

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：82606

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22130006

研究課題名（和文）癌幹細胞の自己複製と未分化性維持の分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Molecular mechanism for self-renewal of cancer stem cells

研究代表者

北林 一生 (Kitabayashi, Issay)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：20261175

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 139,600,000円

研究成果の概要（和文）：急性骨髄性白血病の幹細胞の維持に必要な経路として、HoxA9、M-CSFR、c-Kitの3つの経路を見出し、これらの発現はそれぞれBRPF1、PU.1及びc-MYBにより制御されることを明らかにした。これらの経路を遮断することにより、白血病が治癒した。これらの発見は、これらの経路が治療の良い標的となることを示している。

研究成果の概要（英文）：Expression of M-CSFR, HOXA9 and c-KIT is high in stem cells of acute myeloid leukemia (AML). MOZ-fusions induce expression of these genes by interacting with PU.1, c-MYB and BRPF1, respectively, and that these pathways are critical for maintenance of AML stem cells. These findings indicate that the identified pathways can be therapeutic targets for AML.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：白血病 がん幹細胞 分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

白血病を初め多くの癌で比較的少数の細胞集団に癌組織を再構築する能力を持つ癌幹細胞が存在することが証明されている。幹細胞は未分化性を維持しながら増殖する「自己複製」の能力を有する。我々は、自己複製能のないマウス骨髄前駆細胞にヒト白血病原因遺伝子を導入し、これを同種マウスに移植することにより癌幹細胞化することを確認していた。

癌幹細胞はしばしば治療抵抗性を示して治療後に残存し、残存した癌幹細胞が癌細胞を供給して再発の原因となると考えられていた。従って、癌幹細胞を完全に除去することが癌の根治に重要であると考えられるが、癌幹細胞を除去することにより本当に治癒できるのかを直接示した報告はなかった。

2. 研究の目的

本研究では、癌幹細胞の持つ自己複製能を維持する分子メカニズムを、主として癌幹細胞の側から明らかにし、治療の標的となりうる分子を同定する。癌幹細胞の解析システムとして、自己複製能を持たないマウス骨髄前駆細胞にヒト癌の原因遺伝子を導入して同種マウスに移植することにより自己複製能を持つ癌幹細胞へと変換したマウスモデルを主として用いる。これらのシステムを用いて癌幹細胞におけるニッチを含む外因性シグナル伝達機構とその結果生じる遺伝子の発現制御機構を解明し、癌幹細胞の自己複製能と未分化性の維持に必須な制御因子を明らかにする。さらに、これらの因子をコードする遺伝子を条件的に破壊できる遺伝子操作マウスを作成し、これらの因子の破壊により癌が治癒できるかどうかを検証することにより、癌の根治を目指した治療の標的となる分子を同定する。

3. 研究の方法

(1) 白血病モデル実験システムを用いた癌幹細胞の純化 癌幹細胞を研究するシステムとして、マウスにヒト白血病原因遺伝子を導入したモデル実験系を主として用いる。C57BL6 野生型マウス骨髄から造血前駆細胞を含む c-Kit 陽性細胞を採取し、これに病型 (慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病およびそれぞれの亜分類) の異なる主要な 9 種類の白血病原因遺伝子セット (BCR-ABL, AML1-ETO+c-Ha-Ras, PML-RARα+FLT3-ITD, NPMc+ FLT3-T1D, MOZ-TIF2, MLL-AF10, HoxA9+ Meis1, CALM-AF10, N-MYC) をそれぞれレトロウイルスベクターを用いて導入し、この感染細胞を放射線照射した同系マウスに移植することにより、マウスに白血病を発症させる。これらのシステムでは発症時期や頻度は異なるが全ての遺伝子セットで既に白血病発症が確認され、ヒト患者と同様な白血病がマウスで発症することが確認されている。これらの白血病発症マウスから採取した少

数の骨髄細胞を別の同系マウスに移植すると繰り返し同じ白血病が発症することから、骨髄細胞中には白血病を誘導する活性のある白血病幹細胞が存在することが示唆される。これらのモデル実験系を用いて発症マウスの骨髄細胞から様々なマーカーにより分画した細胞を 2 次移植することにより白血病誘導活性を測定し、癌幹細胞を純化する。これまでにこのシステムを用いて、MOZ 融合遺伝子が関与する急性骨髄性白血病 (MOZ 白血病) の幹細胞には M-CSF 受容体が高発現することを明らかにしているが、同様にして他の白血病原因遺伝子セットにより誘導される白血病についても純化する。

(2) 自己複製に必須な分子経路の同定 癌幹細胞の未分化性維持および自己複製に必須な経路およびその制御に関わる因子を同定する。(1)で純化した幹細胞の mRNA 発現プロファイル解析、microRNA の発現プロファイル解析、全タンパク質及びリン酸化特異的プロテオーム解析、網羅的クロマチン免疫沈降による解析を行うことにより、白血病幹細胞特異的に活性化されている経路を明らかにする。

(3) 自己複製に必要な因子の欠損マウスを用いた検証

(2)で同定された白血病幹細胞特異的に活性化されている経路を制御する因子の遺伝子領域に IonP 配列を導入することにより条件的に遺伝子欠損できるマウスを作製する。このマウスの骨髄細胞又は胎仔肝臓細胞に白血病原因遺伝子を導入し、この感染細胞を同系マウスに移植して白血病を誘導する。この時、遺伝子欠損を誘導することにより白血病が維持できるかどうかを検討することにより、癌幹細胞の維持に重要な因子であるかどうかを検証する。MOZ 融合遺伝子が関与する急性骨髄性白血病では、PU.1 欠損マウス及び M-CSF 受容体欠損マウスの胎仔幹細胞を用いた場合に白血病は発症しないことから、この経路が必須であることを明らかにしている。

(4) 白血病幹細胞を標的とした新たな治療薬の開発

(3)で同定された白血病幹細胞の維持に重要な因子を標的とした新たな治療薬を開発する。標的分子の性質により下記の 2 つのいずれか又は両方の手法を用いる。

イ) 標的とする分子が酵素である場合、その酵素活性が癌幹細胞の維持に必須であると期待されるので、標的分子の阻害剤を開発する。酵素阻害剤は上記マウスモデル実験系で作用を検証する。さらに、赤司らにより確立した免疫不全マウスに白血病幹細胞を移植することによりヒト白血病を再現したヒト生体癌幹細胞システムによりヒト白血病幹細胞に対する効果を検証し、同じメカニズムがヒトにおいても働いていることを確認する。

ロ) 標的とする分子が細胞の表面に発現す

る場合、その分子と特異的に結合する抗体医薬を開発する。抗体医薬は、癌幹細胞に発現する分子に結合し、NK細胞などの細胞障害活性により、癌細胞を破壊する。抗体医薬については上記ヒト白血病幹細胞を移植したモデル実験系を用いて治療効果を検証する。

4. 研究成果

急性骨髄性白血病で発現する MOZ-TIF2 融合遺伝子をマウス骨髄細胞に導入して移植することにより白血病を誘導したモデル実験系を用いて、発症マウスの骨髄細胞から様々なマーカーにより分画した細胞を2次移植することにより白血病誘導活性を測定し、癌幹細胞を純化した。この幹細胞では HoxA9、M-CSFR、C-Kit の発現が亢進していることを見いだした。HoxA9 の発現は、MOZ-TIF2 がクロマチン結合因子 BRPF1 との結合を介して HoxA9 遺伝子の修飾クロマチンを認識することにより活性化することを明らかにした。BRPF1 は MOZ-TIF2 と共に HoxA9 遺伝子に結合することを明らかにし、BRPF1 の発現を shRNA により抑制することにより、HoxA9 の発現や細胞のコロニー形成能が顕著に低下した。M-CSFR の発現は、MOZ-TIF2 が転写因子 PU.1 と結合を介して M-CSFR 遺伝子の特異的 DNA 配列を認識することにより活性化することを明らかにした。PU.1 遺伝子をコンディショナルノックアウトマウスを用いて PU.1 遺伝子を欠損させると M-CSFR の発現が著しく低下し、白血病誘導が完全に阻害された。これらの結果から、BRPF1/HoxA9 経路や PU.1/M-CSFR が急性骨髄性白血病の幹細胞の維持に必須であることが証明された。また、ポリコム複合体を形成する Ring1A/Ring1B が急性骨髄性白血病の幹細胞の維持に必須であることを明らかにした。Ring1A/Ring1B 遺伝子の欠損により、発現の変化する遺伝子を網羅的に解析し、急性骨髄性白血病の幹細胞の維持に関わる因子 Glis2 を同定した。

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18件)

1. Ogawara Y, Takuo Katsumoto T, Aikawa Y, Shima Y, Kagiya Y, Soga T, Matsunaga H, Seki T, Araki K, Kitabayashi I. IDH2 and NPM1 mutations cooperate to activate Hoxa9/Meis1 and hypoxia pathways in acute myeloid leukemia. *Cancer Res.* 75:2005-2016, 2015.

2. Aikawa Y, Yamagata K, Katsumoto T, Shima Y, Shino M, Stanley ER, Cleary ML, Akashi K, Tenen DG, Kitabayashi I. Essential role of PU.1 in maintenance of MLL-associated leukemia stem cells. *Cancer Sci.* 106:227-36 2015.

3. Nakamoto-Matsubara R, Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Yoshida K, Yanagimoto S, Shiozawa Y, Nanmoku T, Satomi K, Muto H, Obara N, Kato T, Kurita N, Yokoyama Y, Izutsu K, Ota Y, Sanada M, Shimizu S, Komeno T, Sato Y, Ito T, Kitabayashi I, Takeuchi K, Nakamura N, Ogawa S, Chiba S. Detection of the G17V RHOA mutation in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and related lymphomas using quantitative allele-specific PCR. *PLoS One.* 9:e109714, 2014.

4. Kato T, Sakata-Yanagimoto M, Nishikii H, Ueno M, Miyake Y, Yokoyama Y, Asabe Y, Kamada Y, Muto H, Obara N, Suzukawa K, Hasegawa Y, Kitabayashi I, Uchida K, Hirao A, Yagita H, Kageyama R, Chiba S. Hes1 suppresses acute myeloid leukemia development through FLT3 repression. *Leukemia*, 29:576-85. 2014 Sep 19. doi: 10.1038/leu.2014.281. [Epub ahead of print]

5. Nakahata S, Ichikawa T, Maneesay P, Saito Y, Nagai K, Tamura T, Manachai N, Yamakawa N, Hamasaki M, Kitabayashi I, Arai Y, Kanai Y, Taki T, Abe T, Kiyonari H, Shimoda K, Ohshima K, Horii A, Shima H, Taniwaki M, Yamaguchi R, Morishita K. Loss of NDRG2 expression activates PI3K-AKT signalling via PTEN phosphorylation in ATLL and other cancers. *Nat Commun.* 5:3393, 2014.

6. Miyagi S, Koide S, Saraya A, Wendt GR, Oshima M, Konuma T, Yamazaki S, Mochizuki-Kashio M, Nakajima-Takagi Y, Wang C, Chiba T, Kitabayashi I, Nakauchi H, Iwama A. The TIF1-HP1 System Maintains Transcriptional Integrity of Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cell Reports.* 2:145-52, 2014.

7. Suzuki M, Yamagata K, Shino M, Aikawa Y, Akashi K, Watanabe T, Kitabayashi I. The nuclear export signal (NES) within CALM is necessary for CALM-AF10-induced leukemia. *Cancer Sci.* 105:315-23, 2014.

8. Iwamoto C, Takenaka K, Urata S, Yamauchi T, Shima T, Kuriyama T, Daitoku S, Saito Y, Miyamoto T, Iwasaki H, Kitabayashi I, Itoh K, Kishimoto J, Kohda D, Matozaki T, Akashi K. The BALB/c-specific polymorphic SIRPA enhances its affinity for human CD47, inhibiting phagocytosis against human cells to promote xenogeneic engraftment. *Exp Hematol.* 42:163-171, 2014.

9. Shima H, Yamagata K, Aikawa Y, Shino M, Koseki H, Shimada H, Kitabayashi I. Bromodomain-PHD finger protein 1 is critical for leukemogenesis associated with MOZ-TIF2 fusion. *Int. J. Hematology* 9: 21-31, 2014.
10. Yokoyama A, Ficara F, Murphy MJ, Meisel C, Hatanaka C, Kitabayashi I, Cleary ML. MLL Becomes Functional through Intra-Molecular Interaction Not by Proteolytic Processing. *PLoS One*. 2013 Sep 10;8(9):e73649.
11. Shimizu K, Yamagata K, Kurokawa M, Mizutani S, Tsunematsu Y, Kitabayashi I. Roles of AML1/RUNX1 in T-cell malignancy induced by loss of p53. *Cancer Sci*. 104: 1033-1038, 2013.
12. Shima Y, Honma Y, Kitabayashi I. Mechanism of PML nuclear body disruption in APL: PML-RARα inhibits PML oligomerization and its phosphorylation restores PML NBs. *Cancer Res*. 73:4278-4288, 2013.
13. Rokudai S, Laptenko O, Arnal SM, Taya Y, Kitabayashi I, Prives C. MOZ increases p53 acetylation and premature senescence through its complex formation with PML. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110:3895-3900, 2013.
14. Iwanami A, Gini B, Zanca C, Matsutani T, Assuncao A, Nael A, Dang J, Yang H, Zhu S, Kohyama J, Kitabayashi I, Cavenee WK, Cloughesy TF, Furnari FB, Nakamura M, Toyama Y, Okano H, Mischel PS. PML mediates glioblastoma resistance to mammalian target of rapamycin (mTOR)-targeted therapies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110:4339-4344, 2013.
15. Mishima Y, Miyagi S, Saraya A, Negishi M, Endoh M, Endo TA, Toyoda T, Shinga J, Katsumoto T, Chiba T, Yamaguchi N, Kitabayashi I, Koseki H, Iwama A. The Hbo1-Brd1/Brpf2 complex is responsible for global acetylation of H3K14 and required for fetal liver erythropoiesis. *Blood*. 118:2443-53, 2011.
16. Yokoyama A, Ficara F, Murphy MJ, Meisel C, Naresh A, Kitabayashi I, Cleary ML. Proteolytically cleaved MLL subunits are susceptible to distinct degradation pathways. *J Cell Sci.*, 124:2208-2219, 2011.

17. Aikawa Y, Katsumoto K, Zhang P, Shima H, Shino M, Terui K, Ito E, Ohno H, Stanley ER, Singh H, Tenen DG, Kitabayashi I. PU.1-mediated upregulation of M-CSFR is critical for leukemia stem cell potential induced by MOZ-TIF2. *Nat Med*, 16: 580-585, 2010.

18. Yokoyama A, Lin M, Naresh A, Kitabayashi I, Cleary ML. A Higher-Order Complex Containing AF4 and ENL Family Proteins with P-TEFb Facilitates Oncogenic and Physiologic MLL-Dependent Transcription. *Cancer Cell*, 17: 198-212, 2010.

〔学会発表〕(計7件)

- 1 北林一生 第73回日本癌学会シンポジウム 横浜 2014年9月 Clonal evolution of stem cells and therapeutic strategy in acute myeloid leukemia
- 2 北林一生 第87回日本生化学会シンポジウム 京 2014年10月 がん幹細胞成立と維持における変異型 IDH の役割と治療
- 3 北林一生 第37回日本分子生物学会シンポジウム 横浜 2014年11月 Epigenetic regulation of stem cells in acute myeloid leukemia
- 4 北林一生 第72回日本癌学会シンポジウム 横浜 2013年10月 急性骨髄性白血病における幹細胞の制御と治療戦略
- 5 北林一生 第74回日本血液学会シンポジウム 京都 2012年10月 Critical pathways for maintenance of stem cells in acute myeloid leukemia
- 6 北林一生 第73回日本癌学会シンポジウム 名古屋 2011年10月4日 Pathways critical for maintenance of stem cells in leukemias
- 7 北林一生 第34回日本分子生物学会シンポジウム 横浜 2011年12月16日 Pathways critical for maintenance of stem cells in leukemias

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称: 白血病治療剤、白血病細胞増殖阻害剤、造血幹細胞移植前処置剤及び効果測定方法
発明者: 北林一生、島豊
番号: 特願 2014-095467
出願年月日: 2014/5/2

国内外の別：国内

名称：マウス AML モデルを用いたイソクエン酸デヒドロゲナーゼ変異体活性の評価システム

発明者：北林一生、小川原陽子

権利者：

種類：

番号：特願 2013-230472

出願年月日：2013/11/6

国内外の別：国内

6．研究組織

(1)研究代表者

北林 一生 (Kitabayashi, Issay)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：20261175