

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 6 日現在

機関番号：72602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640085

研究課題名(和文) Syt1/Slpファミリー遺伝子の白血病における重要性

研究課題名(英文) Importance of Syt1/Slp family gene in leukemia

研究代表者

中村 卓郎 (Nakamura, Takuro)

公益財団法人がん研究会・その他部局等・その他

研究者番号：00180373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：従来不明であった白血病細胞の骨髄ニッチへの定着を司る遺伝子Syt11の同定に成功し、Syt11による白血病細胞と骨髄感質細胞との相互作用の仕組みを明らかにした。白血病細胞が骨髄ニッチに定着し根を下ろすことは、治療を困難にする要因の一つだが、その原因となる遺伝子Syt11の同定に成功した。Syt11が活性化されると、サイトカイン受容体の輸送が盛んになり、白血病細胞と骨髄内の間質細胞の結びつきが促進されていることが分かった。Syt11による白血病と骨髄ニッチの相互作用は、白血病細胞の定着機構を説明する新しい分子機構で、今後Syt11とその分子回路を標的とした治療薬の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We identified Syt11 as a direct transcriptional target for Meis1, and Syt11 cooperates with Hoxa9. Syt11 facilitates membrane trafficking of CXCR4, thus enhancing cell migration and engraftment. These results such as 1) Meis1 functions in leukemic cell homing and engraftment, 2) direct regulation of Syt11 by Meis1, 3) SYTL1 expression in human AML, 4) Syt11 function in migration and motility of leukemic cells and 5) membrane trafficking of CXCR4 by Syt11 are quite novel and uncover the function of Meis1 in leukemia.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん細胞の特性 Syt11 Meis1 Hoxa9 骨髄ニッチ CXCR4 白血病

1. 研究開始当初の背景

白血病の発症に関与する原因遺伝子の多くは、シグナル伝達経路や転写制御、細胞回転制御、細胞死制御に関わる機能を有する遺伝子で、これらの異常の結果、骨髄細胞の増殖異常、分化異常、遺伝子不安定性、細胞死抑制を招来し、白血病の発症と悪性化の原因となっている。一方、骨髄の造血ニッチと白血病細胞の相互作用が、その発症と進展に重要であるのみならず、治療抵抗性の要因として注目を集めているが、原因遺伝子との関係は充分明らかにはされていない。

骨髄ニッチと白血病細胞の相互作用は、骨髄造血で得られた知見から研究されてきた。特に、造血幹細胞 (hematopoietic stem cell; HSC) が骨髄内で緩やかな細胞回転を示しながら、不均等分裂を行って、自己複製と分化増殖を担っていることが、白血病幹細胞 (leukemia initiating cell; LIC) の概念を理解する上で重要である。この際、骨髄ニッチを構成する血管周皮細胞や骨芽細胞、神経堤由来細胞等の間質細胞からのシグナル制御が HSC の維持に重要であることが近年わかってきている (図 1)。一方、LIC が骨髄ニッチにおける定着能を獲得する分子機構については不明な点が多く治療抵抗性を解決するに当たっても課題となっていた。

2. 研究の目的

我々は、ヒトの急性骨髄性白血病 (AML) における原因遺伝子・悪性化因子として重要なホメオボックス遺伝子 HOXA9 と MEIS1 の機能を解析してきた。本研究は、最近我々が Meis1 ホメオドメイン蛋白の標的遺伝子として同定した Sytl1/Slp1 の機能を解析し、白血病幹細胞の骨髄内定着における役割を明らかにするとともに、Sytl1 が制御するサイトカインの細胞内トラフィッキングを標的とした治療の可能性を探ることを目的とした。

Sytl/Slp ファミリー蛋白は、Rab27 と会合して細胞内小胞や受容体の膜輸送を促進していることが示されて来た。特に、分泌腺や血小板の顆粒や神経伝達における重要性が注目されているが、がん細胞の動態への関与は我々が初めて見出した現象であり、この発見からがん細胞と微小環境の相互作用についての理解に革新的進歩をもたらすことが予想された。

3. 研究の方法

1. 白血病細胞における Sytl1 発現の効果の解析 (in vitro)

AML 細胞に Sytl1/Slp1/JFC1 を強制発現、または siRNA/shRNA を用いて発現抑制を行った場合の細胞動態を解析する。具体的には、Sytl1 の発現誘導が生じている Hoxa9/Meis1-induced AML において、Sytl1 のノックダウン及び再導入による細胞接着能と遊走能を検討する。細胞接着能の実験にお

いては、VCAM-1 やセレクチンでコートしたシャーレに細胞を培養し、接着能の変化を見ることで、これらに結合するインテグリンや CD44 の動態をモニターする。それとともに、Sytl1 の有無により AML 細胞表面で変動するマーカーを FACS 解析により網羅的にスクリーニングし、Sytl1 により有意に変動する分子を探索する。さらに、明らかにした Sytl1 により膜輸送が亢進される分子を GFP 等の蛍光蛋白と融合させ 32Dcl3 等の血液細胞に導入する。接着因子でコートしたスライド上に細胞を播種し、タイムラプス蛍光顕微鏡を用いて Sytl1 の有無による物質の膜輸送の促進・抑制効果の動態を経時的に評価する。一方、Sytl1 の有無による遊走能の変化の検討として、同じ細胞を用いて IL-3、Flt3L、SCF、GM-CSF、CXCL12 といったサイトカイン、ケモカインに対する遊走能の差を検討する。

2. 白血病細胞における Sytl1 発現の効果の解析 (in vivo)

Hoxa9 で不死化を誘導した骨髄細胞に Meis1 を過剰発現させると、骨髄定着能が亢進し in vivo で白血病発症能を持つ AML に転換されることを見出している。Sytl1 は Meis1 の標的遺伝子としてこの作用の責任分子であることを想定している。既に、Sytl1 が AML 細胞の骨髄移植 48 時間後の定着を促進する結果を得ているが、1 の in vitro の実験結果と総合して、この定着に関わる Sytl1 の輸送標的分子を明らかにする。具体的には、項目 1 で得られた候補分子に対する抗体や阻害剤、siRNA を用いた抑制実験により白血病細胞の骨髄定着能を検討する。また、骨髄に定着した AML 細胞と培養条件下の細胞における細胞表面マーカー発現を比較することで、Sytl1 の in vivo での機能を明らかにする。

3. Sytl1 の正常造血における役割

白血病細胞、特に LIC の骨髄内定着における Sytl1 の機能は HSC による正常造血にも関与している可能性が高い。そこで、Sytl1 KO マウス由来 HSC を用いた骨髄移植実験や 5-FU によるチャレンジを行って HSC の骨髄ニッチとの相互作用、dormancy における Sytl1 の役割を検討する。

4. 研究成果

1. 白血病細胞における Sytl1 発現の効果の解析 (in vitro)

Sytl1 タンパクは細胞内に存在する小さな顆粒を膜に効率良く輸送する役割を担っていた。これらの顆粒の中には、消化酵素や凝固因子、マイクロ RNA といった数多くの生理活性物質が細胞の種類に応じて含まれている。Sytl1 を AML 細胞に強制発現すると、CXCL12、Flt3、IL-3、M-CSF に対する遊走能

が促進され、Syt11 をノックダウンすると抑制されることがわかった。その中で本研究では、CXCL12 リガンドと CXCR4 受容体の経路に注目した。Syt11 の存在下で CXCL12 マイクロビースに AML 細胞が接触すると、細胞運動能も有意に亢進された。また、骨髄感室細胞 OP9 で CXCL12 をノックダウンすると、AML 細胞との相互作用が抑制された。Syt11 が活性化していると、CXCL12 に対する白血病細胞の運動能が増加することが分かりました。CXCR4 は CXCL12 を受け取ってシグナルを伝えると速やかに破壊されるため、シグナルの動きは一過性ですが、Syt11 は新しい CXCR4 を次々と細胞膜に送り込むことによって、より効率良く CXCL12 を取り込むことが示された。この現象は、細胞内のシグナルの動きとも一致していることも分かった。

2. 白血病細胞における Syt11 発現の効果の解析 (in vivo)

骨髄ニッチの中で造血幹細胞の維持に非常に重要な CAR 細胞と言われる間質細胞は、CXCL12 を分泌しており、CAR 細胞の CXCL12 が造血幹細胞の CXCR4 に結合することにより発生するシグナルが、造血幹細胞の生存、自己複製、分化に必要であると考えられている。また、白血病細胞の増殖や維持にも重要である事実も知られている。In vitro における実験結果から、Syt11 標的分子として CXCL12 に着目し、CXCR4 に対する中和抗体が AML 細胞のホーミングを阻害することが明らかとなった。また、Syt11 を発現する AML 細胞は、骨髄内で CXCL12 を分泌する CAR 細胞の近傍に集積していた。

3. Syt11 ノックアウトマウスの解析

Syt11 ノックアウトマウス由来骨髄細胞に、上流因子の Hoxa9/Meis1 を導入しても in vivo において白血病発症は認められなかった。この骨髄細胞に Syt11 を再導入することで白血病発症を見たことより、Syt11 は in vivo における白血病細胞の定着に必要な因子であることが証明された。一方、Syt11 ノックアウトマウスの骨髄細胞について理二エージ解析を行った。造血幹細胞を初めとする各リニエージの分布に異常は認められなかったが、コロニー形成試験において骨髄顆粒球系に分化する前駆細胞の増加が認められた。

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 8 件)

1. Tanaka M, Yamazaki Y, Kanno Y, Igarashi K, Aisaki K, Kanno J, Nakamura T. Ewing's sarcoma precursors are highly enriched in embryonic osteochondrogenic progenitors. *J Clin Invest*, 121:3061-3074, 2014.
2. Okumura K, Saito M, Isogai E, Aoto Y, Hachiya T, Sakakibara Y, Katsuragi Y, Hirose S, Kominami R, Goitsuka R, Nakamura T, Wakabayashi Y. Meis1 regulates epidermal stem cells and is required for skin tumorigenesis. *PLoS One*, 9:e102111, 2014.
3. Tanaka M, Aisaki K, Kitajima S, Igarashi K, Kanno J, Nakamura T. Gene expression response to EWS-FLI1 in mouse embryonic cartilage. *Genomics Data*, 2:296-298, 2014.
4. Tanaka M, Yamaguchi S, Yamazaki Y, Kinoshita H, Kuwahara K, Nakao K, Jay PY, Noda T, Nakamura T. Somatic chromosomal translocation between Ewsr1 and Flil1 loci leads to dilated cardiomyopathy in a mouse model. *Sci Rep*, 5:7826, 2015.
5. Nakamura T. The role of Trib1 in myeloid leukaemogenesis and differentiation. *Biochem Soc Trans*, 43:1104-1107, 2015.
6. Yoshioka K, Oda A, Notsu C, Ohtsuka T, Kawai Y, Suzuki S, Nakamura T, Mabuchi Y, Matsuzaki Y, Goitsuka R. Loss of homeodomain transcription factor Prepl perturbs adult hematopoiesis in the bone marrow. *PLoS One*, 10:e0136107, 2015.
7. Hiratsuka T, Takei Y, Ohmori R, Imai Y, Ozeki M, Tamaki K, Nakamura T, Tsuruyama T. ZFP521 contributes to pre-B-cell lymphomagenesis through modulation of the pre-B-cell receptor signaling pathway. *Oncogene*, in press.
8. Yokoyama T, Nakatake M, Kuwata T, Couzinet A, Goitsuka R, Tsutsumi S, Aburatani H, Valk PJM, Delwel R, Nakamura T. MEIS1-mediated transactivation of synaptotagmin like 1 promotes CXCL12/CXCR4 signaling and leukemogenesis. *J Clin Invest*, 126:1664-1678, 2016.

〔学会発表〕(計 12 件)

1. Nakamura T. Modeling fusion gene-related bone and soft tissue sarcomas. 2014 SNUCRI Cancer Symposium. 2014 年 4 月 18 日 Mokpo, Korea
2. Nakamura T. The role of Syt11, a downstream target gene of Meis1, in myeloid leukemogenesis. Tenth Annual Myeloid Meeting. 2014 年 5 月 5 日, Cincinnati, OH, U.S.A.

3. 中村卓郎 Modeling the cancer gene network and disease progression in vivo. 第 73 回日本癌学会学術総会 JCA-AACR Joint Symposium 2014 年 9 月 26 日 横浜
4. 田中美和、中村卓郎 miR214 cooperates with SYT-SSX1 in malignant progression of synovial sarcoma. 第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 27 日 横浜
5. Nakamura T. Modeling fusion gene-associated bone and soft tissue sarcoma. The 4th Japan-France Cancer Workshop 2014 年 11 月 19 日 京都
6. Nakamura T. Histogenesis of Ewing's sarcoma. The Japan-United States International Workshop on the Sarcoma Research and Therapy. 2014 年 12 月 4 日 Honolulu, HI, U.S.A.
7. Nakamura T. Molecular dissection of leukemic cell expansion in vivo. 2015 SNUCRI Cancer Symposium 2015 年 4 月 2 日 Hwasun Kumho Resort, Korea
8. Nakamura T. The role of Trib1 in myeloid leukemogenesis and differentiation. Tribbles pseudokinases at the crossroads of metabolism, cancer, immunity and development. 2015 年 4 月 22 日 Budapest, Hungary
9. Nakamura T. Osteochondrogenic progenitors of mouse embryo as Ewing sarcoma cell-of-origin. ASSET-ENCCA Ewing Meeting. 2015 年 5 月 15 日 Paris, France
10. 中村卓郎 マウスモデルを用いた肉腫転移機構の解析 in vivo イメージングフォーラム 2015 2015 年 9 月 18 日 東京
11. 中村卓郎 Mouse models for fusion gene-associated sarcoma: a comprehensive approach. 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 9 日 名古屋
12. 中村卓郎 Modeling Ewing's sarcoma and fusion gene-associated sarcoma: Tools to investigate cell-of-origin, metastatic mechanisms and genetic pathways. 日本肉腫学会記念シンポジウム 2015 年 12 月 3 日 京都

〔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
<http://www.jfcr.or.jp/laboratory/department/carcinogenesis/index.html>
 6. 研究組織
 (1)研究代表者
 中村 卓郎 (NAKAMURA, Takuro)
 公益財団法人がん研究会・がん研究所
 副所長
 研究者番号：00180373