

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16100

研究課題名(和文) Syt11により分泌制御されるAMLエクソソームの骨髄定着における役割の解明

研究課題名(英文) Involvement of Syt11-mediated AML exosomes in AML leukemogenesis

研究代表者

角南 義孝 (Sunami, Yoshitaka)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 発がん研究部・研究員

研究者番号：50732864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：白血病関連遺伝子Meis1の標的遺伝子であるSyt11が、エクソソーム分泌を制御することで急性骨髄性白血病(AML)細胞の骨髄生着を促進するというモデルを明らかにし、AML細胞が骨髄定着する分子基盤を解明することを目的に本研究を開始した。しかしSyt11ノックアウトマウスを用いた実験によりMeis1非関連AML細胞の骨髄定着において、Syt11の役割は限定的であることが明らかとなった。そこでAML細胞の骨髄生着に必須の遺伝子を探索する目的で、全遺伝子を対象としたshRNAスクリーニングとカスタムsgRNAスクリーニングを実施し、最終的に標的候補遺伝子として37遺伝子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AMLは高率に再発し、その原因として骨髄定着したAML細胞が治療後も残存することが挙げられるが、AML細胞が骨髄定着する分子基盤は明らかでない。本研究で同定した標的候補遺伝子はAML細胞の骨髄定着に重要な役割を果たしている可能性があり、したがって本研究結果は学術的に意義がある。また、これらの遺伝子を標的とした新規治療法を開発することで、治療後のAML残存病変を駆逐し、AML再発や治療抵抗性獲得を克服することが期待できる。さらには同定した遺伝子を特異的な治療標的とすることで、大きな副作用のない再発予防が実現でき、AML患者のQOLを改善することが可能となるため、本研究結果の社会的意義も高い。

研究成果の概要(英文)：Synaptotagmin-like 1 (Syt11, also known as Slp1) was identified as a target gene of Meis1, a transcriptional factor which plays a critical role in AML development. In this project, we attempted to clarify the model that Syt11 regulated the secretion of exosomes, and subsequently promotes the engraftment of AML cells into the bone marrow. However, the experiment using Slp1-knock out mouse revealed that the function of Syt11 in the engraftment of AML cells was limited in non-Meis1 associated AML. Therefore, to identify the critical factor for the AML cell engraftment, we performed a whole-genome lentiviral shRNA screening followed by the second screening using custom made sgRNA libraries. Finally, we identified 37 candidate genes that could be associated with the engraftment of AML cells.

研究分野：血液内科学

キーワード：急性骨髄性白血病(AML) 骨髄生着 Hoxa9 Meis1 Syt11 shRNAスクリーニング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病 (Acute myeloid leukemia, AML) の治療成績は徐々に向上してきており、最近では抗がん剤を組み合わせた標準的化学療法により成人 AML の 80% 近くで完全寛解が得られるようになった (Blood. 117, 2358-65, 2011)。一方で、AML の再発抑制効果が最も強い造血幹細胞移植が一般診療として広く普及してきているにも関わらず、その再発率はいまだに高く、全生存率は 30-40% 程度にとどまっている (Blood. 117, 2366-72, 2011)。

近年、白血病研究において骨髄微小環境 (niche: ニッチ) が注目され、白血病細胞が骨髄ニッチへ潜むことで化学療法から逃れ、最終的に再発に至るモデルが提唱されている。しかし骨髄ニッチは様々な組織から構成されているため、骨髄ニッチ特異的な新規治療法の開発は進んでいない。私が所属する研究室では、これまでに AML 関連遺伝子である Meis1 の標的として、細胞内小胞や膜受容体の輸送に関わる遺伝子である Syt11 を同定し、さらに白血病細胞内で Syt11 が Rab27b と結合して白血病細胞の運動性や骨髄ニッチとの相互作用を強め、骨髄定着を促進することを明らかにした (J Clin Invest. 126, 1664-78, 2016)。Syt11 結合蛋白質の Rab27b がエクソソーム分泌を制御していることから、Syt11 が Rab27b と協調して白血病細胞内の小胞輸送を亢進させ、さらに細胞外へエクソソームとして分泌することで骨髄ニッチを定着しやすいうように教育し、骨髄定着を促進しているというモデルを着想した。以上よりこのモデルを明らかにすることで、白血病細胞が骨髄へ定着する分子基盤を解明できると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、白血病細胞が骨髄へ定着する詳細な分子基盤を明らかにすることを目的としている。これにより、AML の特異的な治療標的を同定することが可能となり、将来的には、同定した治療標的に対する新規治療法を開発することで、治療後の AML 残存病変を駆逐し、AML 再発や治療抵抗性獲得を克服することが期待できる。

3. 研究の方法

(1) Syt11 が分泌制御するエクソソームが AML 細胞の骨髄生着における役割

Syt11 ノックアウト (KO) マウスの骨髄細胞を Hoxa9 で不死化した Syt11 KO 細胞株と、これに Syt11 遺伝子を再導入した Syt11 過剰発現細胞株をそれぞれ樹立し、超遠心法を用いてエクソソーム分画を抽出し、エクソソームマーカーである Alix、CD9、CD63、CD81 を指標にウエスタンブロット法を用いて確認した。

NUP98-HOXA9 と Flt3 ITD を Syt11KO マウス骨髄細胞に導入し、ここに Syt11 遺伝子を再導入することで Syt11 KO、および過剰発現 AML 細胞株を樹立し、Meis1 非関連 AML 細胞の骨髄定着にも Syt11 が必須かどうかを検討した。まず *in vitro* の実験として、これらの細胞を間質細胞株 OP9 と共培養し、Syt11 を KO することで、Cobblestone area forming cell (CAFC) 形成が阻害されるかを解析した。次に *in vivo* の実験として、これらの細胞を C57BL/6J マウスに移植し、移植後の骨髄中 AML 細胞の割合に変化が見られるかを検討した。

(2) AML 細胞の骨髄定着に必須となる遺伝子の同定

AML 関連遺伝子である Hoxa9/Meis1 の上流にある白血病原因遺伝子である MLL/ENL 融合遺伝子を発現する AML 細胞株を樹立した。具体的には MLL/ENL 融合遺伝子の導入によりマウス AML を発症させ、発症した AML 細胞を連続移植することで確実にマウス骨髄へ定着する AML 細胞株を樹立した。この MLL/ENL AML 細胞株と、研究室で以前に樹立された Hoxa9/Meis1 を発現する AML 細胞株 (H9M1 細胞) を用いて全遺伝子に対する shRNA スクリーニングを行なった。まず、これらの細胞に shRNA ライブラリーを、レンチウイルスを用いて感染させ、ピューロマイシンを添加した培地で 10 日間の培養を行い、選択された細胞より input DNA を抽出した。次にこれらの細胞を C57BL/6J マウスへ移植し、移植 2 週間後にマウス骨髄より生着した AML 細胞を採取し、この細胞から output DNA を抽出した。この input DNA と output DNA を次世代シーケンサーにより解析し、output でカウントが低下する shRNA を標的遺伝子として同定した。さらに shRNA スクリーニングで同定した遺伝子候補に対する sgRNA ライブラリーを作成し、これを用いてセカンドスクリーニングを実施した。sgRNA スクリーニングも shRNA スクリーニングと同様の系で行ったが、移植 2 週間後のマウス骨髄ではカウントされた sgRNA のばらつきが大きかったため、移植 1 週間後のマウス骨髄を用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1) Syt11 が分泌制御するエクソソームが AML 細胞の骨髄生着における役割

まず Syt11 過剰発現細胞株から超遠心法を用いてエクソソーム分画を抽出し、Alix、CD9、CD63、CD81 の発現を確認した。いずれのマーカーも抽出したエクソソーム分画で陽性となり、Syt11 過剰発現細胞株がエクソソームを分泌していることがわかった。

次に Meis1 非関連 AML 細胞の骨髄定着にも Syt11 が必須であることを明らかにする目的で、NUP98-HOXA9-Flt3 ITD-Syt11KO AML 細胞株と Syt11 過剰発現 AML 細胞株を用いて、OP9 細胞との共培養実験を行った。Syt11 KO AML 細胞株では CAFC 形成が阻害され、Syt11 が Meis1 非関連 AML 細胞の骨髄定着にも作用することが示唆された。一方、これらの細胞を C57BL/6J マウスに移植したところ、移植後 48 時間の骨髄中 AML 細胞の割合に差は認めず、移植 2 週間後にはいずれのマウスも AML を発症した。以上から Syt11 は Meis1 非関連 AML 細胞の骨髄定着に一定の役

割を担っているものの、必須の因子ではないと考えられた。

(2) AML 細胞の骨髄定着に必須となる遺伝子の同定

上記のように Syt11 ノックアウトマウスを用いた実験により、Syt11 は Meis1 非関連 AML 細胞において、必須の因子ではないことがわかった。そこで全遺伝子に対する shRNA スクリーニングを用い、AML 細胞の骨髄定着に必須な因子の探索を開始した。H9M1 細胞と MLL/ENL AML 細胞株の両方で移植後に重複して shRNA が低下してくる遺伝子を抽出し、最終的に候補遺伝子として 517 遺伝子を同定した。また生着した骨髄細胞中での shRNA 低下率と重複数をもとにスコアリングを行い、さらにそこから AML 関連遺伝子を探索し、NSD1(Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 1)をピックアップした。しかし NSD1 に対する shRNA を作成し、H9M1 細胞を用いて NSD1 ノックダウン細胞株を樹立し、これらの細胞を C57BL/6J マウスへ移植し、移植 2 週間後の骨髄中の AML 細胞の比率を解析することで、スクリーニングの結果を検証したが、骨髄生着率に大きな差は見られなかった。

そこでセカンドスクリーニングとして shRNA スクリーニングで同定した遺伝子候補に対する sgRNA スクリーニングを行うこととした。なおここでは遺伝子候補の条件を緩め、1392 遺伝子を対象とする sgRNA ライブラリーを作成した。sgRNA 低下率と重複数を元に遺伝子の絞り込みを行い、最終的に 37 遺伝子を標的候補として同定した。今後はこれらの遺伝子に対する sgRNA を作成し、H9M1 細胞を用いて標的遺伝子のノックアウト細胞株を樹立し、これらの生着が阻害されることを確認した後、さらに詳細な分子基盤を検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Araki M, Yang Y, Imai M, Mizukami Y, Kihara Y, Sunami Y, Masubuchi N, Edahiro Y, Hironaka Y, Osaga S, Ohsaka A, Komatsu N.	4. 巻 33
2. 論文標題 Homomultimerization of mutant calreticulin is a prerequisite for MPL binding and activation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 122-131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41375-018-0181-2.	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9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 角南義孝、芳野聖子、横山隆志、中村卓郎
2. 発表標題 BCL11AによるPU.1機能阻害
3. 学会等名 第24回 造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 角南義孝、中村卓郎
2. 発表標題 Bcl11aはPU.1の転写活性阻害を介してAMLの発症、悪性を促進する
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sunami Y, Yoshino S, Yokoyama T, Nakamura T.
2. 発表標題 Bcl11a promotes AML development and progression through the abrogation of PU.1 activity
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sunami Y, Yoshino S, Yokoyama T, Nakamura T.
2. 発表標題 Bcl11a promotes AML development and progression through the abrogation of PU.1 activity
3. 学会等名 FASEB Hematologic Malignancies Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sunami Y, Yoshino S, Yokoyama T, Nakamura T.
2. 発表標題 Bcl11a promotes AML development through the abrogation of PU.1 activity.
3. 学会等名 11th AACR-JCA Joint Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角南義孝, 中村卓郎
2. 発表標題 Bcl11aによるAML発症、悪性化機序の解明
3. 学会等名 第23回 造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sunami Y, Araki M, Yamamoto S, Horiuchi Y, Tsujioka K, Mogushi K, Imai M, Morishita S, Ohsaka A, Komatsu N.
2. 発表標題 Gene expression profiles in ATRA-induced granulocytic differentiation.
3. 学会等名 第80回 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sunami Y, Yoshino S, Yokoyama T, Nakamura T.
2. 発表標題 Bcl11a promotes Trib1-induced myeloid leukemia development.
3. 学会等名 第77回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 角南義孝, 芳野聖子, 横山隆志, 中村卓郎.
2. 発表標題 Bcl11aのAML発症における役割の解明
3. 学会等名 平成30年度若手支援技術講習会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----