

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860778

研究課題名(和文) Notch-Hes1経路による急性骨髄性白血病抑制機構の解明

研究課題名(英文) Tumor-suppressive role for Notch signaling in acute myeloid leukemia

研究代表者

加藤 貴康 (Takayasu, Kato)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：20646591

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)：急性骨髄性白血病は、標準的な治療により約40%の方に治癒を期待できる。しかし残りの難治性白血病を克服するには、さらなる病態の解明が必要である。

近年、細胞の運命決定を制御するNotchシグナルが、造血器腫瘍において腫瘍化と腫瘍抑制の2面性を持つことが報告された。我々は急性骨髄性白血病に対してNotchシグナルが腫瘍抑制的に働く事を本研究で報告した。またNotchシグナルの下流ターゲットとしてチロシンキナーゼ遺伝子であるFLT3を同定した。さらにNotch抗体を用いた白血病治療モデルでは、白血病発症の抑制を認め、Notchシグナルを利用した新規治療薬の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In leukemogenesis, Notch signaling can be up and downregulated in a context-dependent manner. The transcription factor hairy and enhancer of split-1 (Hes1) is well-characterized as a downstream target of Notch signaling, and represses target gene expression. We report that deletion of the Hes1 gene in mice promotes acute myeloid leukemia (AML) development. We then found that Hes1 directly bound to the promoter region of the FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) gene and downregulated the promoter activity. Furthermore, an agonistic anti-Notch2 antibody induced apoptosis of MLL-AF9-induced AML cells in a Hes1-wild type but not a Hes1-null background. We also found that the expression level of FLT3 mRNA was negatively correlated with those of HES1 in patient AML samples. These observations demonstrate that Hes1 mediates tumor suppressive roles of Notch signaling in AML development, probably by downregulating FLT3 expression.

研究分野：造血器腫瘍

キーワード：急性骨髄性白血病 Notchシグナル FLT3

1. 研究開始当初の背景

Notch シグナルは造血細胞の発生・分化・機能において多彩な機能を有することが知られる。とりわけリンパ球のひとつである T 細胞の分化においてもっとも重要なシグナル機構であり、2004 年に T 細胞性白血病の約 50% に Notch シグナルの活性型変異がみられることが報告され、Notch シグナルが正常分化と腫瘍化の双方に重要であることが示された。近年になり造血器腫瘍において Notch シグナルは腫瘍化と腫瘍抑制の 2 面性を持つことが示されてきた。一方で、急性骨髄性白血病においては Notch シグナルの役割に関する際立った報告はなかったといつてよい。

研究代表者は Notch シグナルの造血幹細胞制御と白血病化制御についての研究に取り組んでおり、急性骨髄性白血病での Notch シグナルの制御機構を解析する課程で、Notch シグナルの最も重要なターゲットである転写因子 Hes1 に注目したところ、Hes1 欠損マウス急性骨髄性白血病細胞株では、細胞増殖能が有意に高まることを発見した。次に白血病マウスモデルを用いて Notch シグナルの影響を確認した。具体的には Hes1 欠損マウス骨髄球系前駆細胞に白血病融合遺伝子である MLL-AF9 を導入した急性骨髄性白血病モデルでは、Hes1 欠損マウスが早期に白血病を発症し死亡することを見出した (図 1)。これらの結果より Hes1 は急性骨髄性白血病では腫瘍抑制的に働く事が示唆される。

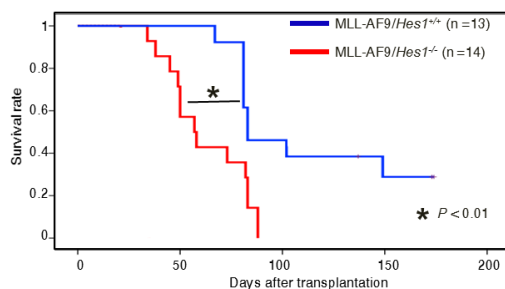


図 1

海外からの報告では、慢性骨髄単球性白血病 (CMML) において Notch シグナルの複数の遺

伝子 (Nicastrin, APH1A, MAML1, NOTCH2) に機能抑制型と考えられる変異を認め、Nicastrin の欠損マウスや

Notch1/Notch2/Notch3 欠損マウスにおいても CMML 様の病態を発症することが報告された (引用文献 1)。Notch-Hes1 経路が骨髄性白血病化に関与している事を裏付ける報告であると考えられる。

2. 研究の目的

急性骨髄性白血病は約 35% の治癒が望まれるが、治療ではまだまだ不十分であり、さらなる病態の解明が必要である。研究代表者の所属するグループは、約 15 年にわたり造血器での Notch シグナルの役割につき研究を行ってきた。特に代表者自身は造血幹細胞と急性骨髄性白血病に焦点を当て研究を進めてきた。これまでの研究から Notch-Hes1 経路は急性骨髄性白血病に対して腫瘍抑制的に働くと考えられる。今回の研究では、Notch-Hes1 経路の急性骨髄性白血病抑制機構についてマウス白血病モデルを用いて明らかにする。またマウスで得られた知見をヒト白血病で確認すると同時に、Notch シグナルの亢進による腫瘍抑制効果を期待した新規治療法の開発を目的としている。

3. 研究の方法

① Notch-Hes1 経路による MLLAF9 急性骨髄性白血病抑制機構の解明

白血病マウス骨髄を用いて、マイクロアレイにより Hes1 の下流候補遺伝子を同定する。下流候補遺伝子について、ウェスタンブロットや CHIP アッセイ、ノックダウンおよびノックアウト実験を行うことで Notch-Hes1 経路による腫瘍抑制機構を詳細に解析する。また Notch シグナルが白血病幹細胞を制御しているかにつき、マウス白血病継代移植モデルを用いて解析する。

②ヒト急性骨髄性白血病検体を用いた

Notch-Hes1 経路の発現レベルと予後の解析

急性骨髄性白血病患者検体につき Notch シグナルおよび下流遺伝子の発現と予後につき検討する

③Notch シグナルを用いた白血病治療モデルの解析

マウス白血病モデルにおいて Notch シグナルを亢進する薬剤を投与することで、白血病への治療効果につき検討する。

4. 研究成果

①Notch-RBPJ-Hes1 経路は白血病発症を抑制する。

Hes1 の上流経路が古典的な Notch シグナルかどうかを検討するため、Notch シグナルの重要な転写因子である RBPJ 欠損マウスを用いて急性骨髄性白血病モデルを解析した。白血病融合遺伝子である MLLAF9 を導入した RBPJ 欠損マウスがコントロールと比較して早期に白血病を発症し死亡することを見いだした(図 2)。

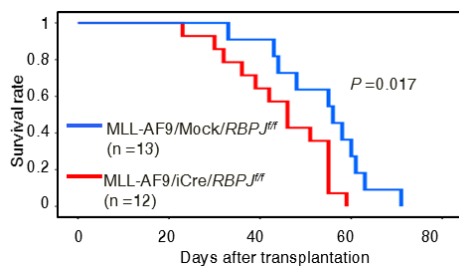


図 2

次に Dominant negative に作用する Hes1 変異体 (dnHes1) を作製し、MLLAF9 と Hes1 変異体をレトロウイルスで野生型マウス骨髄前駆細胞に移植したところ、MLLAF9 単独導入移植マウスと比較して、有意に早期に白血病を発症する事を発見した (図 3)。

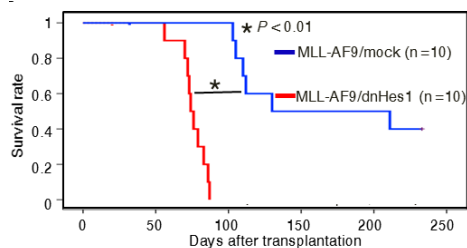


図 3

さらに Hes1 欠損 MLLAF9 導入細胞にレトロウイルスで Hes1 を再導入し、これらの細胞を移植した。Hes1 欠損移植マウスと比較し、Hes1 再導入移植マウスでは白血病の発症が有意に遅延しており、Hes1 による白血病抑制機構が示唆された (図 4)。

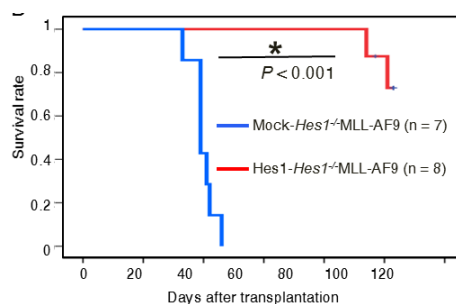


図 4

これらの結果は (図 2-4)、マウス MLLAF9 急性骨髄性白血病モデルにおいて Notch-RBPJ-Hes1 経路が腫瘍抑制的に働くことを示唆している。

②Notch-RBPJ-Hes1 経路の下流ターゲットは Flt3 である。

Hes1 の下流ターゲットを同定するため、Hes1 欠損白血病マウス骨髄と Hes1 野生型白血病マウス骨髄を採取し、マイクロアレイを施行した (図 5)。

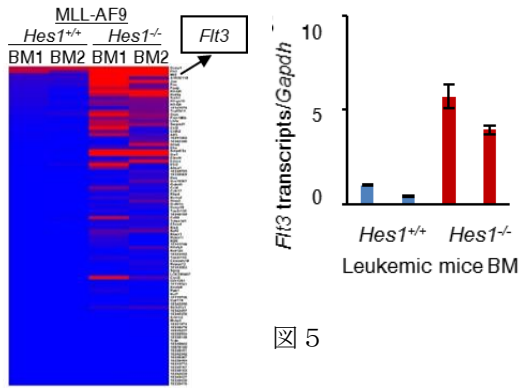


図 5

Hes1 欠損マウスではチロシンキナーゼ受容体である FIt3 の発現が有意に上昇しており、ウェスタンブロット法により FLT3 のリン酸化が Hes1 欠損細胞で亢進している事を確認した。また CHIP アッセイにより Hes1 が直接 FIt3 のプロモーターに結合することで、FIt3 の発現を制御していることを示した。次にゲノム編集ツールである CRISPR/Cas9 システムを用いて、Hes1 欠損白血病細胞株において FIt3 を欠損させると、白血病細胞株の増殖能が有意に低下することを確認した (図 6)。

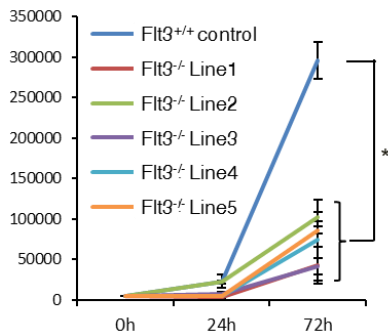


図 6

③Hes1 は白血病幹細胞を抑制している

Hes1 欠損白血病マウスの骨髄から FIt3 陽性白血病細胞と FIt3 陰性白血病細胞を分離し、それぞれの細胞を用いて継代移植を行うと、10000 細胞を移植した際には白血病発症において有意差を認めなかったが、1000 細胞および 100 細胞を移植した際には FIt3 陽性白血病細胞を移植した群が早期に白血病を発症し死亡した。これらの結果から Notch シグナルが白血病幹細胞の増殖を抑制している可

能性が示唆された (図 7)。

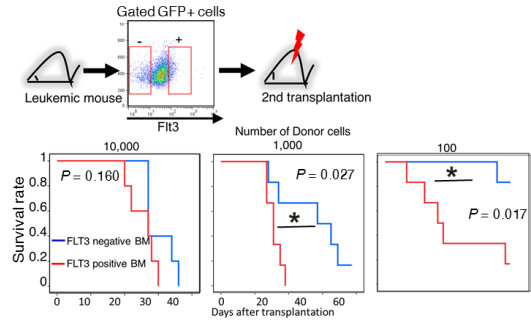


図 7

④ヒト MLL 関連急性骨髄性白血病では HES1 と NOTCH2 は FLT3 と負の相関関係がある。

ヒト急性骨髄性白血病において HES1/NOTCH2 と FLT3 の発現を解析したところ、HES1/NOTCH2 の発現は FLT3 の発現と負の相関を認め、マウスで確認した結果と一致しており、ヒト白血病でも Notch シグナルが腫瘍抑制に働く可能性が示唆された。

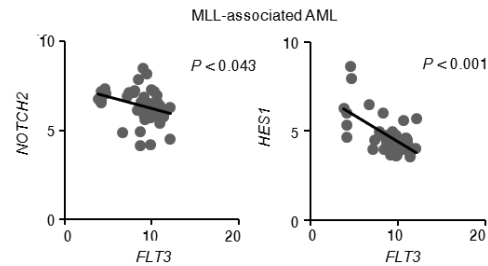


図 8

⑤Notch アゴニストは白血病発症を抑制する

Notch2 アゴニストを用いて、白血病治療モデルを検討した。白血病マウスモデルに Notch2 アゴニストを投与すると、コントロール群と比較して、骨髄での白血病細胞の割合が有意に低下していることを認めた (図 9)。

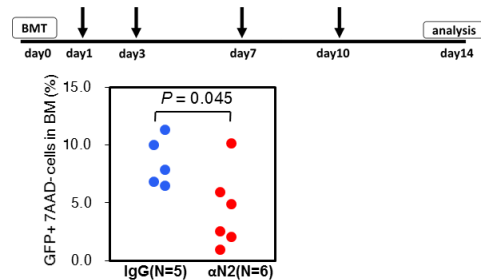


図 9

今回の研究成果として Notch-RBPJ-Hes1 シグナルが FLT3 を介して急性骨髄性白血病を抑制する事を見出した。ヒト白血病でもマウスと同様の知見が得られる可能性が示唆された。難治性急性骨髄性白血病において Notch シグナルの腫瘍抑制効果を利用した新規治療法の開発が期待される。

<引用文献>

- ① Klinakis A et al, A novel tumour-suppressor function for the Notch pathway in myeloid leukaemia. *Nature*, 473, 2011, 230-3

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 4 件)

- ① Takayasu Kato, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Hidekazu Nishikii, Masaya Ueno, Yasuyuki Miyake, Yasuhisa Yokoyama, Yukitsugu Asabe, Yuhei Kamada, Hideharu Muto, Naoshi Obara, Kazumi Suzukawa, Yuichi Hasegawa, Issay Kitabayashi, Kazuhiko Uchida, Atsushi Hirao, Hideo Yagita, Ryoichiro Kageyama, Shigeru Chiba. Hes1 suppresses acute myeloid leukemia development through FLT3 repression. *Leukemia*. 査読有, Vol.29, No3, 2015, 576-85
DOI: 10.1038/leu.2014.281.
- ② Hideharu Muto, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Genta Nagae, Yusuke Shiozawa, Yasuyuki Miyake, Terukazu Enami, Yuhei Kamada, Takayasu Kato, Kenichi Yoshida, Kazuhiko Uchida, Toru Nanmoku, Masashi Sanada, Naoshi Obara, Kazumi Suzukawa, Naoya Nakamura, Hiroyuki Aburatani, Seishi Ogawa,

Shigeru Chiba. Reduced TET2 Function Leads to T-cell Lymphoma with Follicular Helper T cell-like Features in mice. *Blood Cancer Journal*. 査読有, Vol.12, No4, 2015, e264
DOI: 10.1038/bcj.2014.83.

- ③ Rie Nakamoto-Matsubara, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Terukazu Enami, Kenichi Yoshida, Shintaro Yanagimoto, Yusuke Shiozawa, Tohru Nanmoku, Kaishi Satomi, Hideharu Muto, Naoshi Obara, Takayasu Kato, Naoki Kurita, Yasuhisa Yokoyama, Koji Izutsu, Yasunori Ota, Masashi Sanada, Seiichi Shimizu, Takuya Komeno, Yuji Sato, Takayoshi Ito, Issay Kitabayashi, Kengo Takeuchi, Naoya Nakamura, Seishi Ogawa, Shigeru Chiba. Detection of the G17V RHOA mutation in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and related lymphomas using quantitative allele-specific PCR. *PLOS ONE*. 査読有, Vol. 9, No10, 2014 e109714
DOI: 10.1371/journal.pone.0109714.
- ④ 加藤 貴康, 千葉 滋. 血管新生における Notch の役割. *血液内科*. 科学評論社 出版. 査読無, 69 巻, 3 号, 2014, 356-360.

[学会発表] (計 7 件)

- ① Takayasu Kato. Tumor-suppressive roles for Notch signaling of acute myeloid leukemia. Looking to the future of Notch signaling. 2014 年 12 月. 大阪大学. 大阪.
- ② Takayasu Kato, 他
Therapeutic model by Notch2 agonist in acute myeloid leukemia. 第76回日本血液学会. 2014年11月. 大阪国際会議場. 大阪
- ③ Takayasu Kato, 他
Hes1 Suppresses Acute Myeloid Leukemia Development in

Conjunction with FLT3 Repression. 第5
回JSH国際シンポジウム.

2014年5月. アクトシティ浜松. 浜松.

④ Takayasu Kato, 他

Hes1 is responsible for Notch
signaling-mediated suppression of ac
ute myeloid leukemia development via
suppression of FLT3 expression.

55th ASH (米国血液学会).

2013年12月. ニューオリンズ.

⑤ Takayasu Kato, 他

Flt3 is a downstream target of
Notch-Hes1 signaling as a tumor
suppressor in acute myeloid

leukemia. 第75回日本血液学会.

2013年10月. ロイトン札幌. 札幌.

⑥ Takayasu Kato, 他

Down-regulation of Notch-Hes1 signali
ng increases Flt3 expression, which
ultimately contributes to AML develo
pment. 第72回日本癌学会.

2013年10月. パシフィコ横浜. 横浜.

⑦ Takayasu Kato, 他

Hes1 is responsible for Notch signal
ing-mediated suppression of acute my
eloid leukemia development.

18th EHA (ヨーロッパ血液学会).

2013年6月. ストックホルム.

[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:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 貴康 (KATO, TAKAYASU)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号: 20646591

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: