

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 12 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23791206

研究課題名（和文） MOZ白血病における白血病幹細胞の生成・維持機構の解明

研究課題名（英文） Regulation of leukemia stem cells in MOZ-TIF2 AML

研究代表者 嶋 晴子 (SHIMA HARUKO)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・特任研究員

研究者番号：80424167

研究成果の概要（和文）：白血病幹細胞の特徴を明らかにすべく MOZ-TIF2 AML に着目して研究を行った。MOZ 複合体の構成因子である BRPF1 は MOZ の HOX 遺伝子における局在を促進しその発現上昇をもたらし、白血病発症に寄与することを明らかにした。また白血病幹細胞制御メカニズムのひとつとしてポリコーム蛋白 Ring1A/B は細胞分化を促進する Glis2 の発現を抑制することにより白血病幹細胞の維持に貢献することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study was performed to determine the characteristics of MOZ-TIF2 AML stem cells using two different assay systems. Firstly, we showed that BRPF1/HOX pathway is critical for the leukemogenesis by MOZ-TIF. Our data indicate that BRPF1 recognizes histone modifications and stimulates MOZ localization on target genes, and upregulates transcription of target genes such as HoxA9 and Hoxa10, which finally promotes development of leukemia. Secondary, we focused on Ring1A and Ring1B, the components of PRC1 complex, which plays an important role in the regulation of stem cells. We found that Ring 1A/B play crucial roles in the maintenance of MOZ-TIF2 leukemia through repression of Glis2, which strongly promotes differentiation of leukemia stem cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：白血病幹細胞、MOZ-TIF2

1. 研究開始当初の背景

白血病は自己複製能を有するごく一部の細胞集団，“白血病幹細胞”から発生し、その病態が維持されている。そのため、白血病幹細胞の根絶が白血病の治療には不可欠である。白血病幹細胞は静止期にあり、従来の細胞周期依存性の抗がん剤に耐性であることが多く、白血病幹細胞は難治性白血病の治療において問題視されている。

2. 研究の目的

白血病幹細胞の特徴を明らかにし、白血病幹細胞を標的とした治療を開発することが難治性白血病の治療成績向上に重要である。われわれは、難治性白血病として知られる Monocytic leukemia zinc finger protein (MOZ) 融合遺伝子関連の急性骨髄性白血病 (AML) に着目し、MOZ 白血病幹細胞の生成および維持機構を明らかにし、難治性白血病の治療につながる基盤となる分子メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) BRPF1 の機能解析

MOZ 白血病患者サンプルでは白血病の原因となるホメオボックス蛋白 (HOX) の過剰発現が報告されているが, MOZ 白血病における HOX 制御機構は不明である. そこで, MOZ 複合体の構成因子 BRPF1 に着目した. マウスの骨髓幹細胞・前駆細胞にレトロウィルス感染の系を用いて AML 融合遺伝子 MOZ-TIF2 を導入し, 感染した細胞をセルソーターでソートし, MOZ-TIF2 白血病細胞として以下の実験に用いた. まず, BRPF1 shRNA をレンチウィルス感染の系を用いて MOZ-TIF2 白血病細胞に導入し, 半固形培地で繰り返し培養し, コロニー形成能を評価した. さらに, MOZ-TIF2 白血病細胞を用いて MOZ 抗体および BRPF1 抗体でクロマチン免疫沈降 (ChIP) 解析を行った.

(2) Ring1A/B の機能解析

われわれは, ポリコーム複合体 PRC1 を構成する RING タンパク (Ring1A および Ring1B) が, 白血病幹細胞の維持に必須であることを明らかにしてきた. Ring1A および Ring1B は相補的な作用を示すため, ダブルノックアウトマウスでの解析を行った. Ring1A ノックアウトマウスは目立った phenotype を示さないが, Ring1B ノックアウトマウスは胎生致死のため, Ring1B についてはコンディショナルノックアウトマウスを用いた.

まず, ①Ring1A 欠損および Ring1A/B 欠損の MOZ-TIF2 白血病細胞を半固形培地で繰り返し培養し, コロニー形成能を評価した. 次に, ②Ring1A 欠損および Ring1A/B 欠損の MOZ-TIF2 白血病細胞を回収し, マイクロアレイ解析を行い, 遺伝子発現の変化を評価した. さらに, ③マイクロアレイ解析の結果から Ring1A/B の標的遺伝子を抽出し, 機能解析を行った.

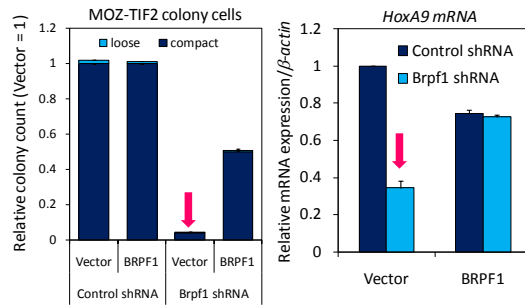
4. 研究成果

(1) BRPF1 の機能解析

MOZ-TIF2 白血病細胞は BRPF1 shRNA 発現下では, Vector control に比し有意にコロニー形成能が低下することが示された. また, BRPF1 shRNA の発現した MOZ-TIF2 細胞では HOXA9 や HOXA10 の発現が有意に低下した. コロニー形成能および HOXA9 の発現は BRPF1 を強制発現させることにより回復することから, HOX 遺伝子の発現および白血病発症に BRPF1 が関与することが示唆された. (図 1)

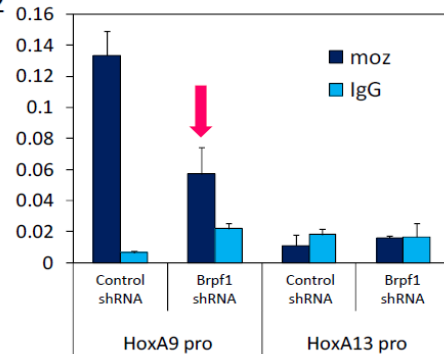
次に, MOZ-TIF2 白血病細胞を用いて ChIP 解析をおこなった結果, MOZ と BRPF1 は HOXA9 や HOXA10 の遺伝子上に共局在することが示された. BRPF1 shRNA 発現下では control に比し MOZ の局在が target ではない HOXA13 に

図 1



関しては変化がないのに対し, HOXA9 では低下することから, BRPF1 が MOZ による HOXA9 発現上昇に寄与することが示唆された (図 2).

図 2

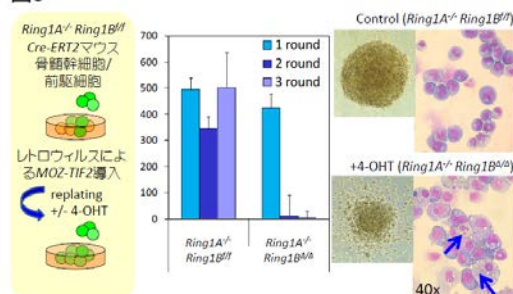


以上から, BRPF1 は MOZ の HOX 遺伝子における局在を促進し, その結果 HOXA9 や HOXA10 の発現上昇をもたらし, MOZ-TIF2 白血病発症に寄与することを明らかにした.

(2) Ring1A/B の機能解析

①Colony assay では, Ring1A 欠損の MOZ-TIF2 白血病細胞では Wild-type と同様に compact なコロニーが繰り返し多数観察された. 一方 Ring1A/B 欠損細胞では, コロニーの形態が compact から loose に変化し, 継代を重ねるにつれ, コロニー形成能 (不死化能) が失われた. また, コロニーを構成する細胞の形態を May-Giemsa 染色で観察すると, Wild-type および Ring1A 欠損細胞でみられた N/C 比の高い単球系の未熟な細胞が Ring1A/B 欠損細胞では減少し, マクロファージなど成熟した骨髓系の細胞が多数観察された. (図 3)

図 3



②マイクロアレイ解析では, Ring1A 欠損

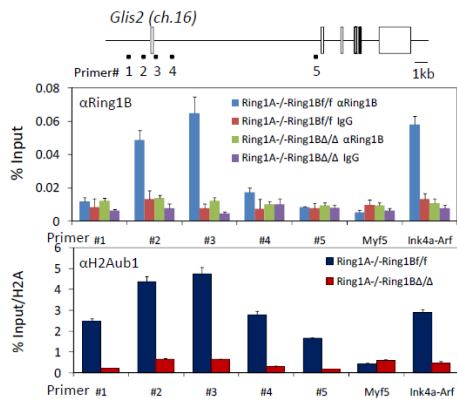
MOZ-TIF2 細胞に比し, Ring1A/B 欠損 MOZ-TIF2 細胞で約 200 の遺伝子が 2 倍以上の発現上昇を示した. 一方, 2 倍以上の発現低下を示した遺伝子はわずか 13 であった. ポリコムタンパクは transcriptional repressor であることから, 5 倍以上の発現上昇を示した 20 の遺伝子の中から細胞の分化誘導にかかわる遺伝子 Glis2 (Gli similar 2) に着目した.

③ Ring1B 標的遺伝子 Glis2 の機能解析

1) ChIP 解析

MOZ-TIF2 細胞を用いて Ring1B 抗体で ChIP 解析を行った結果, Ring1B は Glis2 の promoter 領域に局在することが示された. また, RING はヒストン H2A を基質の一つとするユビキチン化酵素であるが, Ring1B の局在する Glis2 の領域でヒストン H2A モノユビキチン化シグナルの上昇が観察された. (図 4)

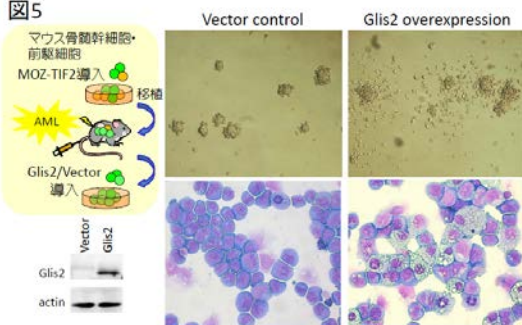
図 4



2) MOZ-TIF2 細胞における Glis2 強制発現の効果

Wild-type の MOZ-TIF2 細胞に Glis2 を導入し, 半固形培地で培養した. その結果, compact なコロニーを示す control 細胞に比し, Glis2 強制発現細胞では loose なコロニー形態を示した. また, 細胞の形態を確認すると, Glis2 強制発現細胞ではマクロファージが多数観察され, 細胞の分化誘導がみられた. (図 5)

図 5

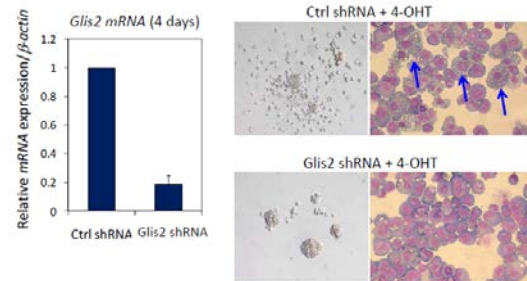


3) Ring1A/B 欠損 MOZ-TIF2 細胞における Glis2 ノックダウンの効果

レンチウイルス感染の系を用いて Glis2 をノ

ックダウンした MOZ-TIF2 細胞において Ring1A/B を欠損させると, control 細胞ではコロニーの形態が loose になり, 細胞分化が誘導されたが, Glis2 ノックダウン細胞では compact のコロニーが維持され, 細胞の分化も一部抑制された. (図 6)

図 6



以上から, Ring1A/B は細胞分化を促進する Glis2 の発現を抑制することにより, 白血球幹細胞の維持に貢献することが示唆された.

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] (計 1 件)

嶋晴子, 北林一生. 骨髄系腫瘍の幹細胞とその標的分子. 血液フロンティア, 査読なし, 22 巻, 2012, 53-60.

[学会発表] (計 4 件)

- ① Haruko Shima, Mika Shino, Kazutsune Yamagata, Yukiko Aikawa, Haruhiko Koseki, Issay Kitabayashi. Roles of Ring1A/B in stem cell potential of MOZ and other acute myeloid leukemias. International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting, 2012年6月16日, 横浜.
- ② Haruko Shima, Mika Shino, Kazutsune Yamagata, Yukiko Aikawa, Haruhiko Koseki, Issay Kitabayashi. Roles of Ring1A/B in Stem Cell Potential of MOZ and Other Acute Myeloid Leukemias. 第 74 回日本血液学会学術集会, 2012年10月19日, 京都.
- ③ Haruko Shima, Kazutsune Yamagata, Yukiko Aikawa, Mika Shino, Haruhiko

Koseki, Issay Kitabayashi. Essential role of BRPF1/HOX pathway in MOZ-TIF2-induced acute myeloid leukemia. 第73回日本血液学会学術集会, 2011年10月16日, 名古屋.

- ④ Haruko Shima, Mika Shino, Kazutsune Yamagata, Yukiko Aikawa, Haruhiko Koseki, Issay Kitabayashi. Roles of Ring1A/B on Stem Cell Potential of MOZ and Other Acute Myeloid Leukemias. 53rd ASH Annual Meeting and Exposition. 2011年12月12日, San Diego, USA.

6. 研究組織

(1)研究代表者

嶋 晴子 (SHIMA HARUKO)
独立行政法人国立がん研究センター・
研究所・特任研究員
研究者番号：80424167

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし