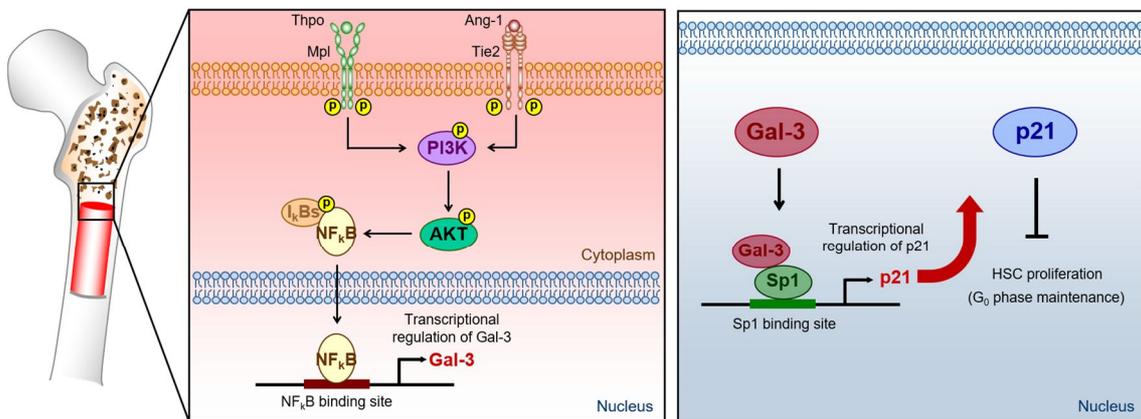


図3 : Gal-3により造血幹細胞の休眠状態を維持する分子機構

(4) Gal-3 の過剰発現が白血病幹細胞の増殖を抑制する

Regnase-1を欠損させた白血病の発症マウスを用いて、白血病幹細胞におけるGal-3の維持機構を検討したところ、白血病幹細胞ではGal-3の発現が有意に減少している。また、Gal-3の過剰発現により、白血病幹細胞の維持に関連する因子であるNROB1、LEF1及びCDH1などが有意に減少することで、白血病発症マウスの寿命を延長できることが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Weizhen Jia, Lingyu Kong, Hiroyasu Kidoya, Hisamichi Naito, Fumitaka Muramatsu, Yumiko Hayashi, Han-Yun Hsieh, Daishi Yamakawa, Daniel K Hsu, Fu-Tong Liu, Nobuyuki Takakura	4. 巻 12
2. 論文標題 Indispensable role of Galectin-3 in promoting quiescence of hematopoietic stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-22346-2	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 -
1. 著者名 Han-Yun Hsieh, Weizhen Jia, Ze-Cheng Jin, Hiroyasu Kidoya, Nobuyuki Takakura	4. 巻 111
2. 論文標題 High expression of PSF1 promotes drug resistance and cell cycle transit in leukemia cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2400-2412
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14452	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 Weizhen Jia, Han-Yun Hsieh, Hiroyasu Kidoya, Nobuyuki Takakura	4. 巻 129
2. 論文標題 Embryonic expression of GINS members in the development of the mammalian nervous system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 104465
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuint.2019.104465	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 Yumiko Hayashi, Weizhen Jia, Hiroyasu Kidoya, Fumitaka Muramatsu, Yohei Tsukada, Nobuyuki Takakura	4. 巻 189
2. 論文標題 Galectin-3 Inhibits Cancer Metastasis by Negatively Regulating Integrin 3 Expression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 900-910
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2018.12.005	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2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 賈 維臻, 木戸屋 浩康
2. 発表標題 神経システム発生におけるGINSメンバーの発現パターンと機能についての検討
3. 学会等名 第3回Neuro-Vascular研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Han-Yun Hsieh, Weizhen Jia, Hiroyasu Kidoya, Nobuyuki Takakura
2. 発表標題 To investigate the molecular mechanism and therapeutic roles of PSF1 in leukemia.
3. 学会等名 AACR Annual Meeting
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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------