

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430149

研究課題名(和文) STAT-C/EBP 経路を介した慢性骨髄性白血病幹細胞枯渇療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic strategy targeting CML stem cells through STAT-C/EBPbeta pathway

研究代表者

横田 明日美 (Yokota, Asumi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：00571556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：次世代シーケンサーを用いた検討から、転写因子STAT5が、BCR-ABLシグナル依存性に結合する領域をC/EBP 遺伝子の下流遠位領域において新たに同定し、C/EBP のエンハンサーである可能性が考えられた。また、CMLにおいて治療薬として用いられてきたインターフェロン (IFN)が、STAT5を介してC/EBP の発現を誘導すること、またIFN 刺激誘導性に前述のエンハンサー候補領域にSTAT5が動員されることを明らかにした。さらに、CMLマウスモデルにおける検討からも、IFN はC/EBP を介してCML幹細胞の分化と枯渇を誘導することを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：By analysis using a next-generation sequencer, we identified a novel 3' distal enhancer region of Cebpb, where STAT5 are recruited in a BCR-ABL signaling-dependent manner. We also found that IFN , which has been used for the treatment of CML, can efficiently upregulate C/EBP expression, and promote exhaustion and differentiation of CML stem cells through C/EBP . Interestingly, IFN phosphorylate STAT5 including STAT1 and STAT3, and recruited STAT5 to a Cebpb enhancer region, which we identified in this study. IFN also decreased CML stem cells in a mouse model, and this effect is abolished in C/EBP -deficient CML stem cells, indicating that the in vivo effect of IFN is mediated by C/EBP .

研究分野：腫瘍学

キーワード：転写因子 慢性骨髄性白血病

1. 研究開始当初の背景

転写因子 C/EBP β は、感染やストレス刺激下におけるミエロイド優位の造血亢進に必須の転写因子であり、造血幹細胞・前駆細胞レベルからの増殖亢進とミエロイドへの分化を強力に誘導することで、緊急時の速やかな顆粒球産生を担うことを我々は報告している (Hirai H et al, *Nat Immunol* 2006; Satake S and Hirai H et al, *J Immunol* 2012)。

さらに、慢性期の慢性骨髄性白血病 (CML) で見られる成熟好中球の増加の病態にも、BCR-ABL シグナル依存性に発現誘導される C/EBP β が関与することを明らかにしてきた (Hayashi Y and Hirai H et al, *Leukemia* 2013)。

2. 研究の目的

今回の研究の目的は、

(1) BCR-ABL シグナルで活性化される様々な下流分子のうち、どの分子が C/EBP β の発現誘導に重要であるかを明らかにすること、

(2) C/EBP β の機能として、「ミエロイドへの分化誘導」に着目し、未分化かつ静止期に維持される CML 幹細胞において C/EBP β の発現や機能を増強することで、CML 幹細胞の分化と枯渇を誘導し、C/EBP β を介した CML 幹細胞を標的とする新規治療戦略を開発すること、の2点である。

3. 研究の方法

(1) C/EBP β の発現制御に関わる BCR-ABL シグナル下流分子の同定

これまでの C/EBP β の発現制御に関しては、プロモーター領域への STAT3 や CREB といった転写因子の結合が報告されているため、C/EBP β 遺伝子上流に STAT5 が結合し、転写活性化に関与する領域が存在するかどうか、reporter assay で検討を行う。また、遠位エンハンサーを介した制御の可能性も考慮し、reporter assay での検討が難しい場合には、クロマチン免疫沈降産物の次世代シーケンス解析 (ChIP-seq) を行い、C/EBP β 遺伝子の上流・下流の領域を網羅的に探索する。

(2) C/EBP β を介した CML 幹細胞を標的とした新規治療法の開発

BCR-ABL シグナル非依存性に生存している CML 幹細胞において、BCR-ABL とは独立した経路で C/EBP β の発現や機能を上昇し得る手法として、サイトカイン刺激を検討する。どのサイトカインが最も効果的に C/EBP β の発現や機能を上昇し得るか、マウス造血幹細胞株を用いて検討する。また、野生型及び C/EBP β ノックアウトマウスの骨髄細胞に、レトロウイルスを用いて BCR-ABL を導入し、これをレシピエントマウスに移植することで CML モデルを作製し、同定したサイトカインを投与することで、CML 幹細胞を枯渇させることが可能であるか、検討を行う。

4. 研究成果

(1) C/EBP β の発現制御に関わる BCR-ABL シグナル下流分子の同定

C/EBP β の約 4kb 上流の領域の探索では、STAT5 の結合部位、また STAT5 による転写活性化に関与する領域を同定できなかったため、京都府立医科大学ゲノム医科学教室との共同研究により ChIP-seq を行い、C/EBP β 遺伝子の上流・下流の領域を網羅的に探索した。

マウス造血幹細胞株である EML 細胞にレトロウイルスを用いて BCR-ABL を導入し、抗 STAT5 抗体を用いて ChIP を行い、得られたゲノム DNA 断片について次世代シーケンサーを用いて解析を行った。その結果、C/EBP β の 3'遠位領域に、BCR-ABL シグナル依存性に STAT5 が結合する領域を同定した。この領域は、ヒトを含めて種間で保存されていることを明らかにした。一方、C/EBP β のプロモーター領域には、BCR-ABL シグナル依存性の STAT5 の動員は認められなかった。

本研究成果を受けて、今後、CRISPR/Cas9 システムを用いてエンハンサー候補領域の欠失変異細胞株を作製し、BCR-ABL による C/EBP β 発現誘導へのエンハンサー候補領域の関与について解明する予定である。

(2) C/EBP β を介した CML 幹細胞を標的とした新規治療法の開発

これまで臨床で用いられているサイトカインであることから、G-CSF、GM-CSF、IFN α 、TPO による刺激後の C/EBP β の発現レベルについて検討を行ったところ、最も効率良く C/EBP β の発現を誘導し得たものが IFN α であったため、以降の実験は IFN α のみについて検討を行った。

EML 細胞に上述と同様に BCR-ABL を導入し、IFN α また ABL キナーゼ阻害剤 imatinib を添加した条件で、C/EBP β の発現と STAT5 のリン酸化を調べたところ、IFN α は BCR-ABL 存在下においても、速やかに STAT5 のリン酸化を誘導し、C/EBP β の発現を上昇させた。また、imatinib との併用によって IFN α は C/EBP β の発現をより強力に上昇させた。また、IFN α 刺激によっても、STAT5 は前述のエンハンサー候補領域に速やかに動員されることが明らかとなり、BCR-ABL シグナルのみならず、IFN α 、また他のサイトカインによる C/EBP β の発現誘導においても、本研究で同定したエンハンサー候補領域が重要である可能性が考えられた。

さらに、WT または C/EBP β ノックアウト (KO) マウス骨髄細胞に BCR-ABL を導入し、IFN α を添加した条件において serial replating assay を行い、白血病幹細胞としての活性を評価した。IFN α は colony 形成能を低下させ、細胞表面抗原また細胞形態の評価からもミエロイドへの分化を誘導したが、これらは C/EBP β を一部介したものであることが明らかとなった。

また、CML モデルマウスに IFN α を投与し、

CML 幹細胞への影響を検討したところ、IFN α は CML 幹細胞を有意に減少させ、その効果についても C/EBP β を介したものであった。

以上から、本研究によって、BCR-ABL は STAT5 を活性化し、新たに同定したエンハンサーを介して C/EBP β の発現を誘導している可能性が示唆された。また、CML の治療にこれまで用いられてきた IFN α も、同じく STAT 分子のエンハンサーへの結合を介して C/EBP β を発現上昇させ、CML 幹細胞の分化と枯渇を誘導することが考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

① Inamoto S, Itatani Y, Yamamoto T, Minamiguchi S, Hirai H, Iwamoto M, Hasegawa S, Taketo MM, Sakai Y, Kawada K. Loss of SMAD4 promotes colorectal cancer progression by accumulation of myeloid-derived suppressor cells through CCL15-CCR1 chemokine axis. *Clin Cancer Res*, 22(2); 492-501, 2016.

② Tamura A, Hirai H, Yokota A, Sato A, Shoji T, Kashiwagi T, Iwasa M, Fujishiro A, Miura Y, Maekawa T. Accelerated apoptosis of peripheral blood monocytes in Cebp β -deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 464(2); 654-8, 2015.

③ Hirai H, Yokota A, Tamura A, Sato A, Maekawa T. Non-Steady-State Hematopoiesis Regulated by the C/EBP β Transcription Factor. *Cancer Sci*, 106(7); 797-802, 2015.

④ Yoshioka S, Miura Y, Iwasa M, Fujishiro A, Yao H, Miura M, Fukuoka M, Nakagawa Y, Yokota A, Hirai H, Ichinohe T, Takaori-Kondo A, Maekawa T. Isolation of mesenchymal stromal/stem cells from small-volume umbilical cord blood units that do not qualify for the banking system. *Int J Hematol*, 102(2); 218-29, 2015.

⑤ Cai Y, Hirata A, Watanabe H, Nakayama S, VanderLaan PA, Levantini E, Yamamoto M, Hirai H, Wong KK, Costa DB, Watanabe H, Kobayashi SS. CCAAT/enhancer binding protein beta is dispensable for normal and tumor development in lung. *PLoS One*, 10(3): e0120647, 2015.

⑥ Hirai H, Fujishita T, Kurimoto K, Miyachi H, Kitano S, Inamoto S, Itatani Y, Saitou M,

Maekawa T, Taketo MM. CCR1-mediated Accumulation of Myeloid Cells in the Liver Microenvironment Promoting Mouse Colon Cancer Metastasis. *Clin Exp Metastasis*, 31(8); 977-989, 2014.

⑦ Yoshioka S, Miura Y, Yao H, Satake S, Hayashi Y, Tamura A, Hishita T, Ichinohe T, Hirai H, Takaori-Kondo A, Maekawa T. CCAAT/Enhancer-Binding Protein β Expressed by Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Regulates Early B-Cell Lymphopoiesis. *Stem Cells*, 32; 730-740, 2014.

⑧ Hayashi Y, Hirai H, Kamio N, Yao H, Yoshioka S, Miura Y, Ashihara E, Fujiyama Y, Tenen DG and Maekawa T. C/EBP β promotes BCR-ABL-mediated myeloid expansion and leukemic stem cell exhaustion. *Leukemia*, 27(3); 619-628, 2013.

⑨ Fujii W, Ashihara E, Hirai H, Nagahara H, Fujioka K, Murakami K, Seno T, Yamamoto A, Ishino H, Kohno M, Maekawa T, Kawahito Y. Myeloid-derived suppressor cells play crucial roles in the regulation of mouse collagen-induced arthritis. *J Immunol*, 191(3); 1073-1081, 2013.

[学会発表] (計 24 件)

① 横田明日美、平位秀世、林 慶紘、前川 平: 慢性骨髄性白血病の病態形成における転写因子 C/EBP β の機能. 第 20 回造血管腫瘍研究会(千葉) 平成 28 年 2 月 12 日(2016)

② Yokota A, Hirai H, Shoji T, Maekawa T, Okuda K: A Constitutively-Active ABL Family Kinase, TEL-ARG, Induces Lethal Mastocytosis through Sensitizing Hematopoietic Stem/Progenitor Cells to IL-3. *American Society of Hematology, 57th Annual Meeting*, Orland, FL, USA, December 6, 2015.

③ Tamura A, Hirai H, Yokota A, Sato A, Shoji T, Kashiwagi T, Iwasa M, Fujishiro A, Miura Y, Maekawa T: Csf1r Is a Downstream Target of C/EBP β in Ly6C⁻ Monocytes. *American Society of Hematology, 57th Annual Meeting*, Orland, FL, USA, December 5, 2015.

④ Sato A, Hirai H, Yokota A, Tamura A, Shoji T, Kashiwagi T, Iwasa M, Fujishiro A, Miura Y,

Maekawa T: C/EBP β Isoforms Distinctively and Collaboratively Regulate the Behavior of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells in Regenerative Conditions. **American Society of Hematology, 57th Annual Meeting**, Orland, FL, USA, December 7, 2015.

⑤ Yokota A, Hirai H, Hayashi Y, Tamura A, Sato A, Iwasa M, Fujishiro A, Shoji T, Miura Y, Maekawa T: IFN α promotes differentiation of BCR-ABL⁺ leukemic cells through upregulating C/EBP β . **International Society for Experimental Hematology, 44th Annual Scientific Meeting**, Kyoto, Japan, September 17, 2015.

⑥ Yokota A, Hirai H, Shoji T, Maekawa T, Okuda K: TEL-ARG and TEL-ABL activate distinct differentiation pathways in response to IL-3. **The 77th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology (第77回日本血液学会学術総会)** (金沢) 平成27年10月16日 (2015)

⑦ Tamura A, Hirai H, Yokota A, Sato A, Shoji T, Iwasa M, Fujishiro A, Miura Y, Maekawa T: M-CSF receptor is a downstream target of C/EBP β in Ly6C monocytes development. **The 77th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology (第77回日本血液学会学術総会)** (金沢) 平成27年10月18日 (2015)

⑧ Sato A, Hirai H, Tamura A, Yokota A, Shoji T, Iwasa M, Fujishiro A, Miura Y, Maekawa T: C/EBP β facilitates cell cycle entry of HSPCs in response to hematological stresses. **The 77th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology (第77回日本血液学会学術総会)** (金沢) 平成27年10月16日 (2015)

⑨ 横田明日美、平位秀世、庄司月美、前川平、奥田恵子: TEL-ABL と TEL-ARG は異なる

る細胞分化経路を活性化して白血病発症を誘導する. **第74回日本癌学会学術総会** (名古屋) 平成27年10月10日 (2015)

⑩ 平位秀世、佐藤淳至、田村彰広、横田明日美、庄司月美、三浦康生、志馬伸朗、前川平: C/EBP β による造血幹細胞制御. **第19回造血器腫瘍研究会**(佐賀)平成27年1月23日(2015)

⑪ 奥田恵子、横田明日美、庄司月美、平位秀世、前川平: ABLファミリー遺伝子間での生理作用の違いから検討できる分子機構とその意義. **第19回造血器腫瘍研究会**(佐賀) 平成27年1月24日(2015)

⑫ Yokota A, Hirai H, Shoji T, Maekawa T, Okuda K: C-Terminal Domain of ABL Family Kinases, ABL and ARG, Defines Their Distinct Leukemogenic Activities in Vivo. **American Society of Hematology, 56th Annual Meeting**, San Francisco, CA, USA, December 7, 2014.

⑬ Hirai H, Fujishita T, Kurimoto K, Saitou M, Maekawa T, Mark M Taketo: CCR1-Mediated Formation of Liver Microenvironment for Cancer Metastasis. **American Society of Hematology, 56th Annual Meeting**, San Francisco, CA, USA, December 8, 2014.

⑭ Tamura A, Hirai H, Yokota A, Sato A, Yao H, Iwasa M, Fujishiro A, Miura Y, Maekawa T: Essential Roles of C/EBP β in Survival of Ly6C⁺ monocytes. **American Society of Hematology, 56th Annual Meeting**, San Francisco, CA, USA, December 8, 2014.

⑮ Yokota A, Hirai H, Hayashi Y, Tamura A, Sato A, Yao H, Yoshioka S, Iwasa M, Miura Y, Maekawa T: Involvement of C/EBP β in IFN α -induced differentiation of

BCR-ABL-expressing leukemic cells. **The 76th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology** (第76回日本血液学会学術総会) (大阪) 平成26年10月31日 (2014)

⑩ Yokota A, Hirai H, Maekawa T, Okuda K: C-terminal domain of ABL and ARG kinases defines their distinct leukemogenic activities in mice. **The 76th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology** (第76回日本血液学会学術総会) (大阪) 平成26年11月2日 (2014)

⑪ Tamura A, Hirai H, Yokota A, Sato A, Yao H, Yoshioka S, Iwasa M, Miura Y, Ashihara E, Maekawa T: Critical roles of C/EBP β for survival of Ly6C⁺ Monocytes. **The 76th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology** (第7回日本血液学会学術総会) (大阪) 平成26年10月31日 (2014)

⑫ Sato A, Hirai H, Tamura A, Yokota A, Hayashi Y, Yao H, Yoshioka S, Iwasa M, Miura Y, Maekawa T: C/EBP β promotes initial expansion and exhaustion of hematopoietic stem cells in response to stresses. **The 76th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology** (第76回日本血液学会学術総会) (大阪) 2014年10月31日 (2014)

⑬ 横田明日美, 平位秀世, 林 嘉宏、田村彰広、佐藤淳至、八尾尚幸、岩佐磨佐紀、藤城綾、三浦康生、前川 平: BCR-ABL発現白血病細胞に対するC/EBP β を介したIFN α の作用。第73回日本癌学会学術総会 (横浜) 平成26年9月26日 (2014)

⑭ 平位秀世、田村彰広、横田明日美、佐藤淳至、岩佐磨佐紀、三浦康生、前川 平: 単球造血におけるC/EBP β の機能解析。第18回造血器腫瘍研究会 (東京) 平成26年2月7日 (2014)

⑮ Yokota A, Hirai H, Hayashi Y, Tamura A, Sato A, Yao H, Yoshioka S, Iwasa M, Ashihara E, Miura Y, Maekawa T: Cytokine-STATs signalings upregulate endogenous C/EBP β in BCR-ABL⁺ leukemic cells independently from BCR-ABL signaling. **American Society of Hematology, 55th Annual Meeting**, New Orleans, LA, USA, December 7, 2013.

⑯ Tamura A, Hirai H, Hayashi Y, Yokota A, Sato A, Yao H, Yoshioka S, Iwasa M, Ashihara E, Miura Y, Maekawa T: Cell-intrinsic and -extrinsic involvement of C/EBP β in the regulation of hematopoietic stem cells. **American Society of Hematology, 55th Annual Meeting**, New Orleans, LA, USA, December 7, 2013.

⑰ 林 嘉宏、平位秀世、横田明日美、八尾尚幸、三浦康生、芦原英司、前川 平: 転写因子C/EBP β は骨髄系分化・増殖の誘導によりCML幹細胞を減少させる。第17回日本がん分子標的治療学会学術総会 (京都) 平成25年6月13日 (2013)

⑱ Tamura A, Hirai H, Hayashi Y, Yokota A, Yao H, Yoshioka S, Sato A, Iwasa M, Ashihara E, Miura Y, and Maekawa T: Involvement of C/EBP β in the regulation of hematopoietic stem cells. **The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology**, Sapporo, Oct 11, 2013.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

京都大学医学部附属病院輸血細胞治療部
<http://dtm.kuhp.kyoto-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横田 明日美 (YOKOTA, Asumi)
京都大学・医学研究科・研究員
研究者番号：00571556

(2) 研究分担者

平位 秀世 (HIRAI, Hideyo)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：50315933

(3) 連携研究者

前川 平 (MAEKAWA, Taira)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：80229286