

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 6 年 5 月 2 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16299

研究課題名（和文）EVI1高発現白血病での白血病幹細胞の維持機構の解明と治療法の探索

研究課題名（英文）Elucidation of the maintenance mechanism of leukemic stem cells in leukemia with high EVI1 expression and search for therapeutic target

研究代表者

日野 俊哉（Hino, Toshiya）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20935746

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：EVI1高発現は初発急性骨髄性白血病の約5-10%程度に認められ、極めて予後不良であることが知られるが、有効な治療法が開発されていない。本研究ではEVI1が白血病幹細胞の幹細胞性の維持に関わる機構を明らかにするために、EVI1高発現白血病マウスモデルを用いて、RNAシーケンス解析およびクロマチン免疫沈降シーケンス解析を統合的に解析し、白血病幹細胞でEVI1に制御されると予想される候補遺伝子を抽出した。これらの候補遺伝子についてノックアウトライブラリースクリーニングを行い、白血病幹細胞の維持に必要な遺伝子の絞り込みを行い、12遺伝子を候補として抽出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではEVI1高発現白血病マウスモデルを用いて、RNAシーケンス解析およびクロマチン免疫沈降シーケンス解析を統合的に解析し、さらに、in vivoでのノックアウトスクリーニングを行い、EVI1高発現白血病モデルマウスにおいて白血病幹細胞の維持に必要な遺伝子を抽出した。これらの遺伝子のEVI1高発現白血病における白血病幹細胞性維持機構を明らかにすることで、EVI1高発現白血病における新規治療を開拓できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：High EVI1 expression is observed in approximately 5 to 10% of de novo acute myeloid leukemia, and this subgroup is known to have an extremely poor prognosis, but no effective treatment has been developed. In this study, in order to elucidate the mechanism by which EVI1 is involved in maintaining the stemness of leukemic stem cells, we integrated RNA sequence analysis and chromatin-immunoprecipitation sequence analysis using a leukemia mouse model with high EVI1 expression. We extracted candidate genes predicted to be regulated by EVI1 in leukemia stem cells. Knockout library screening was performed on these candidate genes to narrow down the genes necessary for maintaining leukemia stem cells, and 12 genes were extracted as candidates.

研究分野：血液・腫瘍内科

キーワード：急性骨髄性白血病 EVI1 白血病幹細胞 CRISPRスクリーニング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

代表的な難治性造血器腫瘍である急性骨髄性白血病(acute myeloid leukemia: AML)は、造血幹細胞(hematopoietic stem cell: HSC)や前駆細胞に遺伝子変異や染色体異常が生じることで、シグナル伝達や転写制御、エピジェネティクスなどに異常が生じ、異常な細胞増殖と分化停止が起こる疾患である。多数の染色体転座や遺伝子異常が同定され、病型を層別化できるようになっているが¹、いまだにほとんどの異常に対する特異的な治療は存在しない。HSCの維持に必要な転写因子であるEcotropic viral integration site 1 (EVI1)の高発現はde novo AMLの約5~10%程度に認められ、EVI1高発現で特徴づけられるサブグループはあらゆる治療に抵抗性を示し、AMLの中でも最も予後不良な集団として知られている²。EVI1の高発現が治療抵抗性・予後不良に関わる機序については不明な点が多い。一方で多くのAML患者において、AML細胞の中に正常造血系と同様に分化の階層性が存在し、その頂点の白血病幹細胞(leukemia stem cell: LSC)が難治病態の形成や再発に関わることが知られており、LSCの形成・維持機構に関する研究が積極的に行われているものの、まだまだ不明な点が多いのが現状である³。

EVI1はMDS1 and EVI1 complex locus(MECOM)にコードされる蛋白であり、zinc finger domainを持つ転写因子として核内でDNAと結合し様々な遺伝子の転写制御に関わる。申請者が所属する研究室で明らかにしたように、正常造血における血液系細胞の中ではHSCでほとんど特異的に発現しており、HSCの維持に重要である^{4,5}。正常HSCでのEVI1の性質を考えると、EVI1の高発現はLSCにおいても幹細胞性(自己複製能、未分化性)の維持に関わっていることが予想され、過去には細胞株にEVI1の強制発現により未分化性が維持されることが報告されているほか、申請者らの研究室ではマウスAMLモデルにおけるEVI1の欠失誘導により、AMLの進行を抑制できることを示している⁴。

近年、様々ながんのモデルにCRISPR/Cas9技術を用いた全ゲノムをターゲットとしたノックアウトライブラリースクリーニングによる網羅的な解析が行われるようになり、血液疾患においても同様の試みが行われている。同技術はLSCの維持に必要な遺伝子の網羅的解析にも適応可能と考えられるが、LSCの維持には腫瘍微小環境に関わるところも多いためin vivoでのスクリーニングが望まれる。しかし、AMLのマウスモデルにおいて1匹のマウスに移植できる細胞数に限りがあるためゲノムワイドのスクリーニングを行うにはカバレッジを確保するのが難しいため、適切なターゲットの絞りこみが肝要である。

2. 研究の目的

上記の背景からEVI1がLSCの形成に関わっていることが予想され、EVI1がLSCの維持に関わる機序を明らかにすることで、予後不良なEVI1高発現AMLに対する治療に応用できる可能性がある。本研究は、EVI1高発現AMLにおいてLSC特異的なEVI1の幹細胞性維持機構が存在することを仮説として、カバレッジの問題点を克服すべくEVI1に制御される下流標的をクロマチン免疫沈降(chromatin immunoprecipitation: ChIP)-seq解析を用いて適切に絞り込み、in vivoスクリーニングを用いてLSCに特徴づけられるEVI1の分子学的機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) C57BL/6 野生型マウスから単離したフルオロウラシルで刺激された骨髄細胞に、FLAG タグを付けたヒト EVI1 遺伝子をレトロウイルスを用いて形質導入を行い、非致死量の放射線 (5.25 Gy) を照射した同系レシピエントマウスに尾静脈を介して移植を行い、EVI1 高発現急性骨髄性白血病 (EVI1-AML) マウスモデルにおいて、RNA-seq 解析により LSC が濃縮されている分画でそれ以外の分画と比較して有意に高発現が認められた遺伝子を抽出し、また、(ChIP)-seq 解析により LSC が濃縮されている分画で EVI1 が制御すると考えられる遺伝子を抽出する。

(2) Cas9 ノックインマウスから単離したフルオロウラシルで刺激された骨髄細胞に、ヒト EVI1 遺伝子をレトロウイルスを用いて形質導入を行い、非致死量の放射線 (5.25 Gy) を照射した同系レシピエントマウスに尾静脈を介して移植を行い、Cas9 発現 EVI1-AML マウスモデルを作製する。(1) で抽出した遺伝子に対する gRNA ライブラリを作製し、CRISPR/Cas9 技術を用いてノックアウトライブラリースクリーニングを行い、EVI1-AML マウスモデルにおいて LSC の維持に必要な遺伝子を同定する。

4. 研究成果

(1) EVI1-AML マウスモデルにおいて、白血病細胞の c-kit 陽性分画と c-kit 陰性分画の遺伝子プロファイル RNA-seq により網羅的に解析し、c-kit 陽性分画で有意に発現上昇が認められる遺伝子を解析した(図 1 左)。また、EVI1-AML マウスモデルにおいて、c-kit 陽性分画の白血病細胞において、FLAG タグを標的として EVI1 における ChIP-seq 解析を行った(図 1 右)。EVI1 の DNA 結合部位として得られた領域が制御すると考えられる遺伝子を、Genomic Regions Enrichment of Annotations Tool (GREAT) を用いてアノテーションを行った⁶。これらの結果を統合し、重複する 803 遺伝子を白血病幹細胞性維持に関わる遺伝子候補とした。

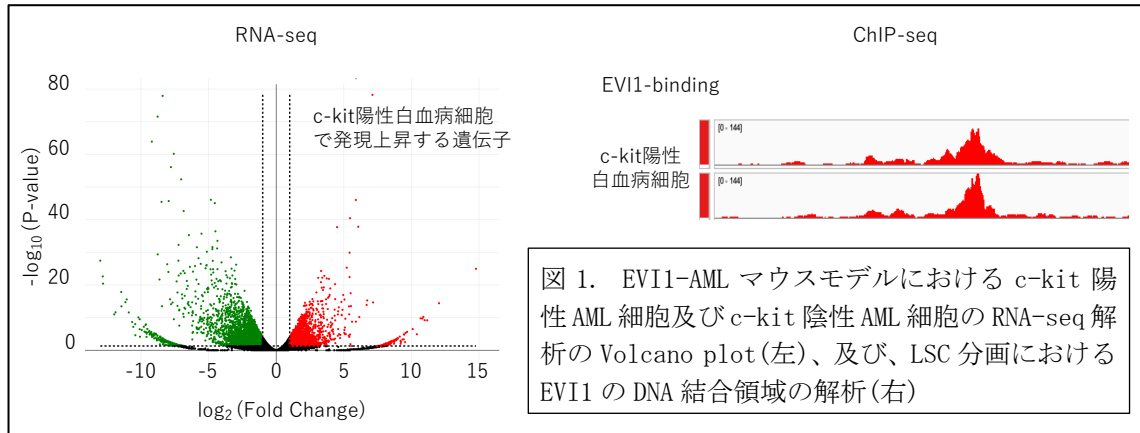


図 1. EVI1-AML マウスモデルにおける c-kit 陽性 AML 細胞及び c-kit 陰性 AML 細胞の RNA-seq 解析の Volcano plot(左)、及び、LSC 分画における EVI1 の DNA 結合領域の解析(右)

(2) 候補とした 803 遺伝子に対してそれぞれ 4 つの gRNA を含むノックアウトライブラリーを作製した。Cas9 発現 EVI1-AML マウスモデルの c-kit 陽性分画(LSC 分画)に gRNA ライブラリーを導入し、非致死量の放射線 (5.25 Gy) を照射した同系レシピエントマウスに尾静脈を介して移植を行った。AML 発症後の LSC 分画と非 LSC 分画のゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンスを行った。得られたデータについては、MAGeCK ソフトウェアを用いて解析を行い⁷、12 遺伝子を LSC 維持に必要な遺伝子の候補として抽出した(図 2)。今後これらの候補遺伝子の中で EVI1-AML マウスモデルの LSC の幹細胞性維持に強く依存する遺伝子及び EVI1 の責任 DNA 結合領域を同定し、新規治療標的を探索する予定である。

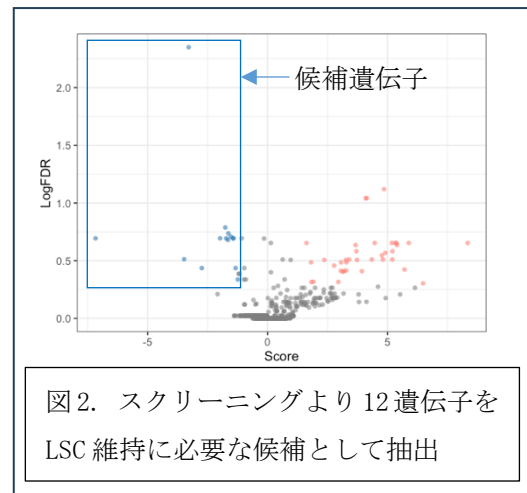


図 2. スクリーニングより 12 遺伝子を LSC 維持に必要な候補として抽出

<引用文献>

- 1 Dohner, H. *et al.* Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* **129**, 424-447, doi:10.1182/blood-2016-08-733196 (2017).
- 2 Valk, P. J. *et al.* Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* **350**, 1617-1628, doi:10.1056/NEJMoa040465 (2004).
- 3 Vetrie, D., Helgason, G. V. & Copland, M. The leukaemia stem cell: similarities, differences and clinical prospects in CML and AML. *Nat Rev Cancer* **20**, 158-173, doi:10.1038/s41568-019-0230-9 (2020).
- 4 Goyama, S. *et al.* Evi-1 is a critical regulator for hematopoietic stem cells and transformed leukemic cells. *Cell Stem Cell* **3**, 207-220, doi:10.1016/j.stem.2008.06.002 (2008).
- 5 Kataoka, K. *et al.* Evi1 is essential for hematopoietic stem cell self-renewal, and its expression marks hematopoietic cells with long-term multilineage repopulating activity. *J Exp Med* **208**, 2403-2416, doi:10.1084/jem.20110447 (2011).
- 6 McLean, C. Y. *et al.* GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions. *Nat Biotechnol* **28**, 495-501, doi:10.1038/nbt.1630 (2010).
- 7 Li, W. *et al.* MAGeCK enables robust identification of essential genes from genome-scale CRISPR/Cas9 knockout screens. *Genome Biol* **15**, 554, doi:10.1186/s13059-014-0554-4 (2014).

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------