

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670464

研究課題名(和文)ゲノム編集を用いた難治性白血病制御分子のスクリーニング

研究課題名(英文)Screening of factors regulating refractory leukemia using genome editing

研究代表者

黒川 峰夫(KUROKAWA, MINEO)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：80312320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：代表的な難治性白血病関連遺伝子であるEVI1の発現を制御している機構を解明するため、我々はゲノム編集技術であるTALENを用いてEVI1遺伝子領域へ蛍光レポーター遺伝子を挿入したヒト急性骨髄性白血病由来細胞株を作成した。そこへウイルスベクターを介してEVI1高発現細胞株由来のcDNAライブラリーを導入し、レポーター蛍光強度が上昇している細胞を単離した。得られた細胞のゲノムをシーケンスし候補分子を検索したところ、ヒト細胞においてEVI1を正に制御する候補因子を同定し、現在詳細な解析を行っている。

研究成果の概要(英文)：EVI1 transcription factor is a proto-oncogene which is associated with myeloid malignancy with poor prognosis. To search EVI1-up-regulating factors in a genome-wide scale, we made an acute myeloid leukemia cell line of which fluorescent reporter gene was inserted in EVI1 gene region. cDNA expression library derived from a cell line highly expressing EVI1 was virally transduced to the EVI1-reporter cell line and we isolated cells which exhibited stronger reporter signal. We examined the genome and obtained some candidate genes which may positively control EVI1. We are now closely investigating the function of these genes.

研究分野：血液内科学

キーワード：EVI1 Genome editing TALEN Acute myeloid leukemia

1. 研究開始当初の背景

近年造血器悪性腫瘍の治療成績は化学療法・造血幹細胞移植術の進歩により格段に向上したが、代表的な造血器悪性腫瘍である急性骨髄性白血病(acute myelocytic leukemia: AML)の長期生存率は40%程度にとどまっている。染色体異常や遺伝子異常による分類法の進歩により AML の中でも予後良好および予後不良なサブグループがあることが判明しており、治療成績向上のためには予後不良群における新規治療開発が鍵となる。とくに Ecotropic viral integration site 1 (EVI1)の発現が亢進している AML は極めて予後不良であることが知られており、これまでにわれわれの研究室は Evi1 の正常造血、および AML の病態形成における役割を Evi1 コンベンショナル、コンディショナルノックアウトマウスおよび Evi1-GFP レポーターマウスを作製し、解析することで明らかにしてきた。とくに Evi1 が正常では造血幹細胞に、白血病では治療抵抗性細胞分画で高発現することを見だしてきた。しかし Evi1 の発現がどのように維持されるかは、不明である。とくにヒトでも、染色体転座例や発現制御領域の微細な変異例を除き、一般的な Evi1 の発現制御機構に関しては、これまで殆ど明らかになっていない。

近年以下に述べる2つの技術が確立してきたことでヒト生細胞におけるEvi1 遺伝子の制御機構を網羅的に明らかにすることが可能であると着想に至った。一つ目の技術として zinc-finger nuclease や transcription activator-like effector nuclease(TALEN)などの人工ヌクレアーゼを用いて、標的部位に DNA 二本鎖切断を導入することで様々なモデル動物でゲノム編集が出来るようになったことが挙げられる。とくにヒト培養細胞においては相同組換え修復を介したレポーター遺伝子の挿入が比較的容易に行える点が特徴である。

また二つ目の技術として、無数のshRNA ライブラリーやcDNA ライブラリーを同時に細胞に導入し、細胞の表現型の変化により目的の遺伝子を探索するというスクリーニング技術の進歩が挙げられる。血液疾患においてもその有用性は明らかになりつつあり、RNAi スクリーニングによりこれまで、悪性リンパ腫においてCRAD11 がNF- B 経路の活性化に重要であることや、多発性骨髄腫においてCaspase-10 が腫瘍の生存に極めて重要であることが既に明らかにされ

ている。そこで、われわれは EVI1 遺伝子領域へ蛍光レポーター遺伝子を挿入したヒト悪性腫瘍由来細胞株を作製することで、生細胞において EVI1 発現量を捉えることが出来る実験系を確立し、この細胞株を用いて shRNA ライブラリーおよび cDNA ライブラリーによる網羅的スクリーニングを行うことで、正常あるいは悪性のヒト細胞において Evi1 の発現を制御する因子の同定を試みることにした。

EVI1 はAML の病態形成および正常造血において造血幹細胞の維持に極めて重要な役割を果たしている。したがって、明らかとなった制御因子が Evi1 の発現が亢進している正常造血幹細胞や AML の患者検体においても同様のメカニズムが関与しているか検討することで、これらの生命現象の分子メカニズムについて深い理解が得られることが予想される。またそれらの知見に基づいて、Evi1 の発現制御を可能にすることで難治性 AML の新たな治療法の開発や再生医療における造血幹細胞の増幅効率を高めることも可能となることが強く期待される。

2. 研究の目的

本研究では、正常造血幹細胞および白血病細胞における EVI1 の制御機構の解明を目的とする。具体的には、EVI1 遺伝子領域へ蛍光レポーター遺伝子を挿入したヒト由来骨髄性白血病由来細胞株を transcription activator-like effector nuclease(TALEN) 技術を用いて作製し、そこへウイルスベクターを介して shRNA ライブラリーや Evi1 高発現細胞株由来の cDNAライブラリーを導入し、レポーター蛍光強度が上昇している細胞を単離する。この単離過程を何度も繰り返し、安定的に Evi1 の発現が亢進した細胞集団を取得する。これらの細胞からゲノムを抽出し、次世代シーケンサーなどを用いて候補分子を同定する。このようにして、ヒト細胞における EVI1 の発現制御に関与する分子を明らかにすることを目的とする。さらにそれらの分子が、EVI1 の発現が亢進している正常造血幹細胞や急性骨髄性白血病の患者検体においても同様のメカニズムで関与しているかどうかを検討する。

3. 研究の方法

EVI1 は難治性白血病や正常造血幹細胞で高発現する転写因子であるが、EVI1 が白血病細胞や正常造血幹細胞でどのような制御を受けているかは明らかになっていない。そこでまず TALEN 技術を用いて EVI1 遺伝子領域へ蛍光レポーター遺伝子を挿入した AML 由来細胞株を樹立する。次に EVI1 高発現 AML 細胞株から mRNA を抽出して cDNA としてレトロウイルスベクターに組み込んだ発現ライブラリーを作製する。この作製した cDNA ライブラリーを樹立した細胞株にウイルス感染させ、EVI1 の発現を制御する分子のスクリーニングを行う。ウイルス導入後に蛍光強度の変化をフローサイトメトリ で確認し、蛍光強度が感染開始前の細胞株より上昇している細胞をセルソーターで単離し、この過程を繰り返すことにより、EVI1 高発現細胞を濃縮する。これらの細胞からゲノム DNA を抽出し、導入された cDNA や shRNA ベクターを同定することにより、EVI1 発現上昇に關与する候補遺伝子を抽出する。

4. 研究成果

TALEN 技術を用いて、EVI1-2A-EGFP 発現細胞株を作製した。元の細胞株としては EVI1 高発現 AML 由来細胞株である HEL、KU812 など複数の細胞株を用いた。すでに EVI1 を正に制御することが知られている MLL 融合遺伝子をこれらの細胞に導入すると、蛍光シグナルが出現することを確認し、われわれの作製した EVI1 レポーター細胞株がスクリーニングに用いることができることを確認した。cDNA 発現ライブラリーの作成にあたっては、EVI1 高発現白血病細胞株であり、EVI1 の染色体上の位置である 3q26 変異のない KU812 を用い、おおむね 1kb 以上の cDNA 断片をレトロウイルスベクターに挿入した。作製した cDNA ライブラリーを樹立した細胞株に導入することで、EVI1 の発現を制御する分子のスクリーニングを行った。アンフォトロピックレトロウイルスによってライブラリー上の遺伝子を導入後に、蛍光強度の変化をフローサイトメトリ で確認し、蛍光強度が感染開始前の細胞株より上昇している細胞をセルソーターで単離して、それぞれのクローンからゲノム DNA を抽出し、シーケンスを行って複数の候補遺伝子を抽出し得た。それらの遺伝子の詳細な機能については、現在進行中の

shRNA ライブラリーによるスクリーニングによる解析結果も合わせて、分子遺伝学的な手法を駆使してさらに解析を進めている。

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 29 件)

黒川峰夫 (他 6 名, 7 番目). Thrombopoietin/MPL signaling confers growth and survival capacity to CD41-positive cells in a mouse model of Evi1 leukemia. *Blood*. 124:3587-96. 2014 査読有

doi: 10.1182/blood-2013-12-546275.

黒川峰夫 (他 6 名, 7 番目). JAK2V617F+ myeloproliferative neoplasm clones evoke paracrine DNA damage to adjacent normal cells through secretion of lipocalin-2. *Blood*. 124:2996-3006. 2014 査読有

doi: 10.1182/blood-2014-04-570572.

黒川峰夫 (他 14 名, 15 番目). Evi1 defines leukemia-initiating capacity and tyrosine kinase inhibitor resistance in chronic myeloid leukemia. *Oncogene*. 33:5028-38. 2014 査読有

doi: 10.1038/onc.2014.108.

黒川峰夫 (他 11 名, 12 番目). Generation of induced pluripotent stem cells derived from primary and secondary myelofibrosis patient samples. *Experimental Hematology*. 42:816-25. 2014. 査読有

doi: 10.1016/j.exphem.2014.03.010.

黒川峰夫 (他 17 名, 18 番目). Recurrent CDC25C mutations drive malignant transformation in FPD/AML. *Nature Communications*. 5:4770. 2014 査読有

doi: 10.1038/ncomms5770.

黒川峰夫 (他 7 名, 8 番目). Single-cell gene expression analysis reveals clonal architecture of blast-phase chronic myeloid leukaemia. *British Journal of Haematol*. 165:414-6. 2014 査読有

doi: 10.1111/bjh.12726.

黒川峰夫 (他 8 名, 7 番目). Prdm16 is required for the maintenance of

brown adipocyte identity and function in adult mice. Cell Metabolism. 19:593-604. 2014 査読有

〔学会発表〕(計 27 件)

黒川 峰夫. Enhanced Autophagy Promotes Survival of Peripheral Blast Cells from Murine Acute Myeloid Leukemia, 56th ASH Annual Meeting and Exposition, 2014 年 12 月 6 日～9 日, アメリカ

黒川 峰夫. BAALC Promotes Leukemogenesis by MAPK-dependent Proliferation and KLF4-derived Differentiation Block, 76th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, 2014 年 10 月 31 日～11 月 2 日, 大阪(口演)

黒川 峰夫. iPS 細胞を用いた白血病の病態解析, 76th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, 2014 年 10 月 31 日～11 月 2 日, 大阪 (教育講演)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://u-tokyo-hemat.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒川 峰夫 (KUROKAWA MINEO)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：80312320