

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591134

研究課題名（和文） 白血病幹細胞に特異的に発現する miRNA/転写因子の同定とその機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of miRNA/transcription factors highly expressed in leukemia stem cells

研究代表者

竹中 克斗 (TAKENAKA KATSUTO)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：30301295

研究成果の概要（和文）：

急性骨髄性白血病の治療成績向上のためには、疾患の根源となっている白血病幹細胞の根絶が不可欠である。本研究課題で我々の同定した正常造血幹細胞、白血病幹細胞に特異的に発現する miRNA を含む遺伝子群は、白血病幹細胞の増殖・維持に不可欠な遺伝子群であるとともに、急性骨髄性白血病の予後不良因子であり、新たな分子標的療法の治療標的候補として有望である。

研究成果の概要（英文）：

Normal hematopoiesis and acute myeloid leukemia are organized as hierarchies with stem cells, which possess extensive self-renewal and proliferative capacity. We identified a core transcriptional program shared by normal and leukemia stem cells, revealing the molecular machinery underlying stemness properties. Biological determinants of stemness influence clinical outcome of leukemia, and are potential targets for novel therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度			
2012年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：白血病幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 腫瘍組織には、正常は組織間細胞と同様な性質を持ったごく少数のがん幹細胞が存在しており、この異常な幹細胞が自己複製を行いながら腫瘍を形成していると考えられ

ている。この概念は、造血系腫瘍において、マウスへの異種移植実験によってヒト急性骨髄性白血病(AML)を再構築可能な“AML幹細胞”として、はじめて同定された。AML幹細胞は化学療法抵抗性でAML治療の最終

目標は、AML 幹細胞根絶にあるといえる。AML が正常造血幹細胞(HSC)の制御機構の破綻によって生じると考えるならば、HSC と AML 幹細胞の遺伝子発現プロファイルと比較することにより、AML 幹細胞の維持・制御に重要な転写因子・表面抗原・miRNA の推定が可能であると考えられる。

(2) 我々は、ヒト臍帯血より分離した正常 HSC(CD34+CD38- 分画)、造血前駆細胞(CD34+CD38+分画)を用いて DNA マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルの解析を行い、造血幹細胞に高発現する遺伝子群 225 個を同定した。さらに、我々は、10664 個のタンパクを含むタンパク相互作用データベースを構築し、これを用いて、マイクロアレイで同定した遺伝子群のタンパクの相互作用を解析した。この解析により、225 個のうち 35 個の遺伝子群によってコードされるタンパクがデータベース上の 268 個のタンパクとひとつの大きなクラスターを形成していることが明らかになり、このクラスターは生物学的に意義のある集団であることが強く示唆された。さらに、我々は、microRNA(miRNA)アレイを用いて、白血病幹細胞の miRNA の網羅的発現解析を行った。miRNA は、21-25 塩基よりなる非翻訳 RNA で、標的 mRNA を配列特異的に切断し、その結果遺伝子発現を負に制御する新しい RNA 群である。AML 検体より分離した CD34+CD38- 分画、CD34+CD38+分画を用いて解析を行い、アレイ上に配置された数百種類の miRNA のうち、白血病幹細胞分画に特徴的な miRNA 群が存在することを見出した。これらのうち、複数の miRNA はマイクロアレイを用いて同定した上記正常造血幹細胞遺伝子群 225 個と重複することを見出した。

(3) これまで、AML の網羅的遺伝子発現プロファイル解析では、bulk の AML 細胞を用いたマイクロアレイによる解析が報告されているが、幹細胞分画に純化した細胞で、HSC と AML を比較した報告はない。治療の最終目標は、AML 幹細胞の根絶にあり、より純化した AML 幹細胞分画の遺伝子発現を解析することが、新規分子標的療法の標的分子の同定に不可欠であると考えられ、我々の正常 HSC と AML 幹細胞分画の比較による治療標的の検索はきわめて有効な方法と考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) 上記の背景のもと、AML 検体より幹細胞分画を FACS ソーティングにて分画し、正常造血幹細胞の解析で同定された 35 個の遺伝子の発現を定量的 PCR にて検討する。これらの解析により白血病幹細胞分画に特異的に発現する転写因子を見いだすことが第一段階である。前述のように miRNA はすでに

選出済みである。第二段階としては、これらの転写因子・miRNA が実際にどのように幹細胞機能に寄与しているかを検討するために、特定の遺伝子を幹細胞に強制発現あるいはノックダウンさせるレンチウイルスベクターを用いた遺伝子発現系を用いて、増殖・分化能の機能的変化を検討する。これらの検討から、白血病幹細胞の機能維持に重要な転写因子・miRNA を見出すことを目的とする。(2) また、白血病幹細胞に特異的に発現する遺伝子群の臨床的重要性について解析し、治療標的としての有効性について検討する。

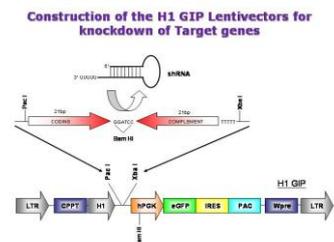
## 3. 研究の方法

(1) 定量 PCR による AML 幹細胞の遺伝子発現の解析

AML 検体より、FACS ソーティングにて、CD34+CD38- 分画(幹細胞分画)および CD34+CD38+分画(前駆細胞分画)を分離し、定量的 PCR による遺伝子発現解析を行う。標的遺伝子は、DNA マイクロアレイおよびタンパク相互作用ネットワーク解析によって同定された正常造血幹細胞遺伝子 35 個である。この解析により白血病幹細胞分画に特異的に発現する転写因子/miRNA を見出す。

(2) 遺伝子組み換えレンチウイルスベクターの作成

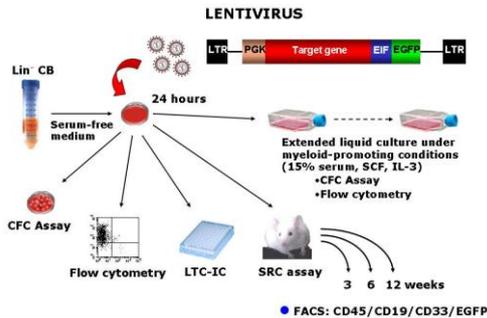
選出した転写因子/miRNA を造血幹細胞に持続的に強制発現あるいはノックダウンするために、遺伝子組み換えレンチウイルスベクターを作製する。強制発現には、標的遺伝子をクローニングし、レンチウイルスベクターのクローニングサイトに組み込む。ノックダウンには、H1 プロモーターを含む RNAi レンチウイルスベクターに、設計した siRNA を組み込む(下図)



(3) 正常・白血病幹細胞への遺伝子導入による機能変化の検討

ヒト臍帯血・保存急性骨髄性白血病検体より FACS ソーティングによって、幹細胞分画である CD34 陽性 CD38 陰性分画を分離し、上述の遺伝子組み換えレンチウイルスベクター、あるいは RNAi レンチウイルスベクターにて遺伝子導入を行う。強制発現あるいはノックダウンによって、自己複製能・増殖能の亢進などが見られるか、あるいは逆に発現の抑制によって、増殖能の低下や分化誘導などがみられるかを、FACS による表面マーカーの経時的解析、コロニー形成能の検討、長期

培養による LTC-IC (long-term culture initiating cell)の検討, NOD/SCID マウスを用いた幹細胞の in vivo アッセイ以下によって検討する. このような解析によって, 機能的に白血病幹細胞の維持に必須な遺伝子・miRNA を同定する.



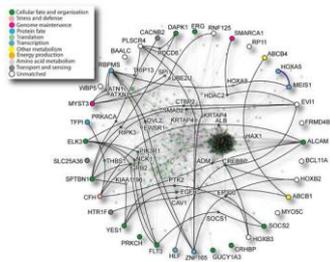
#### (4) HSC/AML 幹細胞遺伝子プロファイルの臨床的意義についての検討

Gene Set Enrichment Analysis による解析で, 正常 HSC/AML 幹細胞に共発現する 44 遺伝子を同定したが, 我々の構築したタンパク相互作用データベースを用いた検討では, これら遺伝子群は一つの大きなクラスターを形成しており, 機能的に密接に関連していることから, これらは幹細胞の維持・制御に必須の遺伝子群と考えられた. これらの遺伝子群の臨床的意義について検討するために, 独立した正常核型 AML160 例の遺伝子発現プロファイルを入手した. 遺伝子発現プロファイルと予後との相関について解析を行う,

#### 4. 研究成果

##### (1) AML 幹細胞を制御する miRNA-126

これまでの解析から, 高度に純化した正常 HSC と AML 幹細胞の遺伝子発現を比較することによって正常 HSC/AML 幹細胞の維持・制御に重要な 44 遺伝子を同定した. 下図に示すように, 我々の構築したタンパク相互作用データベースを用いて解析すると, これら 44 遺伝子は一つの大きなクラスターを形成し, 機能的に密接に関連していることが明らかとなった.

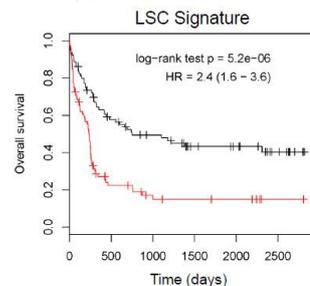


miRNA は, 21-25 塩基よりなる非翻訳 RNA で, 標的 mRNA を配列特異的に切断し, その結果遺伝子発現を負に制御する新しい RNA 群である. AML においても, miRNA 発現の異常は報

告されているが, これまで, AML 幹細胞分画における miRNA の発現の解析や, 白血病幹細胞維持における役割については明らかにされていなかった. 我々は, 上記の解析から, miRNA-126 が AML 幹細胞分画に高発現していることを見出した. 定量 PCR による解析でも, AML 細胞の中でも, 幹細胞活性を持つ細胞分画に miRNA-126 の発現が高いことを確認した. さらに, miRNA-126 の機能を解析するために, レンチウイルスベクターを用いたレポーターシステムを確立した. CD34+CD38- AML 細胞に, miRNA-126 を強制発現させて, in vitro で培養を継続すると, CD34 陽性分画が維持されるとともに, CD14 や CD15 などの分化マーカーが低下し, 免疫不全マウスへの継代移植の結果から, 幹細胞活性は約 13 倍に増幅していた. また, miRNA-126 をノックダウンすると, AML 細胞は分化傾向を示し, 幹細胞活性が低下した. これらの結果から, miRNA-126 は, AML 幹細胞分画に発現し, AML 幹細胞の数の維持や, 分化抑制に寄与していることが明らかになった. miRNA-126 は, AML の分子治療標的として有望であり, miRNA-126 の標的 mRNA を解析中である(論文投稿準備中).

##### (2) HSC/AML 幹細胞遺伝子プロファイルの臨床的意義

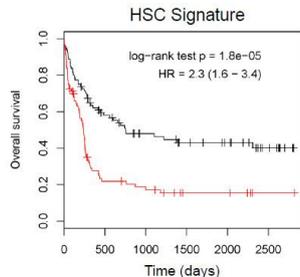
上述のように, 正常 HSC/AML 幹細胞に共発現する 44 遺伝子を同定したが, 我々の構築したタンパク相互作用データベースを用いた解析では, これら遺伝子群は一つの大きなクラスターを形成しており, 機能的に密接に関連していることから, これらは幹細胞の維持・制御に必須の遺伝子群と考えられた. さらに, これらの遺伝子群の臨床的重要性について解析し, 治療標的としての有効性について検討した. 臨床的意義について検討するために, 独立した正常核型 AML160 例の遺伝子発現プロファイルを入手した. 遺伝子発現プロファイルと予後との相関を解析した結果, 我々の同定した白血病幹細胞関連遺伝子群のうち 25 個が, 上述の正常核形 AML 患者の生存における非常に強い予後因子となっていることが明らかとなった. これは, AML 細胞は AML 幹細胞に由来しており, AML の臨床像もまた AML 幹細胞の特徴を反映していることを強く示唆している.



また, 興味深いことに, 正常 HSC に特異的に発現する 225 個の遺伝子群も, 上述の AML に

において、白血病幹細胞関連遺伝子とともに、非常に強い予後不良因子となっていた。

図に示すように、AML 幹細胞や正常 HSC に高発現する遺伝子群と、正常核型 AML の遺伝子プロファイルを比較し、幹細胞関連遺伝子群を高発現する群 (赤線) と、そうでない群 (黒線) では、全生存率に明らかに有意差がみられた。無病生存率についても同様の結果が得られた。



以上から、我々の同定した正常 HSC、AML 幹細胞に特異的に発現する miRNA を含む遺伝子群は、AML の予後不良因子であり、これらの遺伝子群は、新規治療の治療標的として有効であるとの結論に達した (Nat Med 印刷中)。

#### 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] (77 件)

- ①Eppert K, Takenaka K, 以下 17 名. Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. Nat Med (in press).
- ②Kikushige Y, 以下 8 名, 7 番目. TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells. Cell Stem Cell 7:708-717, 2010.
- ③Oku S, Takenaka K, 以下 13 名. JAK2 V617F uses distinct signalling pathways to induce cell proliferation and neutrophil activation. Br J Haematol 150:334-44, 2010.
- ④Mori Y, 以下 13 名, 9 番目. Identification of the human eosinophil lineage-committed progenitor: revision of phenotypic definition of the human common myeloid progenitor. J Exp Med 206:183-93, 2009.
- ⑤Yoshimoto G, 以下 14 名, 10 番目. FLT3-ITD up-regulates MCL-1 to promote survival of stem cells in acute myeloid leukemia via FLT3-ITD-specific STAT5 activation. Blood 114:5034-43, 2009.
- ⑥Shide K, 以下 17 名, 6 番目. Development of ET, primary myelofibrosis and PV in mice expressing JAK2 V617F. Leukemia 22:87-95, 2008.
- ⑦Kikushige Y, 以下 11 名, 8 番目. Human Flt3 is expressed at the hematopoietic stem

cell and the granulocyte/macrophage progenitor stages to maintain cell survival. J Immunol 180:7358-67, 2008.

[学会発表] (計 8 件)

- ①Lechman E, et al. Enriched microRNA-126 bioactivity marks the primitive compartment in AML and regulates LSC numbers. 第 52 回米国血液学会, 2010 年 12 月 5 日, オーランド, 米国.
- ②Urata S, et al. A new immunodeficient mouse model introduced with defined Sirpa polymorphism for human hematopoietic stem cell assay. 第 39 回国際血液・幹細胞学会 (ISEH), 2010 年 9 月 16 日, メルボルン, オーストラリア.
- ③Shide K, et al. Prognostic impact of cytogenetic abnormalities in primary myelofibrosis: prospective survey in Japan. 第 72 回日本血液学会学術集会, 2010 年 9 月 26 日, 横浜.
- ④Eppert K, et al. Leukemic and Normal Stem Cell Transcriptional Signatures Determined by Functional Assays Are Predictive of the Overall Survival of AML Patients. 第 51 回米国血液学会, 2009 年 12 月 7 日, ニューオーリンズ, 米国.
- ⑤Oku S, et al. JAK2V617F mutation selectively exerts the STAT3 pathway for enhancing a neutrophil activation marker. 第 51 回米国血液学会, 2009 年 12 月 5 日, ニューオーリンズ, 米国.
- ⑥Kuriyama T, et al. Human SIRPA polymorphism modulates macrophage-mediated suppression of human hematopoiesis. 第 71 回日本血液学会学術集会, 2009 年 10 月 23 日, 京都.
- ⑦Lechman E, et al. High levels of microRNA-126 bioactivity specify the LSC compartment in AML. 第 50 回米国血液学会, 2008 年 12 月 9 日, サンフランシスコ, 米国.
- ⑧Kuriyama T, et al. Human SIRPA polymorphism modulates macrophage-mediated suppression of human hematopoiesis. 第 50 回米国血液学会, 2008 年 12 月 8 日, サンフランシスコ, 米国.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: LSC and HSC signatures for predicting survival of patients having hematological cancer.

発明者: Dick JE, 他 9 名

権利者: Dick JE, 他 9 名

種類: 特許

番号：US61/266,704  
出願年月日：2009年12月4日  
国内外の別：国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹中 克斗 (TAKENAKA KATSUTO)  
九州大学病院・血液・腫瘍内科・助教  
研究者番号：30301295

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：