

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08411

研究課題名(和文) 誘導型生体内白血病発症マウスモデル系を用いた白血病幹細胞の分子基盤の統合解析

研究課題名(英文) Integrated analysis of the molecular basis of leukemia stem cells using a mouse model inducibly developing leukemia

研究代表者

小埜 良一 (Ono, Ryoichi)

三重大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：40422414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、研究代表者が独自に構築した条件付きMLL-ENL発現マウスモデルを用いて、白血病幹細胞の生じる母地となる血球細胞の未分化性との関連に注目し、未分化であるほど白血病幹細胞が生じやすくなることを見出した。また、その分子メカニズムを解析したところ、MLL-ENLの直接的下流分子として、BAHCC1を新たに見出し、BAHCC1がMLL-ENL白血病発症の分子機構において、重要な役割を果たしていることも、種々の分子生物学的手法を用いて、明らかにした。さらに、ヒト白血病細胞においても、同様に重要であることを確認し、Blood Advances誌に投稿して、受理された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で扱っている白血病は、血液系における「がん」と位置付けられる。近年、骨髄移植などの強力な治療法に加えて、時として非常に効果的な分子標的療法の開発により、治療成績において一定の改善が認められてきた。その一方で、こうした恩恵を受けられていないタイプの白血病もまだ少なからず存在しており、新たな治療法の開発が求められている。本研究では、我々などの先行研究により、難治性と相関する、未分化な造血細胞を発症母地とするタイプの白血病のマウスモデルを用いて、従来ほとんど知られていなかった、白血病発症における重要な役割を果たしている新たな分子機構の一端を解明し、今後、新たな治療標的の探索を目指していく。

研究成果の概要(英文)：In this study, using a conditional MLL-ENL transgenic mouse model originally constructed by our group, we focused on the relationship between the undifferentiated nature of hematopoietic cells, which are the mother cells from which leukemia stem cells arise, and found that the more undifferentiated they are, the more likely they are to produce leukemia stem cells. Using a variety of molecular biological techniques, we also found that BAHCC1 plays an important role in the molecular mechanism of MLL-ENL leukemogenesis. Furthermore, we confirmed that BAHCC1 is equally important in human leukemia cells, and submitted the manuscript to Blood Advances for publication, which was accepted.

研究分野：血液腫瘍学

キーワード：造血器腫瘍

1. 研究開始当初の背景

(1) 白血病幹細胞(LSC)モデルは、異種骨髄移植(BMT)を用いた白血病発症能を検討する実験系で、ヒト白血病では、ヒト正常造血系と同様に、ヒトの造血幹細胞が濃縮される CD34+CD38- 分画から効率よく白血病の発症が誘導されるという知見に基づいて、異常な自己複製能及び白血病(前駆)細胞への分化能(LSC 活性)を有する LSC に由来する階層的細胞集団によって異常造血系が構成されているという概念として、Dick JE らによって提唱されたものである(Bonnet D and Dick JE, Nat Med, 3:730-737, 1997)。この概念は、さらに普遍的にがん幹細胞モデルへ発展し、様々な悪性腫瘍の病態の理解に敷衍され、今世紀になってからのがん研究の進展の根底をなしていると言っても過言ではない。

こうした普遍的な癌幹細胞モデルの先駆けであった LSC モデルは、白血病の根治に直結する LSC の根絶を念頭に、LSC が生じる分子生物学的基盤に関して、様々な白血病発症モデルが用いられて、精力的に研究が行われてきた(Battle E&Clevers H. Nat Med,23:1124-1134,2017)。特に、正常造血系と類似した LSC を頂点としたピラミッド構造の細胞集団が想定される急性骨髄性白血病(AML)では、造血幹細胞(HSC)に関連する研究成果も反映されて、LSC の研究が急速に発展した(Yamashita M ら. Nat Rev Cancer,20:365-382, 2020)。その結果、AML において、LSC は HSC と分子細胞生物学的性状を一部共有すること等の重要な知見が蓄積されてきたが、LSC を根絶する治療法は未だ確立されていない。一方で、次世代シーケンサーなどによる近年の AML 細胞のクローン解析から、LSC は、起点は一つの遺伝子変異であっても、不均一なクローン由来で複数存在し、治療などの影響などにより、主要クローンが選択されて AML を構成していることも見出されている(Shlush LI ら. Nature,547:104-108,2017)。このように、近年発展の著しい、幹細胞やゲノム・エピゲノムにおける最新の研究成果を踏まえて、LSC 研究の新たな展開を図っていく必要があると考えられる。

(2) こうした LSC の研究において、我々が独自に樹立した白血病の解析マウスモデル(Ono ら. Blood,122:1271-1283,2013)を改良して得られた、誘導型生体内 AML 発症モデル(cTg-ME)マウスが非常に有用であることを見出した(Ono ら . 投稿中(その後、PLoS One,16:e0248425, 2021 として発表))。cTg-ME マウスは、AML の原因遺伝子変異の一つ、*MLL-ENL* 融合遺伝子の発現を、マウスの正常 *Mll* に近い発現レベルで誘導することで、AML 発症を来す。従来系と比べ、非生理的要因となる体外培養、レトロウイルス等による遺伝子導入、BMT のような操作を要せずに AML 発症を誘導するため、より生理的条件に近い観点からの、*in vivo* モデル系としての解析が可能になった。さらに、*in vitro* モデル系としても、遺伝子導入が非常に困難な HSC 関連分画においても、容易に、極めて少数から単一細胞レベルで発現誘導が可能となった。実際に、こうした cTg-ME マウスの特性を生かして、精緻な HSC 関連細胞分画における少数細胞での予備的検討を行って見たところ、以前の LSC が CD34 陰性を基軸とする HSC 関連分画からのみ生じるといった結果と比べ、以前には分画しなかった HSC 関連分画から異なる性状を呈する何種類かの LSC が誘導されるという興味深い結果が得られていた。さらに、*in vivo* においても、複数の病型の AML が発症誘導され、病型に応じて異なる LSC が出現することや、遺伝子導入を用いる一般的な BMT モデルにおける LSC と異なる性状を呈することも見出していた。こうした背景から、AML の誘導型生体内発症モデル系を用いて、LSC の異常な幹細胞としての性状をもたらす分子基盤について、最近の HSC に関連する知見を踏まえ、最新のトランスクリプトーム・エピゲノムの解析手法もまじえて、複数の LSC について多角的に解析を進めるといった着想にいたった。

2. 研究の目的

本研究では、独自の cTg-ME マウスを活用して、最近の HSC 関連の知見を踏まえつつ、種々の LSC を誘導し、最新の解析技術に基づく網羅的なトランスクリプトーム及びエピゲノム解析を行った上で、LSC の相互比較や正常 HSC との比較をし、治療に有用な分子標的の可能性も探りながら、統合的に LSC の分子基盤を整備、解明していくことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) cTg-ME マウスの骨髄から、最近の知見に基づき、SLAM family などの表面抗原を用いて、セルソーター機器を使用して HSC 関連細胞分画を純化して採取し、*in vitro* で *MLL-ENL* の発現を誘導する薬剤存在下に不死化を誘導する。こうして得られた不死化細胞を LSC のモデル細胞として、自己複製能および、分化表面抗原の高発現細胞への分化能を有する細胞集団を、各種未

分化表面抗原等を指標に絞り込み、LSC 活性を有する種々の LSC 分画を同定する。(必要に応じて BMT による AML の再構築能も適宜参考にする。)

(2) (1) で得られた種々の不死化細胞について、代表的なものに関して、LSC 活性を喪失した分化細胞群などの対照群も用意して、RNA シークエンス(RNA-seq)や、MLL-ENL 自身や幾つかのヒストンコード等に対する免疫沈降定量 PCR (ChIP-qPCR)を行い、ある種の LSC あるいは全 LSC に共通する、特徴的な遺伝子発現制御機構を統合的に明らかにしていく。必要に応じて、公開されているヒト白血病におけるデータベース解析も行って、矛盾しない結果であることも確認する。

(3) (2) の結果に基づき、特に重要で依存性の高いと想定される分子経路に関しては、機能亢進に対するロックダウン、機能抑制に対する遺伝子導入、あるいは存在すれば同等の効果をもたらす薬剤を用いて、LSC 活性が低減可能かを *in vitro* で検討する。さらに、有望なものに関しては、cTg-ME モデル系に立ち返り、AML の発症や進行、可能なら二次移植における白血病の再構築を指標とした、*in vivo* の LSC 活性の阻害効果も検討し、今後の分子標的候補の発見につながる知見を見出す。

4. 研究成果

(1) cTg マウスの骨髄から、CD150+CD48-cKit^{high}Sca-1^{high}Lineage^{negative} (LT-HSC)、CD150-CD48-cKit^{high}Sca-1^{high}Lineage^{negative} (ST-HSC)、CD150+CD48+cKit^{high}Sca-1^{high}Lineage^{negative} (MPP2)、CD150-CD48+cKit^{high}Sca-1^{high}Lineage^{negative} (MPP3/4)の分画から細胞を純化採取し、発現誘導薬剤と stem cell factor、interleukin-3、interleukin-6、GM-CSF を含むメチルセルロース培地で培養し、その後 5-7 日ごとに、細胞を回収して、同様のサイトカインを含むメチルセルロース培地に一定数をまきなおすコロニープレATINGアッセイを行った(図1)。LT-HSC は、常に無限にコロニーを継代可能で、最終的に液体培地でも培養可能となるレベルの不死化をきたしたが、MPP3/4 は何度試行しても不死化しなかった。一方で、MPP2 と ST-HSC は不死化する場合もあれば、しない場合もあった。なお、不死化に際して、MLL-ENL の誘導される発現レベルは、各分画においてほぼ同様であることも確認した。

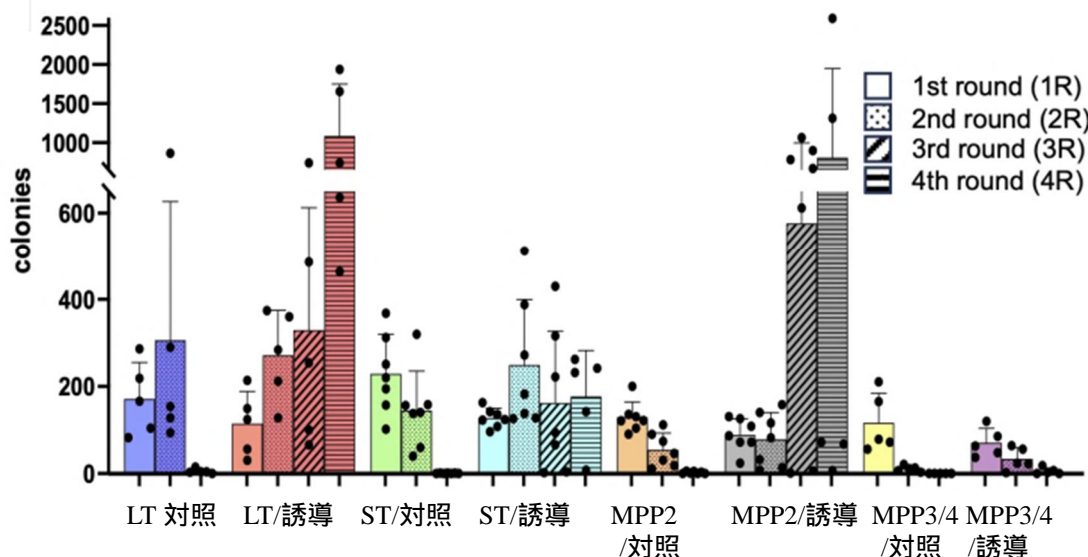


図1 cTg マウス由来の造血幹・前駆細胞における不死化能の検討

(2) (1) において得られた、種々の母地由来の不死化細胞について、その分子生物学的性状を解析した。MLL-ENL の重要下流遺伝子 *Hoxa9*、*Meis1*、*Evi1* の発現レベルや、細胞表面抗原の発現パターン、アポトーシスの状況なども比較検討したが、一部、LT-HSC と MPP2 で多少の類似性が認められるデータがあったが、明確な差異は、発見できなかった。そこで、MPP2 由来と ST-HSC 由来の不死化細胞を生じる初期段階の細胞について、RNA-seq を行い、興味深い発現変動が認められる遺伝子を抽出し、過去の報告(Ono ら. Blood,122:1271-1283,2013)のデータ解析とも照らし合わせて、その中から、本研究では *Bahce1* 遺伝子に着目することにした。

(3) *Bahce1* が不死化においてどのような役割をしているかについて、不死化 LT-HSC において、shRNA を用いた遺伝子ロックダウン実験を行った(図2)。発現レベルを十分に低下させると、コロニー形成能の減弱やアポトーシス細胞の増加など、不死化能の減弱傾向が認められ、*in vitro* において、*Bahce1* が MLL-ENL による不死化において、何らかの重要な役割を果たしていることが示唆された。また、*Bahce1* は、不死化に際して、その発現が上昇していたことから、別の

研究グループの研究結果も踏まえて、*MLL-ENL* による発現制御を受けている可能性を検討した。そのため、*MLL-ENL* による不死化細胞における、プロモータ領域の ChIP-qPCR を行ってみたところ、*MLL-ENL* の局在シグナルが認められ、上記仮説が裏付けられた。また、同様に公開されている *MLL-ENL* 陽性ヒト白血病細胞株のデータ解析においても、*BAHCC1* のプロモータ領域に *MLL-ENL* の局在が確認できた。

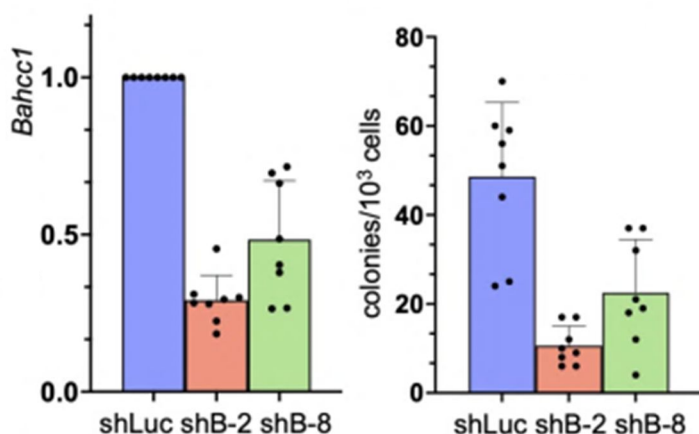


図2 *Bahcc1* のノックダウンによる発現低下時の、不死化 LT-HSC のコロニー形成能二種類のノックダウン用の shRNA (shB-2、shB-8) と対照の shRNA (shLuc) を発現導入して、ノックダウンの効率を RT-qPCR 法にて確認し(左図)、導入細胞のコロニー形成能を解析した。

(4) さらに、*Bahcc1* が白血病発症においてどのような役割をしているのかについて、*MLL-ENL* の発現導入で生じたマウス AML 細胞を用意し、(3) と同様に shRNA を用いて、*Bahcc1* をノックダウンしたうえで、別のレシピエントマウスに骨髄移植する、二次移植実験の実験系を用いて検討した(図3)。(3)の結果と矛盾なく、ノックダウンした細胞を移植されたマウスは、対照群のマウスがすべて死亡する段階でも、半数が生存し、死亡した半数においても、その骨髄細胞におけるノックダウン効果は消えていたため、ノックダウン効果の弱い細胞が優位になって徐々に死亡したと考えられることにより、*in vivo* においても、*Bahcc1* が *MLL-ENL* による白血病発症において、何らかの重要な役割を果たしていることが示唆された。

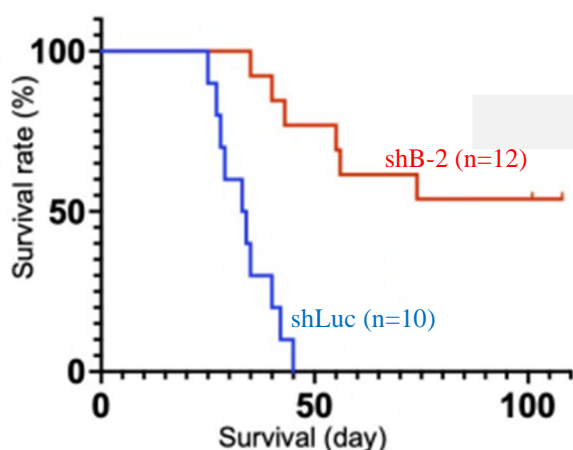


図3 *MLL-ENL* 白血病細胞の二次移植実験における *Bahcc1* ノックダウンの効果

(5) こうして得られた知見について、ヒト白血病においても再現されるかについても、検討した。*MLL-ENL* を発現する白血病細胞株と、別の主要な *MLL* 融合遺伝子の一つ *MLL-AF9* を発現する白血病細胞株を用意し、shRNA を用いて *BAHCC1* のノックダウンを行い、細胞増殖における影響を検討したところ、予想通り、ノックダウンされた場合は、有意に細胞増殖が抑制されており、ヒト *MLL-ENL* 白血病や、一部の別の *MLL* 融合遺伝子による白血病でも、*BAHCC1* が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

(6) 以上の結果から、*Bahcc1* は *MLL-ENL* 白血病の発症において、*MLL-ENL* の直接的な下流分子として、重要な役割を果たしていることが明らかとなった。本研究では、*Bahcc1* が先行研究にあるように、トリメチル化されたヒストン H3 リジン 27 の認識を介した機序として、腫瘍抑制分子の発現を抑制している可能性の一端も明らかにしたが、今後、分子標的となる機序や分子の探索を目指して、*MLL* 融合遺伝子-*Bahcc1*/*BAHCC1* 軸に関して、さらなる解析を進めていく予定である。なお、本研究の成果は、Blood Advances 誌に発表した(Nakamura A, et al., in press)。

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 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nakamura A, Masuya M, Shinmei M, Tawara I, Nosaka T, Ono R.	4. 巻 -
2. 論文標題 Bahcc1 is critical for the aberrant epigenetic program in a mouse model of MLL-ENL-mediated leukemia.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Blood Advances	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） 10.1182/bloodadvances.2023011320	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 Ohtsuka J, Imai M, Fukumura M, Maeda M, Eguchi A, Ono R, Maemura T, Ito M, Yamayoshi S, Kataoka Y, Kawaoka Y, Nosaka T.	4. 巻 24
2. 論文標題 Non-propagative human parainfluenza virus type 2 nasal vaccine robustly protects the upper and lower airways against SARS-CoV-2.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103379
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2021.103379	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 D'Alessandro-Gabazza CN, Yasuma T, Kobayashi T, Toda M, Abdel-Hamid AM, Fujimoto H, Hataji O, Nakahara H, Takeshita A, Nishihama K, Okano T, Saiki H, Okano Y, Tomaru A, Fridman D'Alessandro V, Shiraishi M, Mizoguchi A, Ono R, Ohtsuka J, Fukumura M, Nosaka T, et al..	4. 巻 13
2. 論文標題 Inhibition of lung microbiota-derived proapoptotic peptides ameliorates acute exacerbation of pulmonary fibrosis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1558
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-29064-3	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Nakamura A, Masuya M, Shinmei M, Tawara I, Nosaka T, Ono R.
2. 発表標題 Bahcc1 is critical for the aberrant epigenetic program in MLL-ENL-mediated leukemogenesis.
3. 学会等名 第85回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2023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
研究協力者	野阪 哲哉 (Nosaka Tetsuya) (30218309)	三重大学大学院・医学系研究科・教授 (14101)	

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
---------	---------