

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17829

研究課題名(和文) STAPファミリー蛋白によるBcr-Abl分子活性化機構の解明とその治療的応用

研究課題名(英文) Functional analysis of STAP family proteins in CML

研究代表者

戸田 淳 (Jun, Toda)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90770834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：STAP-1の発現の解析では、ヒトCML幹細胞では正常の造血幹細胞より更に発現が上昇することが分かった。次に、CMLモデルマウスを用いた実験ではSTAP-1をノックアウトさせることでCML幹細胞のアポトーシスが亢進し、CMLマウスの生存を有意に延長させることが分かった。さらにSTAP-1が転写因子STAT5のリン酸化を亢進させ、その結果、抗アポトーシス分子であるBcl-2やBcl-xLの発現を減少させることでCML幹細胞のアポトーシスに関わっていることを見出した。最後にCML細胞株でもSTAP-1を欠損させることで既存治療薬との相乗効果を認めることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回のSTAP-1を介したシグナル伝達の解明はCML幹細胞をターゲットとした治療の開発において、大きな意義があると考えられた。また、STAP-1そのものも、正常造血への影響が少ないと考えられるため、副作用の少ない、新たな治療標的として用いられることが期待される。

研究成果の概要(英文)：First, I found that STAP-1 expression was up-regulated in human CML stem cells compared to normal stem cells.

Next, we conducted experiments in mice. Analysis of STAP-1 deficient CML mice revealed a significant decrease in the number of CML stem cells, and annexin staining revealed enhanced apoptosis in STAP-1 deficient CML stem cells, suggesting that STAP-1 contributes to survival by inhibiting apoptosis in CML stem cells.

We also performed RNA sequencing using CML stem cells and found that STAP-1 is involved in the phosphorylation of STAT5, which in turn regulates the expression of anti-apoptotic factors such as Bcl-2 and Bcl-xL. These data indicate that STAP-1 is an important molecule for the maintenance of CML stem cells. In this study, STAP-1-mediated signaling was newly identified as one of the therapeutic targets for stem cell targeting.

研究分野：白血病

キーワード：慢性骨髄性白血病 白血病幹細胞 STAP-1 アダプター蛋白

1. 研究開始当初の背景

Signal transducing adaptor proteins(STAP)ファミリー蛋白はリン脂質結合モチーフであるPleckstrin homology (PH)ドメイン、リン酸化チロシンとの親和性が知られる Src homology2(SH2)ドメインに類似した構造を有するアダプター蛋白であり、ファミリーとしてSTAP-1、STAP-2が含まれる。STAP-2はこれまで細胞内シグナルを制御しリンパ球増殖やサイトカイン産生を調整していることが知られている。これまで我々のグループはSTAP-2がCMLの原因遺伝子であるBCR-ABL融合蛋白とSH2ドメインを介して結合し、BCR-ABLをリン酸化させ、下流シグナルのリン酸化を促進させ、CML細胞の増殖を促進させることを細胞株を用いた実験で報告している。STAP-1については機能解析がほとんど行われておらず、詳細な働きは不明であるが、CML患者の幹細胞分画で発現が上昇することが二つの gene expression database で示されている。

2. 研究の目的

私は、STAP-1がCMLで特に幹細胞分画において役割があるのではないかと仮説を立て、本研究ではSTAP-1がCMLの病態形成に果たす役割をin vivoで解析を行った。本研究では、CMLモデルマウスおよびヒトCML細胞を用い、STAP蛋白がCMLの病態に及ぼす影響とそのメカニズムの解明を目的とした。この検討により、STAP蛋白を標的とした薬剤開発などの臨床応用への発展の土台を作ることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

CMLモデルマウスを用いてin vivoでのSTAP-1の機能解析を行った。CMLモデルマウスはレトロウイルスを用いた骨髄移植モデルで行った。

4. 研究成果

まず初めに免疫沈降法を用いて、STAP-1とBCR-ABLが直接結合することを示した(図1A)。野生型CMLマウスとSTAP-1 knock-out (KO) CMLマウスを作成した(図1B)。モデルマウスを用いた実験ではSTAP-1 KO CMLマウスは野生型CMLマウスと比較し、優位に生存が延長することが分かった(図1C)。STAP-1KO CMLマウスでは有意に末梢血腫瘍細胞の減少と脾腫の軽減を認めた(図1D, E)。さらに骨髄を解析するとSTAP-1 KO CMLマウスでは野生型CMLマウスに比べ、優位にCML幹細胞分画が減少することが分かった(図1F)。そのため、CMLマウスからCML幹細胞をソートし、数をそろえて二次移植を行った。すると一次移植と同様にSTAP-1KO CMLマウスでは有意に生存が延長することが分かった(図1C)。以上からSTAP-1KO CML幹細胞分画ではCML幹細胞の leukemia initiating potentialが減弱することが分かった。

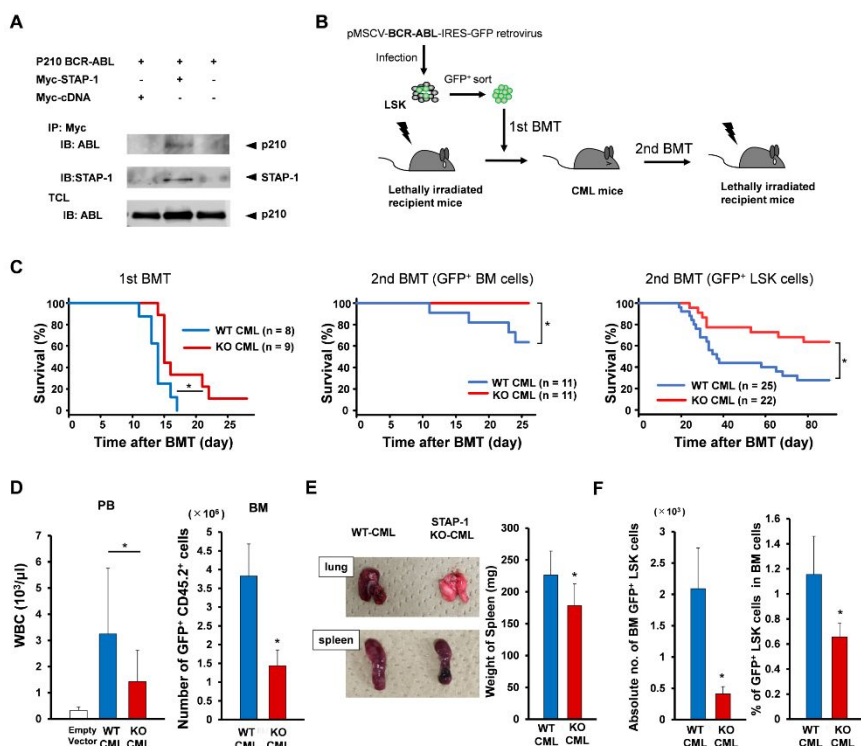


図 1.

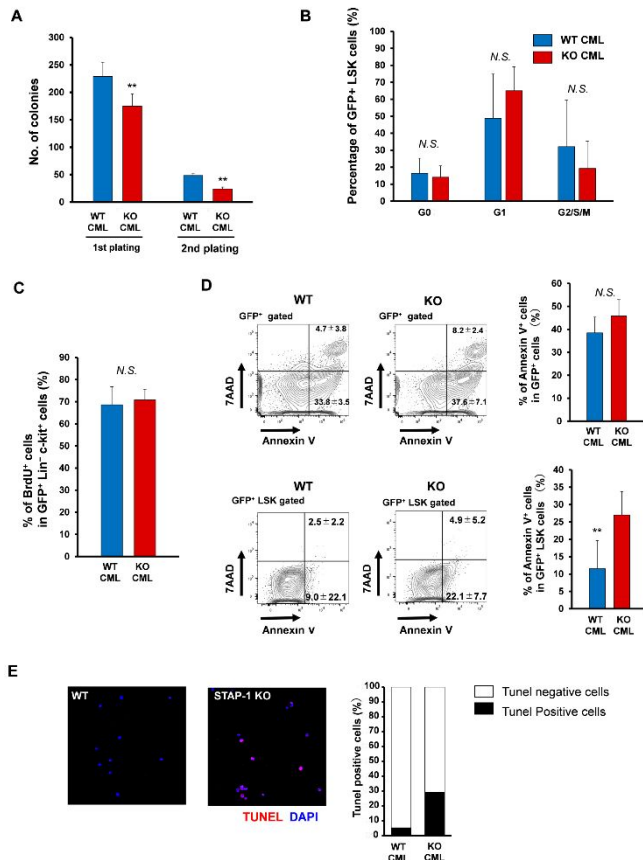


図 2.

次に CML 幹細胞分画の解析を行うと Brdu、Ki-67 を用いた細胞周期解析では両群で違いを認めなかったが (図 2B,C)、AnexinV、TUNEL 染色を用いた解析にて STAP-1KO CML 幹細胞にてアポトーシスが亢進することが分かった (図 2D, E)。

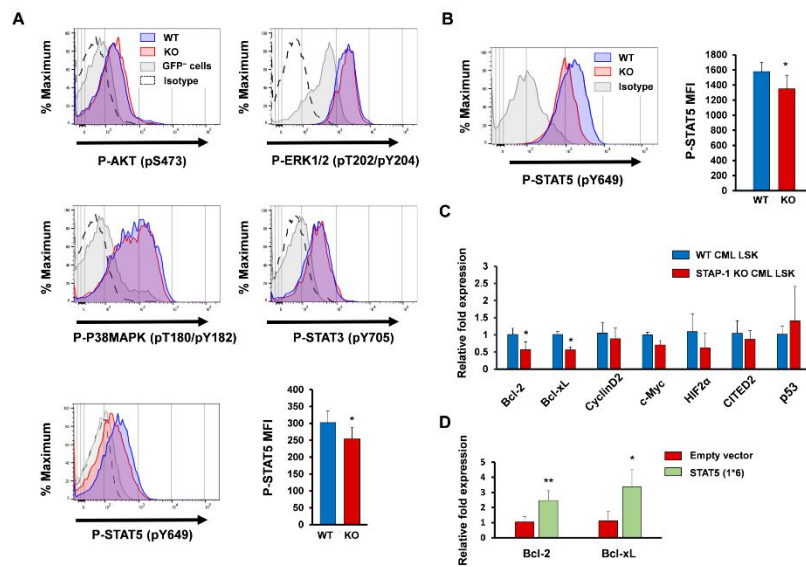


図 3.

リン酸化の解析を行った所、CML 幹細胞分画において STAP-1 欠損により STAT5 のリン酸化が減弱することで抗アポトーシス遺伝子である Bcl-2、Bcl-xL のダウンレギュレーションを引き起こし、アポトーシスの亢進を引き起こすことが分かった (図 3A-D)。興味深いことに、トランスクリプトーム解析では、STAP-1 は BCR-ABL、JAK2、および PPAR γ に関連するいくつかの

シグナル伝達経路に影響を及ぼすことが示された。このアダプター蛋白質は、BCR-ABL だけでなく、STAT5 にも直接結合しており、細胞株を用いた実験では STAP-1 阻害と BCR-ABL または JAK2 チロシンキナーゼ阻害の相乗効果を示した。以上の結果から、STAP-1 は CML 幹細胞の制御因子として同定され、CML の治療標的となる可能性が示唆された。

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 1件）

1. 著者名 Toda Jun, Ichii Michiko, Oritani Kenji, Shibayama Hirohiko, Tanimura Akira, Saito Hideaki, Yokota Takafumi, Motooka Daisuke, Okuzaki Daisuke, Kitai Yuichi, Muromoto Ryuta, Kashiwakura Jun-ichi, Matsuda Tadashi, Hosen Naoki, Kanakura Yuzuru	4. 巻 39
2. 論文標題 Signal-transducing adapter protein-1 is required for maintenance of leukemic stem cells in CML	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 5601 ~ 5615
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-020-01387-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Jun Toda, Michiko Ichii, Kenji Oritani, Hideaki Saito, Yuichi Kitai, Ryuta Muromoto, Jun-ichi Kashiwakura, Kodai Saitoh, Tadashi Matsuda, Yuzuru Kanakura
2. 発表標題 STAP-1 is Required for Maintenance of Leukemic Stem Cells in Chronic Myeloid Leukemia.
3. 学会等名 JSH international symposium 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jun Toda, Michiko Ich, Hirohiko Shibayama, Hideaki Saito, Tadashi Matsuda, Kenji Oritani, and Yuzuru Kanakura
2. 発表標題 Therapeutic potential of the signal-transducing adaptor protein-1 (STAP-1) inhibition for CML treatment
3. 学会等名 日本血液学会 2019
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------