

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16264

研究課題名（和文）リソソーム代謝経路が規定する白血病幹細胞の未分化性維持機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the undifferentiated maintenance mechanism of leukemia stem cells regulated by the lysosomal metabolic pathway

研究代表者

倉吉 健太（kurayoshi, kenta）

金沢大学・がん進展制御研究所・博士研究員

研究者番号：00802901

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：申請者は、リソソームが鉄の恒常性を維持することで、がん遺伝子群の発現を亢進し、白血病幹細胞特異的に未分化性を維持する可能性を見出した。本研究では、リソソームの鉄代謝を介したがん遺伝子の発現制御機構を特定するとともに、リソソーム-鉄の下流の未分化維持因子を探索することで白血病幹細胞の未分化性維持機構を解析した。リソソームは、鉄依存的にエンハンサーリプログラミングを誘導することでがん遺伝子の発現を制御することが明らかとなった。また、未分化維持、がん遺伝子のエンハンサー制御に寄与する鉄結合タンパク質を特定した。従って、リソソームによる未分化維持機構の一端が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究により、リソソーム-鉄経路が、がん遺伝子のエンハンサーリプログラミングを誘導することで、白血病細胞の未分化性維持に寄与することが判明した。本研究により、リソソームを介したがんの悪性形質の制御機構が明らかとなった。本研究結果は、あらたながん治療戦略の構築につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The applicant discovered the potential of lysosomes to enhance the expression of oncogenes and maintain the undifferentiated state in leukemia stem cells by maintaining iron homeostasis. In this study, we aimed to analyze the mechanism of undifferentiated maintenance in leukemia stem cells by: 1) identifying the regulatory mechanism of oncogenes expression through lysosomal iron metabolism, and 2) exploring downstream undifferentiated maintenance factors of lysosomes and iron. It was revealed that lysosomes control the expression of oncogenes by inducing iron-dependent enhancer reprogramming. Additionally, iron-binding proteins contributing to undifferentiated maintenance and enhancer control of oncogene was identified. Therefore, a portion of the undifferentiated maintenance mechanism mediated by lysosomal iron metabolism has been elucidated.

研究分野：血液がん

キーワード：代謝

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病(AML)は、造血幹・前駆細胞から生じる悪性腫瘍であり、骨髄球系細胞の異常増殖と分化不全を特徴とする。AMLには、特に未分化な形質を示す集団、いわゆる白血病幹細胞が存在することが知られ、抗がん剤に対して抵抗性を示す。従って、その未分化維持機構を理解し、分化誘導法を開発することは、白血病の治療開発にとって重要なアプローチとなる。

オッター・ワールブルグが、「がん細胞は解糖系依存的に ATP 合成を行う」ことを発見して以来、がん細胞と正常細胞の代謝の違いが認知され、代謝はがん治療標的として注目されてきた。近年、ミトコンドリアでの代謝調節が白血病幹細胞の未分化維持に寄与することが報告され、未分化維持での代謝制御の重要性が注目されつつある (Singh, et.al. Cell Stem Cell 2020)。しかしながら、代謝による白血病幹細胞の未分化維持に関する知見はまだ多くなく、その制御機構の詳細は不明である。

その解明に向けて、申請者らは、ヒト代謝関連分子 (計 3,029 遺伝子) を対象とした sgRNA カスタムライブラリーを作成し、白血病細胞の未分化性維持に寄与する代謝関連因子を独自の手法で網羅的に探索した。本スクリーニングでは、sgRNA ライブラリーを細胞に導入した後、分化マーカー (CD11b) の発現を指標に分化細胞を分取し、分化を誘導する sgRNA の選抜を行った。その結果、すでに未分化維持に寄与すると報告のあるミトコンドリアの代謝遺伝子に加え、リソソームの代謝遺伝子 (ATP6 ファミリー) が白血病の未分化維持に寄与することが明らかとなった。リソソームは pH5 程度に維持された細胞小器官で、プロトンポンプ v-ATPase (ATP6 ファミリー) によりその pH および機能が維持される。また、リソソームは細胞外から取り込まれた鉄の貯蔵・細胞質への輸送を行い、細胞質の鉄プールを調整する。興味深いことに、v-ATPase 阻害剤 Bafilomycin は正常造血幹細胞には影響を及ぼさず、AML 特異的に分化誘導・抗増殖効果を示した。また、その作用は鉄の添加により阻害された。このことから、リソソームは鉄の恒常性を維持することで、白血病幹細胞特異的に未分化性維持に寄与する可能性が示唆された。これらの知見を基に、本研究では「リソソーム-鉄経路はいかにして白血病幹細胞特異的に未分化性維持に寄与するのか」を学術的「問い」とし、その分子機構を特定する。申請者は Bafilomycin が鉄依存的に未分化維持因子 X を含むがん遺伝子群の発現を抑制することを見出した。従って、リソソーム-鉄経路はがん遺伝子群の発現を亢進することで白血病幹細胞の未分化性維持に寄与する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、リソソーム-鉄経路によるがん遺伝子 X の発現制御機構の解析を進めるとともに、鉄結合タンパク質に着目し、リソソーム-鉄経路下流の未分化維持因子をさらに探索する。それらの解析を通じて、リソソーム-鉄経路の白血病幹細胞の未分化維持機構を解明するのが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) リソソーム-鉄経路による未分化維持遺伝子の発現制御機構の特定

Bafilomycin がいかにして、未分化維持に寄与するがん遺伝子 X の発現を制御するのかを調べるために、Bafilomycin 処理後、遺伝子 X のタンパク、mRNA 量への影響をウエスタンブロット、RT-qPCR で検討した。Bafilomycin の転写レベルへの影響を検討するために、Bafilomycin 処理後、CUT&Tag を用いて、活性化エンハンサーマークである H3K27Ac への影響を検討した。また、遺伝子 X 近傍に存在するエンハンサーが遺伝子 X への発現への影響を RT-qPCR で、未分化維持に寄与は分化マーカー CD11b を用いて検討した。

(2) リソソーム-鉄経路下流の未分化維持因子の探索

鉄結合タンパク質を標的としたカスタム sgRNA ライブラリーを作成した。その sgRNA ライブラリーを用いて、drop out スクリーニングを実施、増殖に必須の鉄結合タンパク質を特定した。リソソームの下流分子として有望な遺伝子については、遺伝子破壊を行った後、分化マーカーCD11b を用いて未分化維持に寄与を検討した。また、遺伝子 X のエンハンサーへの影響を CUT&Tag を用いて検討した。

4 . 研究成果

(1) リソソーム-鉄経路による未分化維持遺伝子の発現制御機構の特定

Bafilomycin がいかにして、未分化維持に寄与するがん遺伝子 X の発現を制御するのかを調べるために、Bafilomycin 処理後、遺伝子 X のタンパク、mRNA 量への影響を調べた。Bafilomycin 処理後、24 時間後に遺伝子 X の mRNA が低下し、48 時間後にタンパク質の顕著な低下を確認できた。また、鉄を添加すると Bafilomycin による遺伝子 X mRNA の低下が阻害された。従って、Bafilomycin は鉄依存的に遺伝子 X を mRNA レベルもしくは転写レベルで発現を抑制することが示唆された。さらに、Bafilomycin もしくは鉄で処理した後、CUT&Tag を用いて、活性化エンハンサーマークである H3K27Ac への影響を調べた。Bafilomycin 処理により、遺伝子 X を含む未分化維持に寄与するがん遺伝子近傍に存在する H3K27Ac の低下を誘導し、その作用は鉄の添加により阻害された。従って、Bafilomycin は鉄依存的にがん遺伝子のエンハンサーリプログラミングを誘導することが示唆された。また、CRISPRi システムを用いて遺伝子 X 近傍に存在するエンハンサーを阻害すると、遺伝子 X の発現が低下し、分化マーカーCD11b が増加した。また、顕著な増殖抑制も誘導された。従って、Bafilomycin は、鉄代謝を通じて転写レベルで遺伝子 X の発現を抑制し、白血病の未分化維持に寄与することが判明した。

(2) リソソーム-鉄経路下流の未分化維持因子の探索

リソソーム-鉄経路下流の未分化維持因子の特定するために、鉄結合タンパク質を標的としたカスタム sgRNA ライブラリーを作成し、1 次スクリーニングとして drop out スクリーニングを実施した。その結果、増殖に必須な 57 種の鉄結合タンパク質の候補を特定できた。その中には、リソソーム下流分子も含まれていたため、その遺伝子を破壊した後、増殖および分化マーカーCD11b への影響を調べた。その結果、その遺伝子の破壊により、増殖が抑制され、分化マーカーCD11b が増加した。また、その遺伝子を破壊した後、CUT&Tag を用いて、活性化エンハンサーマークである H3K27Ac への影響を調べた。その遺伝子破壊は Bafilomycin と同様に、遺伝子 X の発現を制御するエンハンサーに影響を及ぼした。以上の結果より、リソソーム-鉄経路による未分化維持機構の分子機構の一端が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0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 Yongwei Jing , Masahiko Kobayashi , Ha Thi Vu , Atsuko Kasahara , Xi Chen , Loc Thi Pham 1, Kenta Kurayoshi , Yuko Tadokoro , Masaya Ueno , Tomoki Todo , Mitsutoshi Nakada , Atsushi Hirao	4. 巻 113
2. 論文標題 Therapeutic advantage of targeting lysosomal membrane integrity supported by lysophagy in malignant glioma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 2716-2726
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15451.	査読の有無 無
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 Loc Thi Pham , Hui Peng , Masaya Ueno , Susumu Kohno , Atuso Kasada , Kazuyoshi Hosomichi , Takehiro Sato , Kenta Kurayoshi , Masahiko Kobayashi , Yuko Tadokoro , Atsuko Kasahara , Mahmoud I Shoulkamy , Bo Xiao , Paul F Worley , Chiaki Takahashi , Atsushi Tajima , Atsushi Hirao	4. 巻 621
2. 論文標題 RHEB is a potential therapeutic target in T cell acute lymphoblastic leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 74-79
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.06.089.	査読の有無 無
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1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 倉吉 健太、平尾 敦
2. 発表標題 FOXOs下流因子を対象とした白血病幹細胞の分化誘導法の開発
3. 学会等名 若手支援技術講習会
4. 発表年 2021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
---------	---------