

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：32692

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19205

研究課題名(和文) Notchシグナルによる白血病細胞増殖機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the leukemia cell growth mechanism in Notch signaling

研究代表者

奥橋 佑基 (OKUHASHI, Yuki)

東京工科大学・医療保健学部・助教

研究者番号：90734715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：白血病細胞の増殖と分化には、幹細胞の制御に関わるシグナルの異常が関与するとされている。本研究では、Notchシグナル阻害剤による白血病の増殖への効果が異なる原因を解明し、白血病の新たな細胞増殖メカニズムを明らかにすることを目的として検討を行った。
siRNAによる遺伝子ノックダウンとNotchシグナル阻害剤の効果は同様の傾向を示したことから、用いた白血病細胞において、Notchシグナルの発現抑制は細胞の増殖を抑制させることが改めて示唆された。さらに、一部の白血病細胞株ではNotch1だけでなく、Notch2も細胞増殖に関与している可能性と薬剤耐性メカニズムの一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Notch1だけでなくNotch2が白血病細胞の増殖に関与している可能性が本研究から明らかになった。また、PTEN遺伝子欠損細胞を作成し、Notch阻害剤への効果や他のシグナル伝達系へ及ぼす影響を明らかにする研究は本研究が世界初である。

本研究成果により、白血病細胞におけるNotchシグナル伝達系の分子機序が明らかになった。これにより、症例ごとの白血病幹細胞の特性を検出する分子生物学的検査法や症例に応じた分子標的薬を選択することが可能になる。将来は本研究の結果をふまえ、白血病幹細胞に特異的で、副作用が少ない分子標的治療の開発とその検討研究が予想される。

研究成果の概要(英文)：Notch signaling is crucial for the growth of leukemia cells. We reported the effects of -secretase inhibitors (GSIs), which block Notch activation, on the growth of leukemia cells. GSIs suppressed the growth through induction of apoptosis in most of cell lines. Conversely, the growth of some cell lines were promoted by GSI treatment. I investigated the mechanisms focusing on the crosstalk between NOTCH1 and NOTCH2 signaling in leukemia cells.

Using siRNA-mediated knockdown experiments, we found that not only NOTCH1 knockdown but also NOTCH2 knockdown affected the growth of these NOTCH1-mutated, NOTCH2-unmutated T-lymphoblastic leukemia cell lines. The growth suppression by NOTCH2 knockdown did not involve the suppression of MYC expression, which was suppressed by NOTCH1 knockdown. We also found the crosstalk between NOTCH1 and NOTCH2 in Jurkat cell line, which suggests that Jurkat might have reciprocally compensating system between two NOTCH. It might cause the resistance to GSIs.

研究分野：血液学

キーワード：白血病 シグナル伝達 Notchシグナル siRNA CRISPR/cas9 PTEN

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在までの研究で白血病細胞の増殖と分化には Notch、Wnt、Hedgehog、mTOR シグナルが関与しており、特に Notch シグナル阻害剤の *-secretase inhibitor (GSI)* は多くの白血病細胞株に対してアポトーシスを介した増殖抑制効果が認められることを見出したが、一部の白血病細胞株では増殖がむしろ促進するという結果を世界で初めて発見し報告した (Okuhashi et al. *Anticancer Res*, 30: 495-498, 2010)。これは GSI が白血病細胞の増殖に対して多様な作用をもつことを示唆し、GSI の臨床使用にあたって注意が必要であることを意味する。

また、これまでの研究から、T-ALL の増殖には Notch1 だけでなく、Notch2 も増殖に関与していることを発見した (Okuhashi et al. *Anticancer Res*, 33: 4293-4298, 2013)。しかし、その詳細な分子機序は不明である。白血病細胞の増殖におけるシグナル伝達系の分子機序が明らかになれば、新たな分子標的治療開発や分子生物学的検査法の確立等が期待される。従って、白血病細胞の増殖を調節するシグナル分子機構を明確にすべきであると考えられる。

2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究は白血病細胞の増殖における Notch シグナルの分子機構と細胞特性を明らかにし、より効果的な分子標的治療薬の発見と新たな分子生物学的検査法の開発を目指す。

(1) Notch シグナル関連遺伝子である *NOTCH1* 遺伝子と *NOTCH2* 遺伝子の発現を単独または同時にノックダウンさせたものと、GSI で Notch シグナルを阻害させたときのタンパクおよび mRNA の発現量などを比較解析することで、GSI の特異性を明らかにする。

(2) 以前に報告した、GSI で細胞増殖促進が認められた T-ALL の Jurkat は、PTEN 遺伝子が欠損していることが知られていることから、Jurkat 以外の T-ALL 細胞株に対して CRISPR/cas9 ゲノム編集システムを用いて *PTEN* 遺伝子ノックアウト細胞または siRNA による *PTEN* 遺伝子ノックダウン細胞を作成後、GSI 投与前後の効果を解析し、細胞増殖に関する因子および GSI の分子レベルの作用機序を明らかにする。

3. 研究の方法

【平成 28 年度～平成 30 年度】

Notch シグナルの分子機序の解明

(1) siRNA の導入効率の検討

Notch シグナル関連遺伝子である *NOTCH1* の siRNA と *NOTCH2* の siRNA をそれぞれ、エレクトロポレーション装置を用いて白血病細胞内に導入後、以下の条件で液体培養した。

未処理の細胞

GSI を添加した細胞

Control siRNA を導入した細胞

NOTCH1 siRNA を導入した細胞

NOTCH2 siRNA を導入した細胞

NOTCH1 siRNA と *NOTCH2* siRNA を両方導入した細胞

目的の遺伝子の発現が抑制されたかどうかを測定する方法として、

1) 細胞から RNA を抽出し、cDNA を合成後、定量 RT-PCR 法によって、目的遺伝子である *NOTCH1* と *NOTCH2* の mRNA 発現量の変化を解析した。

2) 細胞からタンパクを抽出し、イムノブロット法によって、目的タンパクである *NOTCH1* タンパクと *NOTCH2* タンパクの発現量を解析した。

3) 蛍光抗体細胞染色法によりターゲット mRNA のサイレンシングを確認した。

(2) siRNA と GSI による細胞増殖への効果の比較検討

(1) で siRNA による目的遺伝子のノックダウンが確認できたので、WST 法にて細胞増殖効果を評価し、コロニーアッセイ法で自己複製能への作用を調べ、GSI による効果と比較検討した。コロニーアッセイ法は、半流動培地であるメチルセルロースを用いて細胞培養法に工夫を与えることにより、幹細胞の特徴の一つである自己複製能を評価できる実験系である。この実験により、白血病の細胞増殖の根源である白血病幹細胞の自己複製能を解析することが可能となった。

(3) siRNA による遺伝子発現量の変化の解析

(1) で記した条件で液体培養後、抽出した RNA から cDNA を合成し、発現に変化が予測される Notch シグナルの下流に存在する関連遺伝子および白血病の分化増殖への関与が報告されている Wnt、Hedgehog、mTOR シグナル関連遺伝子に対し、定量 RT-PCR 法を用いてその遺伝子発現量の変化を解析した。

(4) siRNA によるタンパク発現の検討

(3) の解析で mRNA 発現量に変化が認められた遺伝子のタンパクに対する抗体を用いて、イムノブロット法によるタンパクの発現や活性化の変化を調べた。

【平成29年度～令和元年度】

白血病の増殖に関与する因子と細胞特性の解明

(1) PTEN遺伝子ノックアウト細胞の作成

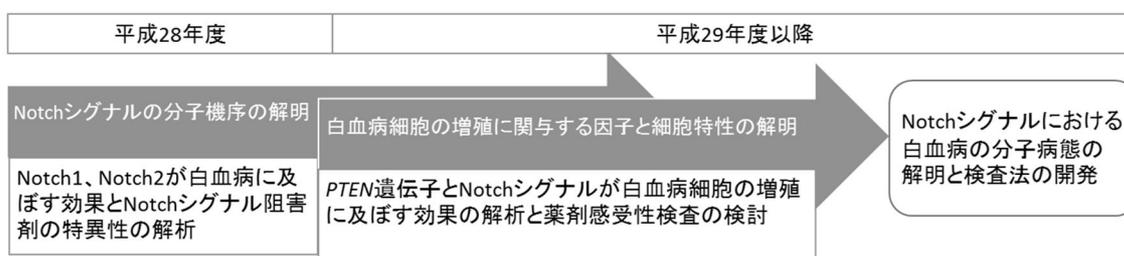
PTEN CRISPR Knockout and Activation Plasmids (SANTA CRUZ 社)を Jurkat 以外の細胞株に導入し、PTEN 遺伝子をノックアウトさせた。siRNA による RNA 干渉では mRNA を標的としてその発現量をノックダウンさせるので、遺伝子やタンパクの発現量の変化が解析できるのに対し、CRISPR/Cas9 システムはゲノム DNA を標的に編集することで対象タンパク質をノックアウトし、その変化は永久に持続するため、本研究のようにモデル細胞を作成するのに優れている。CRISPR/Cas9 システムの細胞導入効率が良くなかった際は、siRNA による PTEN 遺伝子ノックダウン細胞を作成し、検討した。

(2) トランスフェクションの検証

28年度の研究方法(1)と同様の方法で、PTEN の mRNA 発現量と PTEN タンパクの発現を確認した。

(3) シグナル阻害剤による効果の解析

(2) で PTEN 遺伝子のノックアウトが確認できたので、それらの細胞に GSI を添加し、増殖への効果や遺伝子発現量とタンパク発現量の変化を調べた。さらに、Wnt シグナル、Hedgehog シグナルなどの阻害剤を添加し同様の解析を行い、それぞれの効果を総括した。



4. 研究成果

【白血病の増殖に関与する因子と細胞特性の解明】

NOTCH siRNA によるノックダウン効率：各3種の NOTCH1 siRNA (siN1)と NOTCH2 siRNA (siN2)による、NOTCH1 と NOTCH2 mRNA およびタンパクの発現へのノックダウン効率を比較し、細胞ごとに最も導入効率のよかった siRNA をその後の解析に用いた。NOTCH siRNA による細胞増殖への効果：siN1、siN2 をそれぞれ4種の白血病細胞株に導入し、3日間培養した結果、DND-41 と KOPT-K1 で細胞増殖の抑制が認められた。一方、THP-1 と TMD7 では、siRNA 導入による細胞増殖の顕著な差はみられなかった。また、siN1 と siN2 を混合して細胞に導入し、相加または相乗効果を検討したが、大きな変化はみられなかった(図1)。さらに、siN1、siN2 を導入した DND-41 と KOPT-K1 では、アポトーシス像を示唆する形態変化を認めた。この形態変化は siN1 と siN2 での違いはみられず、また形態学的な分化誘導は認められなかった。

NOTCH siRNA によるタンパク発現への効果：NOTCH のノックダウンが Notch シグナルおよび mTOR シグナルへ及ぼす効果を解析した。用いたすべての細胞で、siN1 と siN2 導入によってそれぞれ標的とする Notch1、Notch 2 のタンパク発現の減少が認められた。また siN1 により Notch1 の活性型断片である cleaved Notch1 の減少も認められた。興味深いことに、THP-1 と TMD7 で siN2 導入によって、Notch1 のタンパク量は変化せずに cleaved Notch1 のみの増加が認められた。一方、T-ALL の DND-41 と KOPT-K1 では siN2 によるこのような変化はみられなかったが、siN1 導入によって MYC の減少が認められた。次に、mTOR シグナルへの効果を解析したところ、DND-41 で siN1 によって p-4E-BP1 と S6K の減少がみられた。THP-1 では siN1 と siN2 によって mTOR または p-mTOR の減少が認められた。

KOPT-K1 では、siN1 により増殖抑制がみられたのに対し、Jurkat では増殖促進傾向がみられた。また、Jurkat において siN1 だけでなく、siN2 も増殖促進傾向を示した。免疫プロットでは、siN1 導入により Notch1 と活性型 Notch1 蛋白が減少し、siN2 導入により Notch2 蛋白が減少したことを確認した。定量 RT-PCR では siN1 導入で NOTCH1 遺伝子の mRNA 発現量が減少し、siN2 導入で NOTCH2 遺伝子の mRNA 発現量が減少した。これらより2種類の siRNA がそれぞれの標的

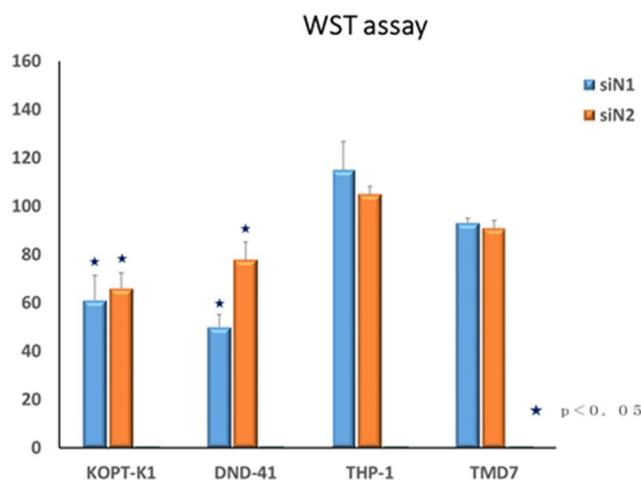


図1. WST法による NOTCH1 または NOTCH2 siRNA 導入後の細胞増殖への効果

遺伝子の発現を抑制していることを確認した。さらに、Jurkat において、siN1 により Notch2 蛋白が増加し、siN2 により Notch1 蛋白、活性型 Notch1 蛋白、HES1 蛋白、MYC 蛋白が増加し、mTOR シグナル関連蛋白である mTOR 蛋白、リン酸化 mTOR 蛋白、AKT 蛋白も増加した。本研究は、NOTCH のノックダウンが NOTCH1 変異をもつ 2 種の T-ALL 細胞株の増殖を抑制させることを示した。

Notch1 の恒常的な活性化が *NOTCH1* 変異をもつ T-ALL の細胞増殖に重要であることはすでに知られているが、NOTCH siRNA が T-ALL 細胞株の DND-41 と KOPT-K1 の増殖を抑制することを示した研究は本研究が初である。

本研究から、*NOTCH2* 変異をもたない T-ALL 細胞が、*NOTCH1* のノックダウンだけでなく、*NOTCH2* のノックダウンによっても細胞増殖が抑制されたことを見出した。また、*NOTCH1* のノックダウンで認められた *MYC* の発現抑制は、*NOTCH2* のノックダウンでは認められなかった。

今回、研究代表者は AML 細胞において、*NOTCH2* のノックダウンが Notch1 タンパクの発現に影響を与えることなく活性型 cleaved Notch1 の発現量を増加させたことを見出した。この発見から、Notch2 の減少が Notch1 の断片化を促進させたか、あるいは cleaved Notch1 の半減期を延長させた可能性が示唆される。T-ALL ではこのような現象が認められなかったが、これは T-ALL が NOTCH1 変異をもつため、cleaved Notch1 が恒常的に活性化しているためだと考えられる。Notch2 から Notch1 への経路について証明する必要がある。

【白血病の増殖に関与する因子と細胞特性の解明】

T-ALL 細胞株の Jurkat と KOPT-K1 を用いて *PTEN* siRNA (siPTEN) での検討を実施した。Jurkat は *PTEN* 遺伝子がかつと欠損している為、*PTEN* 蛋白および *PTEN* 遺伝子の mRNA が検出されないことを確認した。KOPT-K1 において siPTEN 導入により、*PTEN* 蛋白が減少し、*PTEN* 遺伝子の mRNA 発現量が減少した。このことから、用いた siRNA が標的遺伝子の発現を抑制していることを確認した。Jurkat において、siPTEN 導入により増殖抑制効果がみられ、アポトーシスを伴う死細胞が多く観察された。KOPT-K1 では、siPTEN による細胞増殖の変化はみられなかった。イムノプロットでは、Jurkat において、siPTEN により Notch1 蛋白と活性型 Notch1 蛋白、Notch2 蛋白が増加しただけでなく、*PTEN* の偽遺伝子である *PTENP1* のタンパク発現量の増加が確認できたとともに mTOR シグナル関連蛋白、WNT シグナル関連蛋白、Hedgehog シグナル関連蛋白の増加が認められた。

次に、*PTEN* 遺伝子をノックアウトさせる *PTEN* CRISPR Knockout and Activation Plasmids (KOPTEN) を導入し、siPTEN と同様の方法で検討を行った。定量 RT-PCR 法およびイムノプロット法の結果から、KOPT-K1 において、標的遺伝子である *PTEN* 遺伝子と *PTEN* タンパクの発現量が KOPTEN および siPTEN によって抑制されたことを確認した。WST8 法の結果、KOPTEN 後の KOPT-K1 において、GSI-XXI 添加により細胞増殖促進効果がみられた。また、Jurkat において、KOPTEN によって細胞増殖抑制効果がみられた。

本研究から、*PTEN* の発現を抑制した細胞は GSI-XXI によって細胞増殖が促進する可能性が高まった。また、Jurkat は *PTEN* を欠損しているにも関わらず、*PTEN* 遺伝子の発現を抑制させることによって、細胞増殖に変化がみられた。これは *PTENP1* が細胞増殖に関与していることが示唆される。従来、偽遺伝子は機能遺伝子の塩基配列と類似しているが、機能を有していないと考えられている DNA 領域のことであり、重要ではないとされてきた。しかし、機能を有するものもあり、その機能がそのもととなる遺伝子だけでなく無関係の遺伝子にも影響を及ぼす可能性があることが近年報告されている。本研究でも *PTEN* の偽遺伝子である *PTENP1* が機能を獲得して、新規の生物学的役割を果たした結果、一部の白血病細胞株の増殖に影響を及ぼした可能性が示唆された。今後、他の細胞株で同様の検討を行うとともに、*PTEN* および *PTENP1* の更なる機能解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Itoh M, Okuhashi Y, Takahashi Y, Sonoda Y, Mohammad S, Saito T, Shiratori E, Tohda S	4. 巻 39
2. 論文標題 Hypoxia Up-regulates HIF Expression While Suppressing Cell Growth and NOTCH Activity in Leukaemia Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4165-4170
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okuhashi Y, Itoh M, Tohda S.	4. 巻 38
2. 論文標題 GLI1 and CTNNB1 Knockdown Activates NOTCH and mTOR Signalling in NB4 Myeloid Leukaemia Cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 6329-6332
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okuhashi Y, Itoh M, Tohda S	4. 巻 37
2. 論文標題 Hedgehog Stimulation Suppresses Clonogenicity and Activates NOTCH Signaling in T-lymphoblastic Leukaemia Jurkat Cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 5005-5009
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 奥橋 佑基、東田 修二
2. 発表標題 白血病における細胞周期制御に関する偽遺伝子の解析
3. 学会等名 第66回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遠藤 佳那、渡邊 未久、田中 永乃、土屋 亮太、奥橋 佑基
2. 発表標題 カテキンによる白血病幹細胞への効果
3. 学会等名 第56回首都圏支部・関東甲信支部検査学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥橋佑基、細萱茂実、東田修二
2. 発表標題 白血病細胞の増殖における偽遺伝子PTENP1の役割
3. 学会等名 第65回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥橋佑基、横田恭子、細萱茂実
2. 発表標題 臨床検査学科の学生に対するICTツールを活用したアクティブラーニングの効果
3. 学会等名 第13回日本臨床検査学教育学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 志村佳菜、土屋沙也花、丸山紗季、川名拓海、奥橋佑基
2. 発表標題 白血病細胞の増殖におけるカテキンの効果
3. 学会等名 第13回日本臨床検査学教育学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川名拓海、志村佳菜、土屋沙也花、丸山紗季、奥橋佑基
2. 発表標題 DMSOが白血病細胞の増殖に及ぼす影響
3. 学会等名 第13回日本臨床検査学教育学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥橋 佑基、細萱 茂実、東田 修二
2. 発表標題 siRNAとCRISPR/Cas9システムを用いたゲノム編集による白血病細胞の増殖への影響
3. 学会等名 第64回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤田佳那、渡辺律子、足立若菜、佐藤結衣、奥橋佑基
2. 発表標題 T-ALLの分化、増殖におけるDMSOの影響
3. 学会等名 第12回日本臨床検査学教育学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 奥橋 佑基
2. 発表標題 Notchシグナル阻害剤に耐性を示す白血病細胞の分子病態の解明
3. 学会等名 第20回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 奥橋 佑基、細萱 茂美、東田 修二
2. 発表標題 急性Tリンパ芽球性白血病におけるPTENの機能解析 (ポスター)
3. 学会等名 第63回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 奥橋 佑基、細萱 茂美、東田 修二
2. 発表標題 急性Tリンパ芽球性白血病におけるPTENの機能解析 (口演)
3. 学会等名 第63回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考