

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08379

研究課題名(和文) 形質転換時の代謝リプログラミングにおけるC/EBP の機能解明と治療戦略の開発

研究課題名(英文) Functional significance of Cebpb in metabolic rewiring during transformation and its application to the novel therapeutic approaches

研究代表者

横田 明日美 (Yokota, Asumi)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：00571556

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)：転写因子C/EBP は、炎症などの刺激によって造血幹細胞において発現が誘導され、造血幹・前駆細胞の増殖と骨髄球系細胞への分化を促進する。本研究では、Flt3-ITDノックインマウス造血器腫瘍モデルの造血幹・前駆細胞において、C/EBP の発現が亢進しており、Cebpb遺伝子の欠損によって白血病の病態が顕著に抑制されることを見出した。また、Flt3-ITDによって造血幹・前駆細胞の自己複製能や増殖能は亢進していたが、Cebpb欠損によって有意に抑制されていた。機序として、Flt3-ITDによる脂質代謝関連遺伝子群の活性化が、白血病の病態形成におけるC/EBP の作用点である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、急性骨髄性白血病において認められ、腫瘍形成に寄与するFLT3-ITD変異によって、転写因子C/EBP の発現亢進が誘導されること、また炎症経路や脂質代謝経路の活性化を介して、C/EBP が腫瘍幹細胞の自己複製や増殖を制御しており、病態形成・進展に重要であることを示した。FLT3-ITD陽性白血病に対しては、FLT3阻害剤が初発例から用いられるようになり、予後を改善したが、薬剤耐性や治療抵抗性の問題もあり、治療成績改善は喫緊の課題である。本研究によって、C/EBP またC/EBP が制御する下流経路の重要性を示したことは、新規治療アプローチの開発に繋がる重要な知見となると考える。

研究成果の概要(英文)：The transcription factor C/EBP is induced in hematopoietic stem and progenitor cells in response to stimuli such as inflammation and promotes the proliferation of hematopoietic stem and progenitor cells and their differentiation into myeloid cells. In this study, we found that the expression of C/EBP was elevated in the hematopoietic stem and progenitor cells of the Flt3-ITD knock-in mouse hematopoietic tumor model, and that the deficiency of the Cebpb gene markedly suppressed the pathology of leukemia. Additionally, while Flt3-ITD enhanced the self-renewal and proliferation abilities of hematopoietic stem and progenitor cells, these abilities were significantly abrogated by the deficiency of Cebpb. Mechanistically, it was suggested that the activation of lipid metabolism-related genes by Flt3-ITD could be the target of C/EBP in the formation of leukemia pathology.

研究分野：血液学

キーワード：転写因子 C/EBP 細胞分化 細胞増殖 造血器腫瘍

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞の分化・増殖の制御には、細胞内代謝のダイナミックな変化が起こる。C/EBPβは、脂肪細胞分化のマスター転写因子であり、PPAR γ やCPT1A、SREBP1等の脂質代謝関連分子の発現を直接制御しており、ノックアウト(KO)マウスは脂肪組織減少や低血糖をきたす。申請者は以前、慢性骨髄性白血病(CML)に関する研究を行い、マウスおよびヒトHSPCsにおいて、BCR-ABL融合蛋白が、STAT5の活性化を介して転写因子C/EBPβの発現を誘導すること、C/EBPβがBCR-ABL発現HSPCsのミエロイドへの分化を誘導することを報告した。興味深いことに、BCR-ABLを導入した野生型(WT)と*Cebpb* KOマウスHSPCsの遺伝子発現の解析から、*Cebpb* KO HSPCsにおいて脂質代謝関連遺伝子の発現が低下していた。CMLに加えて、急性骨髄性白血病(AML)の発症に重要なFLT3変異、またRAS変異においても、両者シグナルが代謝リプログラミングを誘導することが形質転換に寄与する可能性(Jones CL et al, *Cancer Cell* 2018; Gallipoli P et al, *Blood* 2018; Stuanil L et al, *BMC Biol* 2019; Stevens BM et al, *Nat Cancer* 2020)およびC/EBPβが細胞増殖誘導に重要であることを示唆するデータが報告されている(Zhu S et al, *PNAS* 2002; Haas SC et al, *Br J Haematol* 2010; Atwood AA et al, *Small GTPases* 2011)。以上から、造血器腫瘍において、C/EBPβは脂質代謝亢進へと代謝リプログラミングを誘導することで、細胞の形質転換に貢献しており、この経路が治療標的となるのではないかと仮説を立てた。

本研究における学術的「問い」は、(1)脂肪細胞のマスター転写因子C/EBPβが制御する脂質代謝経路が造血器腫瘍における形質転換のプロセスにどのように寄与しているか、(2)C/EBPβ依存性の脂質代謝経路が治療標的となるか、である。形質転換における代謝リプログラミングが重要であることを示唆する報告はあるが、その詳細な機序は解明されていない。また、BCR-ABL、FLT3-ITD陽性症例に対しては、阻害剤が臨床で用いられる一方、治療中の薬剤耐性の出現が問題となっており、RAS阻害剤は開発の困難さから未だ臨床で広く用いられるものは無い。よって、C/EBPβ依存性の脂質代謝経路がどのように形質転換に寄与しているか、また治療標的となり得るか、について詳細を明らかにすることは、CMLおよびAML治療における現在の問題点の解決に繋がることが期待できる。

2. 研究の目的

目的 1: BCR-ABL、NRAS・FLT3変異によって誘導される形質転換のプロセスにおいて、C/EBPβが制御する脂質代謝経路の寄与の解明

目的 2: BCR-ABL、NRAS・FLT3変異によって誘導される造血器腫瘍における、C/EBPβが制御する代謝リプログラミングを標的とする新規治療戦略の開発

3. 研究の方法

(1) NRAS-G12D, FLT3-ITD変異誘導性造血器腫瘍マウスモデルの構築

当初の予定では、BCR-ABL、NRAS-G12D、FLT3-ITDいずれもレトロウイルスによるマウス骨髄細胞への遺伝子導入と骨髄移植を組み合わせることでモデルマウスを構築することとしていたが、過剰発現ではなくより生理的な条件での各遺伝子変異の発現を試みることにした。Nras-G12D変異は、Creリコンビナーゼによって変異型Nrasが発現するシステムかつ、マウスNras遺伝子座にNras-G12D変異がノックインされたマウスを用いた。血液細胞特異的なNras-G12Dの発現を誘導するために、*Vav1-Cre*を本研究では用いた。さらに、Flt3-ITDについても、マウスFlt3遺伝子座にITD変異をノックインしたマウスを用いることにした。

(2) NRAS-G12D, FLT3-ITD変異誘導性造血器腫瘍マウスモデルにおけるC/EBPβの役割の解明

上記のマウスモデルの病態形成における、転写因子C/EBPβの機能を明らかにするために、同じ

く *Vav1-Cre* 誘導性に血液細胞特異的に *Cebpb* 遺伝子のノックアウトを実現できる、*Vav1-Cre/Cebpb* flox マウスを上記 2 系統のマウスと交配して、解析に使用するマウスを樹立した。*Cebpb* 遺伝子の欠損が、それぞれの造血器腫瘍モデルにおける病態形成や進展に与える影響について、マウスの血液学的解析、腫瘍幹細胞機能解析としてメチルセルロース半固形培地での colony assay、また骨髄移植を行った。さらに、*Cebpb* の欠損の影響が顕著であった Flt3-ITD ノックインモデルにおいて、Flt3-ITD と Flt3-ITD/*Cebpb* conditional KO (cKO) の両者で、骨髄中で最も増幅の程度が大きい MPP3、MPP4 をセルソーターにて分取し、RNA-seq を行って遺伝子発現プロファイルの変化を調べた。これによって、Flt3-ITD シグナル下において C/EBPβ が制御する重要な遺伝子群の抽出を試みた。

4. 研究成果

(1) *Nras-G12D* および Flt3-ITD ノックインマウス両方において、マウスの週齢増加に伴って、脾腫、白血球数の増加、好中球や単球などのミエロイド系統の細胞の増加、また未分化な造血幹・前駆細胞分画の増幅が認められた。特に Flt3-ITD では MPP3、MPP4 の増幅が顕著であり、これは MPP4 が Flt3 を発現する幹細胞集団であることが関係するものと考えられた。また、白血球数増加や貧血、脾腫が認められるタイミングでこれら 2 系統のマウスから c-Kit 陽性細胞を磁気ビーズで単離後、定量 RT-PCR ならびに western blotting にて C/EBPβ の発現量を調べた。両者とも、mRNA の発現量は上昇の傾向ではあったが、有意差を認めなかった。一方で、タンパクの発現レベルは Flt3-ITD c-Kit 陽性細胞で大幅な上昇を認めた。C/EBPβ は転写レベルのみでなく、翻訳レベルでの発現制御機構の重要性が知られている分子の一つである。また、これまでの報告からも、C/EBPβ は腫瘍細胞の分化や細胞増殖、またグルコースや脂質代謝の制御を介して、腫瘍形成に寄与することが報告されている。よって、本研究では Flt3-ITD モデルに以降焦点を当ててさらに検証を行った。

(2) Flt3-ITD と Flt3-ITD/*Cebpb* cKO の両者の病態比較を行ったところ、*Cebpb* の欠損によって、Flt3-ITD によって誘導される末梢血中白血球数の増加、脾腫、骨髄中の造血幹・前駆細胞の増加といった所見が顕著に抑制されていた。また、骨髄中 c-Kit 陽性細胞を用いた colony assay による白血病幹細胞の機能評価では、*Cebpb* の欠損によってコロニーサイズやコロニー形成能の有意な低下が認められ、C/EBPβ が白血病幹細胞の増殖ならびに自己複製能を制御する可能性が示唆された。また、同じく骨髄中 c-Kit 陽性細胞の骨髄移植後のレシピエントの解析は、現在途中経過ではあるが、*Cebpb* の欠損によって病態の進行を顕著に抑制する所見を得ている。また、RNA-seq の解析から、骨髄中の MPP4/MPP3 において、Flt3-ITD によって細胞増殖、細胞接着、炎症反応、代謝に関わる伝子群の発現が上昇していたのに対して、*Cebpb* 欠損によってこれらは抑制されていた。

以上から、本研究成果によって、Flt3-ITD による病態形成において、C/EBPβ は下流の細胞増殖や炎症、代謝経路の活性化を介して重要な役割を担うことが示唆された。今後は、C/EBPβ が制御する特に重要な経路や分子を同定し、FLT3-ITD 変異によって引き起こされる白血病に対して新たな治療標的を明らかにしたい。

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 2件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Vanickova Karolina, Milosevic Mirko, Ribeiro Bas Irina, Burocziova Monika, Yokota Asumi, Danek Petr, Grusanovic Srdjan, Chili?ski Mateusz, Plewczynski Dariusz, Rohlena Jakub, Hirai Hideyo, Rohlenova Katerina, Alberich Jorda Meritxell | 4. 巻 42 |
| 2. 論文標題 Hematopoietic stem cells undergo a lymphoid to myeloid switch in early stages of emergency granulopoiesis | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 The EMBO Journal | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2023113527 | 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 Ikeda N, Kubota H, Suzuki R, Morita M, Yoshimura A, Osada Y, Kishida K, Kitamura D, Iwata A, Yotsumoto S, Kurotaki D, Nishimura K, Nishiyama A, Tamura T, Kamatani T, Tsunoda T, Murakawa M, Asahina Y, Hayashi Y, Harada H, Harada Y, Yokota A, Hirai H, Seki T, Kuwahara M, Yamashita M, Shichino S, Tanaka M, Asano K. | 4. 巻 42 |
| 2. 論文標題 The early neutrophil-committed progenitors aberrantly differentiate into immunoregulatory monocytes during emergency myelopoiesis | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Cell Reports | 6. 最初と最後の頁 112165 ~ 112165 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2023.112165 | 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 Kamio N*, Yokota A*, Tokuda Y, Ogasawara C, Nakano M, Nagao M, Tashiro K, Maekawa T, Onai N, Hirai H | 4. 巻 209 |
| 2. 論文標題 A Novel CD135+ Subset of Mouse Monocytes with a Distinct Differentiation Pathway and Antigen-Presenting Properties | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of Immunology | 6. 最初と最後の頁 498 ~ 509 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.2100024 | 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 Tang Y, Xu Q, Hu L, Yan X, Feng X, Yokota A, Wang W, Zhang D, Krishnamurthy D, Ochayon DE, Wen L, Huo L, Zeng H, Luo Y, Huang F, Wunderlich M, Zhang J, Vivier E, Zhou J, Waggoner SN, Huang G. | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Tumor microenvironment-derived R-Spondins enhance anti-tumor immunity to suppress tumor growth and sensitize for immune checkpoint blockade therapy. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Discovery | 6. 最初と最後の頁 3142-3157 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/2159-8290.CD-20-0833 | 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 該当する |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 横田明日美、空谷優希、赤石佳音、佐藤水萌、平位秀世 |
| 2. 発表標題 単球造およびFLT3-ITD白血病モデルにおけるC/EBP の機能 |
| 3. 学会等名 第28回造血器腫瘍研究会 |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yokota A, Sakabe Y, Akaishi K, Inose M, Kamio N, Okuda H, Nishiyama A, Tamura T, Hirai H |
| 2. 発表標題 C/EBP is involved in the regulation of CD135+ novel monocyte subset in mice. |
| 3. 学会等名 The 85th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 神藤響生, 横田明日美, 平位秀世 |
| 2. 発表標題 ミエロイドへの分化過程における遠位エンハンサーによるC/EBP 発現制御機構の解明 |
| 3. 学会等名 The 85th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yokota A, Kamio N, Tokuda Y, Ogasawara C, Nakano M, Tashiro K, Onai N, Hirai H |
| 2. 発表標題 A novel monocyte subset with a distinct differentiation path and antigen-presenting properties. |
| 3. 学会等名 The 84th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京薬科大学 生命科学部 生命医科学科HP
<https://www.toyaku.ac.jp/lifescience/departments/biomed/research.html#anc-04>
東京薬科大学 生命科学部 幹細胞制御学HP
<https://www.ls.toyaku.ac.jp/~stemcell/>

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 | 平位 秀世 (Hirai HIDEYO) (50315933) | 東京薬科大学・生命科学部・教授 (32659) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|