

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月 1日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21790334

研究課題名（和文）急性骨髄性白血病幹細胞特異的なスプライシングの包括的解析と診断・治療の基盤整備

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of splicing variants characteristic of acute myelogenous leukemia stem cells

研究代表者

北村 浩 (Kitamura Hiroshi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：80312403

研究成果の概要（和文）：

急性骨髄性白血病(AML)の幹細胞、前駆細胞、AML様細胞株の全 mRNA 及びエクソンレベルでの発現解析をマイクロアレイで行った。AML 幹細胞と造血幹細胞を比較したところ全 mRNA レベルで 481 個、エクソンレベルで 117 遺伝子に発現変化が見られた。また AML 前駆細胞や AML 様細胞においても特徴的なスプライシングパターンや発現パターンを示すものがあつた。これら分子の強制発現・ノックダウン細胞を作製したところ、腫瘍化に関わる変化は認められなかったが炎症応答に影響を与えるものは見出された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we attempted to identify genes whose exon usage is modulated in acute myelogenous leukemia (AML) stem cells. Taking advantage of Affymetrix Exon 1.0ST arrays, we evinced that 117 genes represent distinct exon usage compared with hematopoietic stem cells from healthy volunteers. In addition, total 481 transcripts showed expressional changes in AML stem cells. We also found 16 genes undergo changes in exon usage along with differentiation of AML-like cell lines. Although we failed to find genes responsible for leukemogenesis in gene transfer studies, some genes/splicing variants regulates inflammatory responses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：マイクロアレイ・ゲノム・骨髄性白血病・白血病幹細胞・トランスクリプトーム・スプライシング・エクソンアレイ

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病 (Acute Myelogenous Leukemia, AML) は成人で有病率の高い白

血病であり、抗ガン剤による寛解導入療法に失敗すると、死の転機を辿る。抗ガン剤投与が AML の根本治療に繋がりにくい

は、AML 幹細胞が抗ガン剤抵抗性を示すことにあると考えられる。即ち、AML を克服するためには AML 幹細胞固有の細胞現象を捉え、それらの現象の基盤となる分子を同定する必要がある。本研究開始前より研究代表者らはマイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析や FACS 解析で、AML 幹細胞や AML 細胞に固有の分子発現をスクリーニングしてきた (Nat. Biotechnol. 2007)。しかし依然として、AML 幹細胞やそこから AML “分化” へ至る分子基盤は混とんとしていた。特に従来の検討では AML 幹細胞や AML 細胞の遺伝子単位のスクリーニングは行われてきたが、エクソン単位での発現は情報が完全に欠落していた。エクソン利用の変化。即ちスプライシングパターンや転写開始・終結部位の変化はでき上がるタンパク質に多様性を持たせることを可能とし、結果、細胞機能をより柔軟に制御することに繋がる。研究代表者は遺伝子レベルでの変化同様、エクソン発現レベルの変化も AML 幹細胞の性質や AML の病態に深く関わるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

(1) これまで全く情報が蓄積されていなかった AML 幹細胞や AML 細胞に固有のエクソン発現パターンを明らかにすることを目的とした。即ち、AML 患者から採取した CD34+CD38-(幹細胞)及び CD34+CD38+(分化細胞)や、AML 様株化細胞のエクソン発現パターンをゲノミクス的手法で調べ、これを健常人由来の細胞データと比較することで“エクソーム”レベルで AML を定義づけることを目的とした。

(2) (1) で明らかになった AML 幹細胞や AML (様) 細胞に固有のエクソン発現パターンをもつ分子の機能を明らかにし、AML 幹細胞・AML 細胞の細胞機能を決定づける、分子イベントを探索する。またこれら責任分子に対しての抗体を作製し、AML 治療のための道具を作出することも目的とした。

3. 研究の方法

(1) AML 患者及び健常人の骨髄などから FACS ソーターにより CD34+CD38-細胞及び CD34+CD38+細胞を採材し、RNA 抽出を行った。また既に樹立された AML 様細胞株からも RNA を抽出した。これらを微量 RNA 増幅系で増幅し、Affymetrix 社のエクソンアレイ (Human Exon 1.0ST array) にハイブリさせた。得られたデータを基に Partek 社の解析ソフトでエクソン利用の変わっている遺伝子を探索した。またこれらプログラムでのデータ解析が予想を遥かに上回りエラーが多かったことから、手作業で吟味するプ

ロトコールを構築し AML(幹)細胞に固有のエクソン利用を探索した。

(2) アレイデータ上、AML 幹細胞が分化する際に固有のエクソン利用パターンが見られる遺伝子については、変化のみられたエクソンと周囲エクソンの結合部を特異的に認識するプライマーを設計し、qRT-PCR 法で確認した。

(3) AML 様の細胞株の多くは未熟なステージの白血病様の性質であるが、分化刺激を加えると分化が進み腫瘍性を消失する。そこで、このモデルについても、遺伝子・エクソンレベルでのアレイ解析及び qRT-PCR 解析を実施した。

(4) エクソンレベル及び全 mRNA レベルで発現に変化がみられる遺伝子については、Gene Ontology (GO)解析やパスウェイ解析を実施して、AML の病態や AML 幹細胞の性質の裏付けとなる候補分子を探索した。

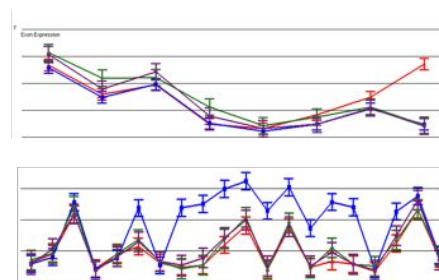
(5) (4) で見出された分子については、AML(幹)細胞に固有な発現レンチウイルスコンストラクトや、発現を抑える shRNA をコードするノックダウン (Knock Down: KD) 様コンストラクトを作製した。また一部の遺伝子についてはトランスジェニックマウスを構築した。

(6) (5) で作製したコンストラクトを AML 様株化細胞などに導入し分化マーカーの発現を FACS で調べると共に、細胞増殖や細胞周期、アポトーシス細胞の頻度、抗ガン剤への感受性などを調べた。

(7) (5) で作製した組み換え培養細胞及びトランスジェニックマウスの遺伝子発現解析を実施した。

(8) 見出された候補分子について対応するペプチド抗原及び組み換え体を作製し、ウサギに免疫して特異的抗体の作製を試みた。

4. 研究成果



AML幹細胞 AML前駆細胞 造血幹細胞 血球前駆細胞

図1 エクソンアレイのデータ

(1) 健常人及び AML 患者から採取した CD34+CD38-細胞及び CD34+CD38+細胞の mRNA をサンプルに、Affymetrix 社のエクソンアレイでエクソン利用に変化のある遺伝子を探索した (図 1)。健常人ではサンプル間のばらつきが少なく、幹細胞から前駆細胞への分化

時に $P < 0.01$ で変化を示している遺伝子が 743 個見出された。一方、AML 患者の場合、患者毎のばらつきが大きく、86 個に限定された。また骨髄由来の細胞に限定すれば 79 個であった。これら一つ一つを手作業で精査し直した結果、骨髄由来の AML 幹細胞の分化時に変化がみられる遺伝子が 32 個、骨髄に限らなければ 33 個見られた (図 2) これらのうち、

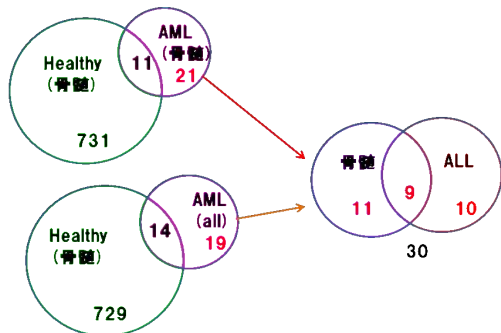


図2 EXONアレイで見出されたEXON利用が変化する遺伝子 健康人の骨髄造血幹細胞の分化時に変化がみられるものを除くと合計 30 遺伝子が AML 患者の幹細胞特異的にエクソン利用が変化する事が示唆された。

これら 30 遺伝子の GO 解析を実施したところ造血系に関わるターム (hematopoiesis, hematopoietic or lymphoid organ development, immune system development) が特に有意に認められた。

そこで、これら見出された 30 遺伝子について変化が見られるエクソン特異的な qRT-PCR 解析で確認実験を実施した。その結果、全 mRNA レベルで AML のみ変動がみられるものは複数あったが、エクソン利用のレベルでの変化は再現しなかった。また調べた AML6 検体の中でも大きなばらつきがみられ、共通に変化がみられるものは皆無であった。

(2) 次に AML 幹細胞と健康人の造血幹細胞にのみ注目し、エクソンアレイデータを比較することにした。Partek 社のプログラムは 554 遺伝子にエクソン利用の変化を示唆したが、その後の手作業による解析により、161 遺伝子にエクソン利用の差があるとの結論に至った。種々の GO 解析プログラムやパスウェイ解析プログラム、米国 NIAID の DAVID などを用いて解析したところ、この 116 遺伝子にはタンパク質キナーゼや膜タンパク質が有意に含まれていることが判明した。

そこでこれら 117 遺伝子のうち、40 遺伝子を選択し、qRT-PCR 解析を実施した。(1) 同様、qRT-PCR では AML 幹細胞と造血幹細胞での有意差が見出せない遺伝子が多かった。多くは特定の患者においてのみ変動のみされるものであった。AML 患者それぞれで原因や病態が異なることが当然であることを考えると、今後はより多数の検体でこれらの分子

の qPCR 解析を実施していけば、ある患者集団に特徴的にみられるエクソン利用・スプライシング異常が見出せる可能性が考えられる。一方で、数は少ないが、図 3 の様に広範な AML 患者で特徴的なスプライシングパターンが認められるケースもあった。

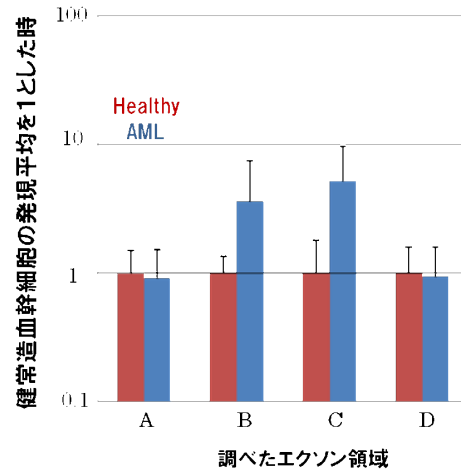


図3 エクソン特異的qRT-PCR

(3) 幹細胞では無いが、株化 AML 様細胞とそれをミエロイド系非腫瘍細胞に分化させたものについてもエクソンアレイ解析を実施した。3 種の細胞株を用いて分化前後でエクソン利用が変化するものを探索したところ、市販プログラムで 371 遺伝子が検出され、その後のマニュアルデータ解析で 71 個まで絞られた。さらに RT-qPCR 解析をすべてについて行ったところ 16 遺伝子がエクソン利用に変化が見られた。これらのいくつかについてはタンパク質発現においても変化が見られた。また AML 幹細胞の分化時にエクソン発現パターンが変化するものも含まれていた。

(4) エクソンアレイのデータを基に mRNA 全長 (whole transcript) レベルでのトランスクリプトーム解析を AML 幹細胞、AML (前駆) 細胞、AML 様細胞株について実施した。正常造血幹細胞と AML 幹細胞の間では、発現に差がある遺伝子が 481 見出された。これらを Ingenuity 社のプログラムで解析したところ、転写因子が 17、膜型受容体が 18、キナーゼ・フォスファターゼが 23、サイトカイン・成長因子が 11 含まれていた。

(5) (2) から (4) で見出した様々な機能分子について、強制発現ウイルスベクター、KD ウイルスベクターを構築し、AML 様細胞株や血球細胞株、293 細胞や HeLa 細胞に導入し機能評価した。しかし今までのところ、細胞周期や増殖能、表面分化マーカーの発現、アポトーシスの発生頻度、フォーカス形成能、抗ガン剤に対する感受性などに明確な変化

をもたらす強制発現・KD細胞は見いだせていない。しかし、一部の遺伝子については、導入細胞の網羅的な遺伝子発現解析をしたところ、TNFなどの炎症性サイトカインの産生を制御するものが含まれていた。これらの分子のミエロイド系細胞特異的なトランスジェニックマウスを作製したところ、20週齢以上たっても骨髄性白血病病変は見られなかったが、炎症応答に変化が見られるものがあった。このように急性骨髄性白血病発症に直接関わる幹細胞発現分子の検出には成功しなかったが、炎症性サイトカインの産生変化により、骨髄ニッチの環境を変えうる制御候補分子を見出した。なお、2分子についてはポリクローナル抗体を作り終えた。

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13件)

①Masatoshi Ito, Hiroshi Kitamura, Chisato Kikuguchi, Koji Hase, Hiroshi Ohno, and Osamu Ohara, *Cell Struct. Funct.*, 査読あり, 36(1), 27-33, 2011
DOI: 10.1247/csf.10025

②Yasutaka Motomura, Hiroshi Kitamura, Atsushi Hijikata, Yuko Matsunaga, Koichiro Matsumoto, Horomasa Inoue, Koji Atarashi, Shohei Hori, Hiroshi Watarai, Jinfang Zhu, Masaru Taniguchi, Masato Kubo, The transcription factor E4BP4 regulates the production of IL-10 and IL-13 in CD4⁺ T cells. *Nat. Immunol.* 査読あり, 12(5), 450-459, 2011
DOI: 10.1038/ni.2020

③Masashi Ebisawa, Koji Hase, Daisuke Takahashi, Hiroshi Kitamura, Kathryn A. Knoop, Ifor R. Williams, Hiroshi Ohno, CCR6hiCD11c^{int} B cells promote M-cell differentiation in Peyer's patch. *Int. Immunol.* 査読あり, 23(4), 261-269, 2011.
DOI: 10.1093/intimm/dxq478

④Xiangzhi Li, Kyo-ichi Isono, Daisuke Yamada, Takaho A. Endo, Mitsuhiro Endoh, Jun Shinga, Yoko Mizutani-Koseki, Arie P. Otte, Miguel Casanova, Hiroshi Kitamura, Takehiko Kamiyo, Jafar Sharif, Osamu Ohara, Tetsuro Toyada, Bradley E. Bernstein, Neil Brockdorff, and Haruhiko Koseki, Mammalian polycomb-like Pcl2/Mtf2 is a novel regulatory component of PRC2 that can differentially modulate polycomb activity both at the Hox gene cluster and at Cdkn2a genes. *Mol. Cell Biol.* 査読あり, 31(2), 351-364, 2011
DOI: 10.1128/MCB.00259-10

⑤Yayoi Kimura, Kayoko Nagata, Nobutake Suzuki, Ryo Yokoyama, Yuko Yamanaka, Hiroshi Kitamura, Hisashi Hirano, Osamu Ohara, Characterization of multiple alternative forms of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K by phosphate-affinity electrophoresis. *Proteomics*, 査読あり, 10(21), 3884-3895, 2010
DOI: 10.1002/pmic.201000349

⑥Kosuke Okita, Shinichiro Motohashi, Ryo Shinnakasu, Kaoru Nagato, Kazuki Yamasaki, Yasunori Sato, Hiroshi Kitamura, Atsushi Hijikata, Masakatsu Yamashita, Kanako Shimizu, Shin-ichiro Fujii, Osamu Ohara, Masaru Taniguchi, Isao Sakaida, Toshinori Nakayama, A set of gene associated with the interferon- α response and survival of lung cancer patients undergoing alpha-galactosylceramide-pulsed dendritic cell therapy. *Cancer Sci.*, 査読あり, 101(11), 2333-2340, 2010
DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01696.x

⑦Yoriko Saito*, Hiroshi Kitamura*, Atsushi Hijikata, Mariko Tomizawa-Murasawa, Satoshi Tanaka, Shinsuke Takagi, Naoyuki Uchida, Nahoko Suzuki, Akiko Sone, Yuho Najima, Hidetoshi Ozawa, Atsushi Wake, Shuichi Taniguchi, Leonard D Shultz, Osamu Ohara, Fumihiko Ishikawa (*equally contributes to this work) *Sci. Transl. Med.*, 査読あり, 2(17), 17ra9, 2010
DOI: 10.1126/scitranslmed.3000349

⑧Keiichiro Suzuki, Mikako Maruya, Shimpei Kawamoto, Katarzyna Sitnik, Hiroshi Kitamura, William W. Agace, Sidnia Fagarasan, The sensing of environmental stimuli by follicular dendritic cells promotes immunoglobulin A generation in the gut. *Immunity*, 査読あり, 33(1), 71-83, 2010
DOI: 10.1016/j.immuni.2010.07.003

⑨Koji Hase, Shunsuke Kimura, Hiroyuki Takatsu, Masumi Ohmae, Sayaka Kawano, Hiroshi Kitamura, Masatoshi Ito, Hiroshi Watarai, C. Clayton Hazelett, Charles Yeaman, Hiroshi Ohno, M-Sec promotes membrane nanotube formation by interacting with Ral and the exocyst complex. *Nat. Cell Biol.* 査読あり, 11(12), 1427-1432, 2009

DOI: 10.1038/ncb1990

⑩Hiromi Mori, Rika Ouchida, Atsushi Hijikata, Hiroshi Kitamura, Osamu Ohara, Yingqian Li, Xiang Gao, Akira Yasui, R. Stephan Lloyd, Ji-Yang Wang, Deficiency of the oxidative damage-specific DNA glycosylase NAIL1 leads to reduced germinal center B cell expansion, *DNA Repair (Amst)*, 査読あり、8(11), 1328-1332, 2009

DOI: 10.1016/j.dnarep.2009.08.007,

⑪Mariko Okamoto, Melanie Van Stry, Linda Chung, Madoka Koyanagi, Xizhang Sun, Yoshie Suzuki, Osamu Ohara, Hiroshi Kitamura, Atsushi Hijikata, Masato Kubo, Mark Bix, Mina, an *Il4* repressor, controls T helper type 2 bias. *Nat. Immunol.*, 査読あり、10(8), 872-879, 2009

DOI: 10.1038/ni.1747

⑫Chun-Hong Qin, Yasunobu Miyake, Hitomi Kaise, Hiroshi Kitamura, Osamu Ohara, Masato Tanaka, identification of a novel subset of CD8⁺ dendritic cells responsible for tolerance induction of cell-associated antigens, *J. Immunol.*, 査読あり、182(7), 4127-4136, 2009

DOI: 10.4049/jimmunol.0803364

⑬Kaori Sato, Kawori Eizumi, Tomohiro Fukaya, Shigeharu Fujita, Yumiko Sato, Hideaki Takagi, Mai Yamamoto, Naohide Yamashita, Atsushi Hijikata, Hiroshi Kitamura, Osamu Ohara, Sho Yamasaki, Takashi Saito, Katsuaki Sato, Naturally occurring regulatory dendritic cells regulate murine cutaneous graft-versus-host disease, *Blood*, 査読あり、113(19), 4780-4789, 2009.

DOI: 10.1182/blood-2008-10-183145

[学会発表] (計2件)

①北村 浩、伊藤誠敏、木村俊介、嶋本良則、小林敦夫、菊口千智、岡部 潤、渡会浩志、小原 收、三好一郎、マクロファージの新たな機能制御分子による2型糖尿病関連分子の発現調節、第152回日本獣医学会学術集会、2011年9月19-21日、大阪

②北村 浩 モダンゲノミクスの成果と展望-如何に使いこなすか?-、東海実験動物研究会2011年例会、2011年7月23日、名古屋

[産業財産権]

○取得状況 (計1件)

名称: Leukemia Stem Cell Markers

発明者: 石川文彦、小原收、齊藤頼子、北村浩、土方敦司、小澤秀俊

権利者: 理化学研究所

種類: 特許

番号: JP2010055131

取得年月日: 2011年4月11日

国内外の別: 国外

[その他]

ホームページ等

http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/animal.d/ir/animalweb/dcem/index_ncu.html

<http://www.facebook.com/dcemncu>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北村 浩 (KITAMURA HIROSHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 80312403

(2) 連携研究者

小原 收 (OHARA OSAMU)

独立行政法人理化学研究所・免疫アレルギー科学総合研究センター・グループディレクター

研究者番号: 20370926

石川 文彦 (ISHIKAWA FUMIHIKO)

独立行政法人理化学研究所・免疫アレルギー科学総合研究センター・グループディレクター

研究者番号: 30403918