

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月21日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591355

研究課題名（和文）急性骨髄性白血病におけるNotch1シグナルの検討：新たな分化誘導療法をめざして

研究課題名（英文）Analysis of the role of the Notch1 signaling in the onset of acute myeloid leukemia: aiming to establish a new differentiation-inducing therapy.

研究代表者

中村 誠（NAKAMURA MAKOTO）

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・医学研究員

研究者番号：10422685

研究成果の概要（和文）：

Notch1シグナルの活性化は、転写共役因子MAML1を介した系で転写因子PU.1の発現を抑制し顆粒球系前駆細胞の分化を抑制することを明らかにした。さらに、分化が誘導される培養条件でも、Notch1シグナルが活性化された細胞の一部は未分化な形態を維持し、増殖能を保持していたことから、Notch1シグナルの逸脱した活性化が顆粒球系前駆細胞の白血病化や白血病の維持に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Our data indicate that Notch1 signaling activation suppresses PU.1 expression and granulocytic differentiation through a pathway involving MAML1, and maintains a part of myeloid progenitor cells at the immature stage. Therefore, it suggests that aberrant Notch1 signaling could support the granulocytic transformation and the maintenance of the malignant phenotype.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：Notch1シグナル・顆粒球分化・急性骨髄性白血病

## 1. 研究開始当初の背景

近年、急性白血病の発生や進展の機序が分子レベルで解明されつつあり、より安全で効果的な治療法への応用が期待されている。これまで、Notch1シグナルについては造血幹細胞の未分化性の維持や各前駆細胞への運命決定に関する役割が明らかにされるなど、主に発生学的な見地からその働きが解明されて

きた。変異によるNotch1シグナルの増強が急性T細胞性白血病の発生や維持に密接に関与することが2004年に報告されてから

(Science 306; 269, 2004)、Notch1シグナルと白血病との関わりについて注目を集めていた。

我々は、それまで主にリンパ球の発生におけるNotch1シグナル、特にMAML1の役割につ

いて研究を進めてきた (Blood 110; 3618, 2007、Embo J 24; 2391, 2005、Gene 328; 153, 2004)。一方、顆粒球・単球系細胞の分化・成熟におけるNotch1シグナルの役割について2000年頃から複数のグループにより報告されているが、同シグナルが分化を抑制すると報告するグループがある一方で分化を促進すると主張するグループもあり、多角的で詳細な検討が求められていた。

急性骨髄性白血病 (FAB 分類: M0 - M7) の約 8 割の症例では (FAB 分類: M0 - M4)、腫瘍細胞が分化段階初期の顆粒球系細胞に由来し、未分化性と高い増殖能を維持している。我々の研究室で樹立された小児急性骨髄性白血病 (FAB 分類: M0 - M4) 由来の 7 細胞株について検討したところ、全細胞株で Notch 1 受容体の高発現が確認され (2005 年、日本血液学会・臨床血液学会総会で報告)、一部の急性骨髄性白血病細胞では、Notch 1 シグナルの増強が未分化性や高い増殖能の維持に寄与している可能性が示唆された。

したがって、正常顆粒球系前駆細胞の分化や増殖における Notch1 シグナルの役割を詳細に検討し、さらに、こうした調節機構の破綻が急性骨髄性白血病由来の細胞に存在するかどうか検討していく必要があると思われた。

## 2. 研究の目的

(1) 顆粒球系前駆細胞に遺伝子導入して Notch 1 シグナルを活性化あるいは不活化し、増殖能や分化に与える影響を観察する。さらに、顆粒球分化に関わる転写因子 PU. 1、C/EBP alpha、GATA 2 等の発現が、Notch 1 シグナルにどのように影響されるかを観察する。

(2) 次に、急性骨髄性白血病由来の細胞株と患者検体について、Notch 1、GATA 2、PU. 1、C/EBP alpha の発現量と遺伝子変異の有無を検討する。我々が以前に報告したように、Notch 1 が高発現している細胞では、Notch 1 シグナルの活性化が同細胞の未分化性や増殖能の維持に寄与していると想定される。そこで、こうしたいわば“Notch 1 シグナル依存型急性骨髄性白血病”の一群を抽出し、すでに我々が所有しているドミナントネガティブ MAML 1 を導入して Notch 1 シグナルを阻害し、増殖や分化に与える影響を解析する。

本研究は、正常顆粒球系前駆細胞の解析の結果をふまえて急性骨髄性白血病細胞における Notch 1 シグナルの役割を明らかにし、同シグナルの阻害による治療的効果を検討するものである。Notch 1 シグナルは細胞の分化に関わる主要な調節機構であり、本研究の成果は、急性骨髄性白血病細胞の未分化性を標

的とする新たな分化誘導療法の確立につながると期待される。

## 3. 研究の方法

(1) Notch1 シグナルの活性化因子 ICN1、あるいは不活化因子 DNAMML1 (MAML1 のドミナントネガティブ) を顆粒球系前駆細胞 32D と HL60 にレトロウイルスベクターを用いて導入したのち G-CSF (32D) と ATRA (HL60) を用いて成熟顆粒球への分化を誘導する。我々の用いたウイルスベクターの優位性は、遺伝子の導入効率が 2 割から 6 割と高く分化の誘導に先立ち遺伝子導入細胞を抽出し増殖させる必要がないこと、マーカー遺伝子 GFP を目的遺伝子と同時に発現するため、導入細胞と非導入細胞を混合して分化を誘導した後、GFP の発現を指標にして遺伝子導入細胞と非導入細胞をフローサイトメトリー法上で区別し、個々の表現形を解析できることの二点である。

(2) 正常顆粒球系前駆細胞 32D に、ICN1 の発現ベクターあるいはコントロールベクターをエレクトロポレーション法で導入した後、それぞれの細胞集団に DNAMML1 を発現するレトロウイルスベクターあるいはコントロールのレトロウイルスベクターを感染させ、遺伝子の導入にされた細胞 (GFP 陽性) をセルソーティングで純化する。

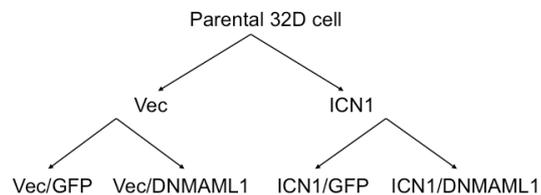


図 1 遺伝子導入の流れ

得られた 4 種類の細胞群 (Vec/GFP; コントロール、Vec/DNAMML1; 内在性の Notch1 シグナルが阻害されている、ICN1/GFP; Notch1 シグナルが活性化されている、ICN1/DNAMML1; 活性化された Notch1 シグナルがその下流で阻害されている) の分化を誘導し、分化の進行度、生細胞の比率、細胞周期、PU. 1、C/EBP alpha、GATA 2 など転写因子の発現などを経時的に検討し比較する。

## 4. 研究成果

(1) 顆粒球系前駆細胞 32D と HL60 について、Notch1 シグナルの活性化因子 ICN1、あるいは不活化因子 DNAMML1 の導入細胞 (GFP 陽性) と非導入細胞 (GFP 陰性) の成熟顆粒球への分化の進行度を、分化マーカー CD11b の発現

を指標にして比較した。CD11b の発現量はフローサイトメトリー法で測定し、Day 0 と Day 8 (32D) あるいは Day 0 と Day 3 (HL60) の発現量の比較から適当な境界値を決め、境界値以上の発現量を示すものを分化した細胞、境界値以下の発現量を示すものを未分化な細胞と判定した。

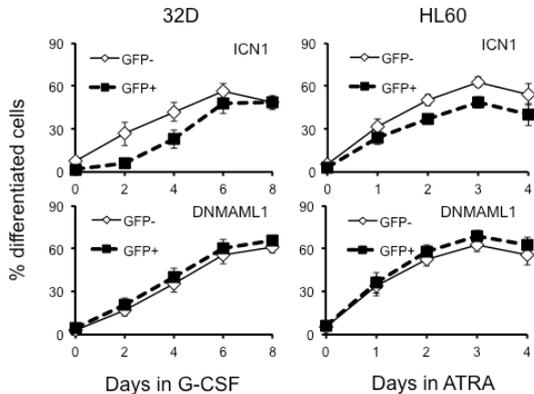


図2 フローサイトメトリー法による CD11b 陽性細胞 (分化細胞) の割合の比較

図2に示すように、32D と HL60 の両方で、分化した細胞の割合が、ICN1 非導入細胞に比べ ICN1 導入細胞で有意に低かったが、DNAML1 の導入細胞と非導入細胞との間に有意差は認められなかった。すなわち、Notch1 シグナルの活性化は顆粒球系前駆細胞の分化を抑制あるいは遅延させるが、内在性の Notch1 シグナルは顆粒球分化に関与しないことが示唆された。

(2) 32D 細胞に遺伝子導入して得られた4種類の細胞群 Vec/GFP、Vec/DNAML1、ICN1/GFP、ICN1/DNAML1 の分化を誘導し、経時的に分化の進行度、生細胞の数、細胞周期を検討し比較した。

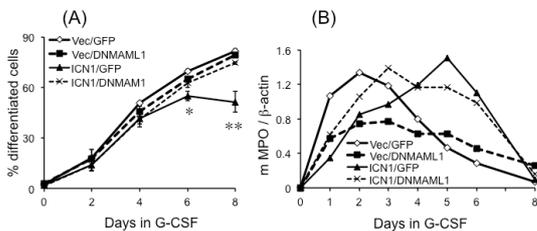


図3 分化の進行度の比較

(1) の方法と同様に、フローサイトメトリー法で測定した CD11b の発現量をもとに分化した細胞の割合を算出し比較したところ (図3A)、ICN1/GFP 細胞における割合は、他の3群に比べ Day 6 と Day 8 で有意に低かった。顆粒球分化の初期に発現量が最大となるミエロペロキシダーゼの RNA の発現量をリアルタイム PCR 法で経時的に測定し比較したところ

(図3B)、Vec/GFP 細胞と Vec/DNAML1 細胞の発現のピークが Day 2 であったのに対し、ICN1/GFP 細胞の発現のピークは Day 5 と遅延していた。また、ICN1/DNAML1 細胞の発現のピークは Day 3 であった。すなわち、この実験系でも Notch1 シグナルの活性化が顆粒球系前駆細胞の分化を抑制あるいは遅延させることが示された。さらに、Notch1 シグナルの活性化による表現形が DNAML1 の働きにより消失したことから、ICN1 が MAML1 を介する機序で分化を抑制することが示された。また、DNAML1 単独では分化に影響を与えなかったことから、内在性の Notch1 シグナルは顆粒球分化に関与しないことが示唆された。

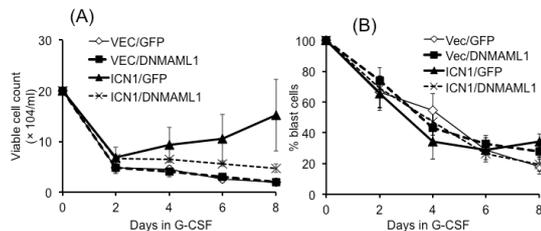


図4 生細胞と未分化細胞の比較

つづいて、生細胞の数をトリパンブルー色素排除試験法で経時的に測定し4群間で比較したところ、Day 2 以降 ICN1/GFP の生細胞数は増加傾向を示した (図4A)。さらに、生細胞に含まれる未分化細胞の割合を顕微鏡下で計測したところ、ICN1/GFP 細胞での未分化細胞の割合が Day 6 以降増加した (図4B)。すなわち、分化が誘導され細胞死に至る培養条件においても、Notch1 シグナルを活性化された細胞の一部は未熟な芽球様の形態を維持し、増殖能を保持していた。

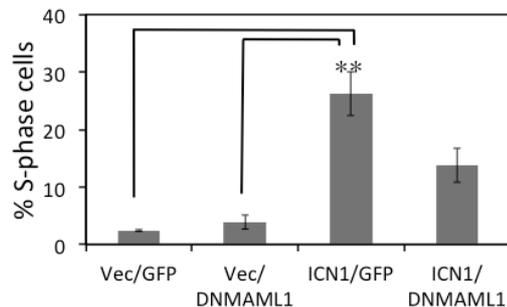


図5 Day 8 での細胞周期 S 期の細胞の割合

さらに、Day 8 での細胞周期を検討するため、各群の細胞に BrdU を取り込ませた後、蛍光標識された抗 BrdU 抗体と 7-AAD で染色し 2 カラーのフローサイトメトリー解析を行った。S 期の細胞の割合は、Vec/GFP 細胞と Vec/DNAML1 細胞に比べ ICN1/GFP 細胞におい

て有意に高かった (図5)。すなわち、分化が誘導され細胞死に至る培養条件においても、Notch1 シグナルの活性化が顆粒球系細胞の増殖能の維持に寄与する可能性が示唆された。

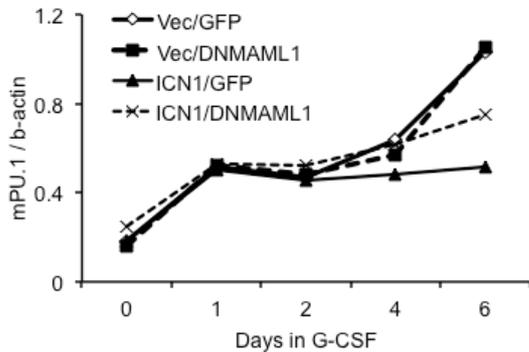


図6 PU.1 の発現量の比較

最後に、顆粒球分化に関わる転写因子 PU.1、C/EBP alpha、GATA2 の RNA の発現をリアルタイム PCR 法で定量し 4 群間で比較したところ、PU.1 の発現量が ICN1/GFP 細胞で低下していたが (図6、Day 4 と Day 6)、C/EBP alpha と GATA2 の発現量については 4 群間で差は認められなかった。すなわち、Notch1 シグナルの活性化が転写因子 PU.1 の発現を抑制することで顆粒球分化を抑制する可能性が示唆された。

(3) 急性骨髄生白血病細胞の増殖能における Notch1 シグナルの役割を探るため、当研究室で樹立した急性骨髄生白血病由来の細胞株 KOPM28 と KOPM30 に ICN1 または DNMAML1 の遺伝子導入を試みたが、レトロウイルスベクターを用いた方法やエレクトロポレーション法での導入効率が悪く、これまでのところ結果は得られていない。今後は、他の細胞株を用いて検討を進めていく予定である。

## 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)

[学会発表] (計 2 件)

- ①. Nakamura M, Activation of Notch1 Signaling Suppresses Granulocytic Differentiation and Maintains a Part of Myeloid Progenitor Cells At the Immature Stage. The 2011 Annual Meeting of the American Society of Hematology. Publication Number: 2375. December 10-13, 2011, San Diego, CA, USA

- ②. 中村誠, Notch1 シグナルは、PU.1 の発現の抑制を介して顆粒球への分化を遅延させる。第 51 回日本小児血液学会 2009 年 11 月 27 日～11 月 29 日、千葉県浦安市、日本

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 誠 (NAKAMURA MAKOTO)  
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・医学  
研究員  
研究者番号 : 10422685

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし