

令和元年6月5日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06895

研究課題名(和文)白血病幹細胞の細胞周期とエピゲノム制御を標的とした治療法の探索

研究課題名(英文) Search for the therapeutic target for the cell cycle and epigenome control in leukemia stem cells

研究代表者

竹立 恭子 (Takedachi, Kyoko)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・研究員

研究者番号：00806557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、未だ実現しない白血病幹細胞を標的とした治療法の探索を目的とする。治療法の開発には、細胞周期制御とエピゲノム制御の理解が重要であると考え、その両方を制御するタンパク質であるGemininに着目し、Geminin-EYFPノックインマウスとGeminin発現制御系を組み合わせ、白血病幹細胞の活性制御におけるGemininの役割を解明することを目的とした。そして、白血病幹細胞を標的とした新たな治療薬においてGemininが有効な標的であることを導き出した。今後は、Gemininを標的とした新たな治療法の開発に向けた理論的基盤の構築を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者のグループはこれまでの研究で、Gemininが造血幹細胞の活性を制御において中核因子として機能していることを世界に先駆けて明らかにしてきた。つまり白血病幹細胞の活性制御におけるGemininの役割を解明する本研究は世界でも類を見ない独創的な研究であるといえる。また本研究は、Gemininが白血病幹細胞を標的とした治療薬において新たな標的となることを導き出した。つまり本研究成果は、白血病幹細胞の根絶を目指した新規治療法の開発に貢献できたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed for the search of the new therapy to target of leukemia stem cells. We think it is important to understand that elucidation of the cell cycle and epigenome control to the development of the therapy. Geminin protein regulates the cell cycle and epigenome. Therefore, we focused on the role of Geminin in the regulation of leukemia stem cell activity. And we found that Geminin was an effective target in the new therapeutic drugs which target in leukemia stem cells. Toward the development of the new therapy that targeted Geminin, we will aim at the construction of the theoretical base in future.

研究分野：幹細胞機能学

キーワード：白血病幹細胞 Geminin 未分化性維持 細胞周期

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

白血病細胞も正常造血細胞と同様の幹細胞を頂点とするヒエラルキーを構成するという「白血病幹細胞モデル」がこの20年間注目を集めてきた。しかしながら、幹細胞を標的とした白血病根治療法は、未だ開発されていない。これは、白血病幹細胞と定義される細胞の性質が、当初想定されていたよりも複雑であったことに起因すると考えられる。従って、白血病幹細胞を規定する性質としては、細胞周期制御 (特に G₀-G₁ 制御) とエピゲノム制御の2点が重要であり、ここが白血病幹細胞を標的とした新規治療法の開発のターゲットとなりつると申請者は考えた。そこでその両方を制御するタンパク質であり、静止期と活動期の白血病幹細胞を分画するマーカーでもある Geminin に着目し、Geminin-EYFP ノックインマウスを用いて静止期にある白血病幹細胞の性状を明らかにして新たな治療戦略を探索するとともに、現在有望な白血病幹細胞特異的に Geminin を過剰発現させる方法で、白血病の再発を予防する戦略を提供する。

2. 研究の目的

所属研究室では、従来から造血幹細胞の活性を制御する分子基盤の解析を進めている。これまでの研究で、造血幹細胞や白血病幹細胞の活性制御における重要な細胞内因子として知られ、従来転写制御因子としてのみ働くと考えられてきたポリコム複合体1 (Ring1B - Bmi1 - Rae28 - Scmh1) やホックス遺伝子産物 (Hoxb4/Hoxa9) の両因子が、DNA複製ライセンス化制御因子でありかつ幹細胞未分化性維持因子でもある Geminin タンパク質の分解制御を介して造血幹細胞の活性を制御していることを世界に先駆けて明らかにしてきた。本研究では、この研究室で培ってきた造血幹細胞の解析技術を駆使して、静止期と活動期にある白血病幹細胞の性状の違いを、できるだけ少ない細胞レベルで同定し、現状では最も可能性のある戦略である Geminin のタンパク質を白血病幹細胞に特異的に導入する方法を開発し、静止期を保つ白血病幹細胞の性状を知ることによって白血病幹細胞を標的とした新たな治療戦略を探索する。

3. 研究の方法

白血病幹細胞を規定する性質として重要な細胞周期制御とエピゲノム制御の2点について、Geminin は複製が開始されたゲノムの Cdt1 への結合による DNA複製ライセンス化の阻害や、Brg1/Brahma への結合によるクロマチンリモデリングの制御を行っており、細胞の増殖と分化を制御する機能因子であると考えられている。よって所属研究室では、Geminin の発現を可視化するこの Geminin-EYFP ノックインマウスを作成し、造血幹細胞や白血病幹細胞を、静止期のものと活動期のものにプロスペクティブに分画することに成功した。加えて申請者は、これらの研究過程でレトロウイルスベクターによる Geminin の過剰発現が、造血幹細胞や白血病幹細胞を静止期に留めおき、またエピゲノムを未分化状態に保つことにより、その機能を廃絶することを明らかにするとともに、Geminin タンパク質の精妙な細胞導入法である膜透過型配列を融合した cell-penetrating Geminin (CP-Geminin) リコンビナントタンパク質を開発することにも成功した。さらに申請者の予備的実験から、白血病細胞を分化誘導することで Geminin の発現が低下することも明らかにしている。そこで、本研究は Geminin に着目し、Geminin-EYFP ノックインマウスと Geminin 発現制御系を組み合わせ、白血病幹細胞の活性制御における Geminin の役割を解明することを目的とした。そして、Geminin を標的とした白血病幹細胞に対する新たな治療薬の開発に向けた理論的基盤の構築を目指した。

(1) 静止期にある白血病幹細胞の性状の同定

ポリコム複合体1は、白血病幹細胞の活性維持に必須である。一方 Hoxa9 の遺伝子導入は白血病発生を誘導し、Meis1a の共導入は白血病の発症時期を早める。また MLL 融合タンパク質により発症する白血病幹細胞の維持に Hoxa9 の高発現が重要な働きをしていることが知られている。従って、申請者の研究グループが見出したこれらの因子による Geminin の発現制御機構が白血病幹細胞の活性をも支持していることが予想される。よって申請者はまず、Geminin-EYFP ノックインマウス骨髄由来の未分化造血細胞に、MLL-AF9 や Hoxa9+Meis1a、BCR-ABL などの融合遺伝子をレンチウイルスベクターにより導入し、急性白血病と慢性白血病のそれぞれのモデルマウスの開発を試みた。さらに、これらのモデルマウスを用いて Geminin-EYFP の発現強度を調べ Geminin^{low} (静止期) と Geminin^{high} (活動期) で分取し、静止期にある白血病幹細胞の性状を同定する実験系を確立した。

(2) 併せて細胞生物学的手法では細胞周期制御因子について、近年様々な癌で発現が認められ、より腫瘍の増殖程度や予後判定について有用と報告されている DNA複製制御因子の中から MCM2、MCM7、そして複製起点認識複合体因子の ORC1、さらにいわゆる細胞増

殖マーカーと称される G₀ 期では発現が見られない細胞周期関連核タンパク質の Ki-67 の抗体をそれぞれ用いて、免疫染色やフローサイトメーターによって細胞周期を詳細に解析する実験系の樹立を目指した。

(3) CP-Geminin のマーカー特異的細胞導入法の予備実験として、ストレプトアビジンに CP-Geminin をケミカルカップリングさせ、これをビオチン化抗 Sca-1 抗体と結合させる (Sca-1-Ab-CP-Geminin 複合体)。この複合体をマウスに投与し (腹腔内もしくは経静脈)、この複合体が骨髄の造血幹細胞・多能性前駆細胞分画へ集積することを、免疫染色やフローサイトメーターにて確認し、次に白血病モデルマウスを代表的な治療薬 (Ara-C など) を投与して白血病を寛解状態にし、白血病幹細胞のマーカーである TIM-3 や Sca-1 などのビオチン化抗体とアビジン化 CP-Geminin の複合体を作成し投与することで、寛解状態における白血病幹細胞を静止期から追い出すことができるかどうかを検証する。さらに、白血病モデルマウスに過剰に CP-Geminin を投与することで白血病幹細胞を静止期に閉じ込められるかどうかを検証する。

4. 研究成果

(1) まず、MLL-AF9 や Hoxa9+Meis1a、BCR-ABL の融合遺伝子をレンチウイルスベクターに導入し、白血病融合遺伝子発現ベクターを作成した。さらに、これらのベクターを Geminin-EYFP ノックインマウス骨髄由来の未分化造血細胞に感染させ、感染した細胞をマウスに移植し白血病モデルマウスの開発に成功した。そして、これらのマウスの白血病幹細胞をフローサイトメーターで解析し、白血病細胞における静止期と活動期を Geminin の発現で分けることに成功した。そこで現在、白血病幹細胞の静止期にある細胞の性状を詳細に解析するため、静止期と活動期の細胞を分取し一細胞遺伝子発現解析を行う実験系を試みている。

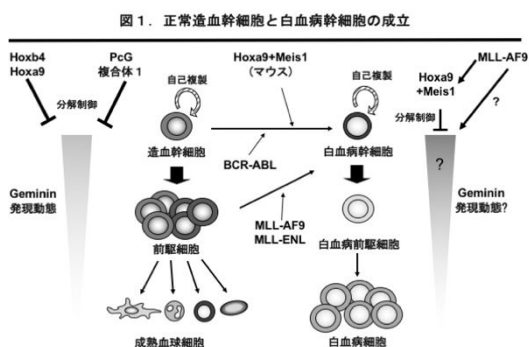


図1. 正常造血幹細胞と白血病幹細胞の成立

(2) MCM2 や MCM7、Ki-67 はすでに様々な抗体が作成されているが、マウスの Orc1 に対する抗体は作成されていなかった。そこで、ユーロフィン社に受注してマウス Orc1 に対するラビットポリクローナル抗体を作成した。この抗体が Orc1 の発現を解析できることを検証するために、静止期に誘導したマウス線維芽細胞培養細胞 (3T3 細胞) を活動期に促し、Orc1 の発現が検出されるのかフローサイトメーターで解析した。その結果、Orc1 の発現が増加する活動期において、抗体反応が増加しておりこの抗体が Orc1 の発現を検出できることを証明した。そこで、現在この抗体と MCM 2 や MCM7、Ki-67 抗体を用いて、マウス造血幹細胞の細胞周期を詳細に解析することを試みている。

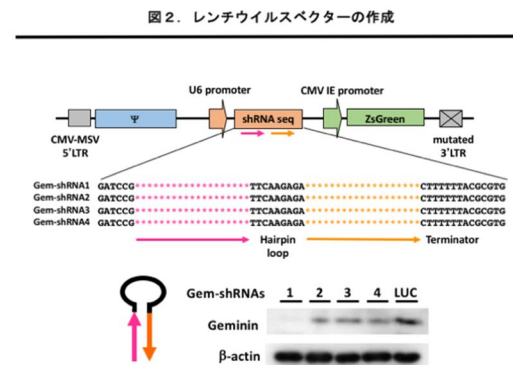


図2. レンチウイルスベクターの作成

(3) 予備実験として CP-Geminin が血球系細胞に導入できることをマウス骨髄細胞と血球系養細胞 (K562 細胞) を用いて検証した。検証の結果、非常に高濃度に添加を行わないと血球系細胞に導入することが難しいことがわかった。そのため、CP-Geminin を用いた実験系を見直すことにした。そして、機能制御型 Geminin と Geminin 発現抑制 shRNA を組込んだレンチウィルスとレトロウィルスを開発することとした。機能抑制型は、Geminin の Cdt1 との結合部位に変異を入れることで、Cdt1 との結合を阻害し、Cdt1 の活性を上げて、細胞周期を活性化させる変異体 (GemininMis7) と、Geminin と Brg1/Brahma の結合部位に変異を入れ、Geminin と Brg1/Brahma の結合を抑制し、Brg1/Brahma の活性を上げて分化を誘導する変異体 (Geminin5EQ) を作成した。さらに、

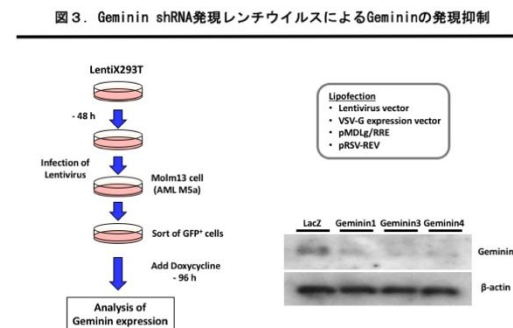


図3. Geminin shRNA発現レンチウイルスによるGemininの発現抑制

Geminin に対する 3 種類の shRNA を設計し、DOX 誘導型 shRNA 発現レンチウイルスベクターに組込んで、DOX 誘導型の Geminin 発現抑制レンチウイルスベクターを作成した。そして、これらのウイルスベクターを AML 培養細胞株 Molm13 細胞と CML 培養細胞株 K562 細胞に感染させ、Geminin の機能制御と発現抑制が白血病細胞の細胞周期や抗ガン剤に対する感受性にどのように影響を及ぼすのか検証した。結果 Molm13 細胞と K562 細胞で共に、GemininMis7 を用いて Cdt1 の活性を上げて細胞周期を活性化させることに成功し、DNA 複製合成阻害型の抗ガン剤 AraC に対する感受性を促進することに成功した。さらに、Molm13 細胞へ Geminin5EQ を導入した細胞において AML の分化誘導型抗ガン剤 ATRA に対する感受性を亢進することに成功した。K562 細胞の Geminin5EQ 導入細胞については現在検証中である。

次に、Geminin の発現抑制による細胞周期や抗ガン剤に対する感受性への影響を解析した。その結果、Geminin 発現抑制レンチウイルスベクターを導入した Molm13 細胞では Geminin 発現抑制によって AraC と ATRA に対する感受性が亢進していることを明らかにした。また、Molm13 細胞細胞中にある白血病幹細胞様細胞の数が減少していることを明らかにした。さらに、Molm13 細胞細胞をヌードマウスに移植し、腫瘍形成能を解析したところ、Geminin の発現抑制によって腫瘍形成能が低下していることを明らかにし、Geminin が Molm13 細胞細胞での幹細胞活性において重要な働きを持っていることを証明した。Geminin の発現抑制による K562 細胞の影響については現在解析中である。

今後は、これら培養細胞を用いた研究を応用し、白血病モデル Geminin-EYFP ノックインマウスを用いて Geminin の機能制御と発現抑制を行い、白血病幹細胞の活性制御における Geminin の役割について解析を行う計画である。

図 4. ヒト白血病細胞株における Geminin の機能抑制による抗がん剤による感受性の影響 (投与後 48 時間目のアポトーシス解析)

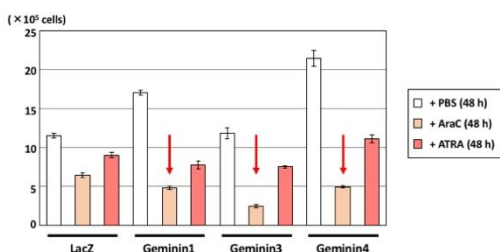
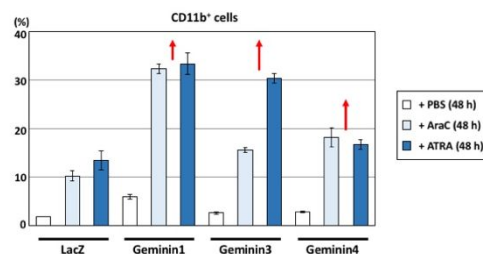


図 5. ヒト白血病細胞株における Geminin の機能抑制による抗がん剤による感受性の影響 (投与後 48 時間目の細胞分化誘導解析)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

大野 芳典*, 竹立 恭子*, 白須 直人, 安永 晋一郎, 瀧原 義宏, 「骨髓の組織反応」(特集 放射線生物学と放射線防護を繋ぐ組織反応研究), **放射線生物研究** 52(4) 336-349, 2017.

*責任著者(査読あり)

〔学会発表〕(計 15 件)

竹立 恭子, 大野 芳典, 川口健介, 白須 直人, 大坪 素秋, 安永 晋一郎, 瀧原 義宏, 造血幹細胞と白血病幹細胞の幹細胞活性を制御する中核因子 Geminin、**第 22 回バイオ治療法研究会学術集会** 2018 年 12 月 東京

大野 芳典, 竹立 恭子, 山藤 幹茂子, 郭 芸, 菅野 雅元, 白須 直人, 安永 晋一郎, 大坪 素秋, 瀧原 義宏, 造血における低線量率放射線に対する分子応答、**第 41 回日本分子生物学会年会** 2018 年 11 月 横浜

竹立 恭子, 大野 芳典, 白須 直人, 大坪 素秋, 安永 晋一郎, 瀧原 義宏, 造血幹細胞における Geminin を中核とした細胞周期とエピゲノム制御、**第 41 回日本分子生物学会年会** 2018 年 11 月 横浜

大野 芳典, 竹立 恭子, 山藤 幹茂子, 郭 芸, 菅野 雅元, 白須 直人, 安永 晋一郎, 大坪 素秋, 瀧原 義宏, 低線量率放射線による造血幹細胞の機能低下とその分子機序、**第 61 回日本放射線影響学会大会** 2018 年 11 月 長崎

大野 芳典, 竹立 恭子, 山藤 幹茂子, 郭 芸, 菅野 雅元, 白須 直人, 安永 晋一郎, 大坪 素秋, 瀧原 義宏, Effect of low dose-rate irradiation on the hematopoietic stem cells、**第 80 回日本血液学会総会** 2018 年 10 月 大阪

大野 芳典, 竹立 恭子, 郭 芸, 菅野 雅元, 白須 直人, 安永 晋一郎, 大坪 素秋, 瀧原 義宏, 低線量率放射線が造血幹細胞活性に与える影響 **第 43 回中国地区放射線影響研究会** 2018 年 7 月 広島

大野 芳典, 竹立 恭子, 白須 直人, 安永 晋一郎, 大坪 素秋, 瀧原 義宏, 幹細胞活性制御因子 Geminin の白血病の病態制御における役割、**第 22 回造血器腫瘍研究会** 2018 年 1 月 横浜

大野 芳典, 竹立 恭子, 郭 芸, 菅野 雅元, 白須 直人, 安永 晋一郎, 大坪 素秋, 瀧原 義宏、低線量率放射線が造血に与える影響、**第 40 回日本分子生物学会年会** 2017 年 12 月 神戸

竹立 恭子, 大野 芳典, 安永 晋一郎, 大坪 素秋, 瀧原 義宏、造血幹細胞の細胞周期制御と分化制御における分子機能、**第 40 回日本分子生物学会年会** 2017 年 12 月 神戸

大野 芳典, 竹立 恭子, 白須 直人, 安永 晋一郎, 大坪 素秋, 瀧原 義宏、造血幹細胞の細胞周期と分化を制御する中核因子 Geminin、**第 21 回バイオ治療法研究会学術集会** 2017 年 12 月 福岡

竹立 恭子, 大野 芳典, 山藤 幹茂子, 白須 直人, 安永 晋一郎, 大坪 素秋, 瀧原 義宏、膜透過型ペプチドを用いた幹細胞活性制御因子 Geminin の発現制御法の開発、**第 21 回バイオ治療法研究会学術集会** 2017 年 12 月 福岡

大野 芳典, 竹立 恭子, 郭 芸, 菅野 雅元, 白須 直人, 安永 晋一郎, 大坪 素秋, 瀧原 義宏、低線量率放射線照射環境下における造血システムへの影響とその分子応答、**第 60 回日本放射線影響学会学術集会** 2017 年 10 月 千葉

大野 芳典, 竹立 恭子, 郭 芸, 菅野 雅元, 白須 直人, 安永 晋一郎, 大坪 素秋, 瀧原 義宏、Molecular responses for low dose-rate irradiation in the hematopoietic stem cells.、**第 79 回日本血液学会学術集会** 2017 年 10 月 東京

大野 芳典, 竹立 恭子, 郭 芸, 菅野 雅元, 白須 直人, 安永 晋一郎, 大坪 素秋, 松浦 伸也, 瀧原 義宏、低線量率放射線被ばくに対する造血システムの分子応答、**第 58 回原爆後障害研究会** 2017 年 6 月 広島

大野 芳典, 竹立 恭子, 郭 芸, 菅野 雅元, 白須 直人, 安永 晋一郎, 大坪 素秋, 瀧原 義宏、Molecular response for low dose-rate irradiation in the hematopoietic system.、**第 15 回幹細胞シンポジウム** 2017 年 5 月 東京