

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790976

研究課題名(和文)白血病の病態制御におけるGemininの分子機能の解析

研究課題名(英文)Analysis of the molecular function of Geminin in leukemogenesis

研究代表者

大野 芳典 (Ohno, Yoshinori)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：10548986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞活性制御における中核因子であるGemininが、白血病の病態制御に関与するHOXA9やポリコム複合体1による分解制御され、その制御を介して造血幹細胞の活性を制御していることを明らかにした。さらに、Gemininが白血病の病態制御に関与するBrg1と結合しその活性を抑制していることを明らかにした。この成果によりGemininの白血病病態制御に関わる分子機序の解明における大きな手がかりを得た

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that Hoxa9 regulate the activity of hematopoietic stem cells (HSCs) through the ubiquitin-proteasom-mediated direct regulation of Geminin, indicating that Geminin acts as a central factor for regulating cellular proliferation and differentiation in HSCs. Recently, we have shown that Geminin regulates the transcriptional activity of E2F, a regulator of cell cycle, through the chromatin remodeling. These findings suggest that Geminin plays an important role in hematopoiesis and leukemogenesis

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 Geminin Hoxa9 Mll-Af9

## 1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞の活性を支持する細胞内因子としてポリコム遺伝子群 (PcG) 複合体 1 と Hoxb4 が上げられる。申請者の研究グループは PcG 複合体 1 のメンバーである Rae28 の欠損したマウスの解析により、PcG 複合体 1 が正常造血幹細胞の活性を維持するために必須であることを世界で初めて明らかにした (JEM 2002)。PcG 複合体 1 は、Ink4a 遺伝子の転写を抑制することによって造血幹細胞の活性を制御していると考えられてきた。しかし、最近研究グループは、PcG 複合体 1 が DNA 複製の制御因子 Geminin と結合し、ユビキチン化を介してタンパク質の安定性を制御することで造血幹細胞の活性を支持するという新たな分子基盤を見出すことに成功した (PNAS 2008)。Geminin は、DNA 複製ライセンス制御因子 Cdt1 と結合しその機能を抑制することで細胞増殖を調節するとともに、一細胞周期に一度の DNA 複製を保証し、DNA の再複製を防ぎゲノムの安定性維持にも寄与している。さらに、Geminin はクロマチンリモデリングの制御により神経幹細胞の未分化性維持に働いていることも知られており、造血幹細胞においても重要な機能を果たしていることが推測される。

もう一方の内的因子である Hoxb4 は Hox 遺伝子群に属し、造血幹細胞の自己複製を誘導するという観点から、現在知られている最も強力な造血幹細胞増幅因子であり、*ex vivo* において胚性幹 (ES) 細胞や人工多能性幹 (iPS) 細胞から造血幹細胞を誘導することができる唯一の因子である。そのため、Hoxb4 の転写制御因子としての分子機能に着目した解析が世界的に進められているが、確定的な知見は得られておらず、Hoxb4 がどのような分子基盤で造血幹細胞の制御に関わっているかについて分子レベルでの解明が切望されていた。最近申請者の研究グループは、Hoxb4 が E3 ユビキチンリガーゼのコア複合体である Roc1-Cul4a-Ddb1 と複合体を形成し、Geminin タンパク質をユビキチン化し分解制御することで、造血幹細胞活性を支持していることを証明した (PNAS 2010)。さらに、Hox 遺伝子群の一員であり Hoxa9 についても同様に Geminin のユビキチン化を介して分解制御し、造血幹細胞の活性を支持していることを明らかにした (論文投稿中)。造血幹細胞の分画で Geminin の発現が高く、増殖活性の高い前駆細胞で Geminin の発現が低下していることを我々は明らかにしており (図 1、PNAS 2008) これらの結果は、PcG 複合体 1 と Hox がともに Geminin の分解制御を介して造血幹細胞の活性を支持していることを示している。つまり、未分化性や静止期の維持や自己複製を制御などの造血幹細胞の活性を支持する分子機構において Geminin は中核的因子を担っているのではないかと考えられた。

白血病の発症・進行は、白血病幹細胞と呼ばれるごく少数の細胞集団によって支持されていることが近年明らかにされつつある。白血病幹細胞は自己複製能とともにすべての白血病細胞を生み出す能力を持ち、静止期を維持することによって薬剤抵抗性を持つことが知られている。骨髄異形成症候群や慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病において PcG 複合体 1 の Bmi1 の発現が病期や予後との相関が報告されている。さらに、Bmi1 欠損マウスによる白血病モデルの解析によって、Bmi1 は白血病幹細胞の活性制御に必須であることが報告されている。さらに、Mixed lineage leukemia (Mll) 遺伝子の転座 (Mll-AF9、Mll-AF6、Mll-ENL など) を有する難治性白血病では Hoxa9 と Hox のコファクターである Meis1 の過剰な発現が認められ、白血病モデルマウスを用いた解析から、白血病発症において Hoxa9 が重要な働きを持っていることが報告されている。造血幹細胞において PcG 複合体 1 と Hoxa9 が Geminin の分解制御を介して幹細胞活性を支持していることから、白血病幹細胞の活性を制御においてもこれらの因子が Geminin を分解制御していることが推測され、自己複製や静止期維持を制御する中核因子として Geminin が働いていると考えられた (図 1)。つまり、Geminin の分子機能を解明することで、薬剤耐性である白血病幹細胞の自己複製や静止期を制御することが可能となり、化学療法への感受性を亢進させることができると推測される。そこで申請者は、白血病幹細胞に注目し、白血病の病態制御における Geminin の分子機能を解明することを試みる本研究を着想した。

## 2. 研究の目的

申請者の研究グループはすでに、レトロウイルスベクターを用いた Geminin の過剰発現システムと Geminin に対する short hairpin RNA (shRNA) を用いたノックダウンシステムの開発に成功し、Geminin の発現を制御することに成功している。さらに、Geminin の発現動態を可視化するために Geminin-YFP ノックインマウスの作製も完了している。そこで、この Geminin-YFP マウス由来の造血細胞を用いて白血病発症モデルマウスを作製し、白血病幹細胞の成立における Geminin の発現動態を詳細に解析する。そして、このモデルマウスで得られた知見をもとに、Geminin の発現を制御することで白血病幹細胞の活性 (移植効率) を制御することを試みるとともに、Geminin の標的遺伝子の探索も行う。さらに、患者由来の白血病細胞の Geminin 発現量を上記の制御方法で制御することで、モデルマウスで得られた知見とヒト白血病発症の分子機序における Geminin の役割を検討する。そして、本研究の知見をもとに新たな白血病治療法の開発に向けた分子基盤の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

- Geminin-YFP ノックインマウスを用いた白血病発症マウスの作製と解析。

#### 1) Hoxa9 と Meis1 の導入による白血病モデルにおける Geminin の発現動態

Hoxa9 と Meis1 発現レトロウイルスベクターをマウスの上位の造血細胞である KSL 細胞 (c-Kit+Sca1+Lin-) に共感染させることにより急性骨髄性白血病を発症させることが可能であることが知られており、申請者もすでに実験系を確立している。さらに、申請者の研究グループはすでに Geminin 遺伝子座に EYFP (黄色蛍光タンパク質) を in frame にノックインした Geminin-YFP マウスを作製し、Geminin の発現を可視化することに成功した。また、Geminin の発現レトロウイルスと Geminin の shRNA を発現するレトロウイルスを用いて造血細胞において Geminin の発現を正と負に制御することも成功している。そこで、この Geminin-YFP ノックインマウスの KSL 細胞に Hoxa9+Meis1 を導入し、白血病を発症させ、セルソーターを使用して Geminin の発現強度により細胞を分けて回収しマウスに移植する。そして、Geminin の発現強度と白血病発症の相関を解析し、Hoxa9+Meis1 導入による白血病における白血病幹細胞と Geminin の発現量を解明する。さらに、Geminin 発現レトロウイルスや Geminin に対する shRNA 発現レトロウイルスを用いて Geminin の発現を制御し、移植を行い Geminin 発現動態が移植効率に影響を与えることを検証する。

#### 2) MII-AF9 による自己複製能獲得における Geminin の発現動態

MI1 融合遺伝子である MII-AF9 は本来自己複製能を持たない骨髄球系前駆細胞である common myeloid progenitors (CMP) および granulocyte/macrophage progenitors (GMP) にも自己複製能や静止期維持などの幹細胞性を付与して白血病幹細胞を成立させることが証明されている。申請者はすでに MII-AF9 を発現するレトロウイルスベクターを用いた実験系を確立している。そこで、Geminin-YFP ノックインマウスの GMP に MII-AF9 発現レトロウイルスを感染させ、in vitro で Geminin の発現動態を多次元タイムラプス蛍光顕微鏡で解析し、高精細 3D 画像解析ソフトを用いて細胞分裂過程における Geminin-EYFP の分配状態を 3 次元的に追跡する。さらに、その解析データをもとに MII-AF9 導入 GMP における Geminin の発現強度により白血病細胞をセルソーターで分取して、マウスに移植を行い白血病幹細胞の移植効率を解析する。そして、Geminin の発現制御システムを用いて Geminin の発現を制御することで、MII-AF9 によって白血病の幹細胞性が付与される分子イベントにおける Geminin の発現動態について明らかにする。

- 白血病幹細胞の活性制御における Geminin の標的遺伝子の探索

#### 1) モデルマウスを用いた解析

白血病幹細胞の活性制御における Geminin の分子機能を同定するために、Geminin の直接、或は間接的に制御している遺伝子を探査する。Geminin-YFP マウスの GMP 細胞に MII-AF9 を導入し白血病を発症させ、Geminin の発現強度を解析して前年度に同定した白血病幹細胞の分画を回収する。そして、この細胞を次世代シーケンサーである Illumina 社の Genome Analyzer IIx にかけて、Geminin の発現動態と関連し特異的な発現動態を示す遺伝子を同定する。さらに、前年度にて確立した Geminin の発現制御を行う実験系を用いて、白血病幹細胞の Geminin の発現制御し標的遺伝子の発現を解析し、この遺伝子が Geminin の制御下にあることを検証する。そして MII-AF9 によって自己複製能や静止期維持など白血病幹細胞の活性を付与する分子イベントにおける Geminin の直接的、あるいは間接的な標的遺伝子を同定する。さらに、Hoxa9+Meis1 による白血病モデルにおいてもこの標的遺伝子の発現が Geminin によって制御されていることを検証し、白血病幹細胞制御における Geminin の分子機能を解明する。

#### 2) ヒト白血病細胞を用いた解析

NOG マウスは、少量の細胞にて正常造血幹細胞または白血病幹細胞由来の造血ヒエラルキーをマウスで再構築できる実験系である。モデルマウスを用いて明らかにした Geminin の役割をヒト白血病細胞で検証するために、患者由来の白血病細胞を NOG マウスに移植し発症させることで白血病幹細胞の活性を評価する。まず、患者由来の白血病細胞にレンチウイルスを用いて Geminin の過剰発現ベクターや shRNA 発現ノックダウンベクターの Geminin 発現制御系のベクターを導入し、NOG マウスに移植するとともに、モデルマウスで明らかにした Geminin の標的遺伝子発現動態を Genome Analyzer IIx によって解析する。そして、ヒト白血病における Geminin の発現制御と白血病幹細胞活性の相関について調べ、ヒトの白血病発症における Geminin の役割について検討する。

### 4. 研究成果

造血幹細胞活性制御における中核因子である Geminin が、HOXA9 やポリコム複合体 1 によってユビキチン化されタンパク質が分解制御されていることを明らかにした。さらにこの分解制御を介して造血幹細胞の活性を制御していることも明らかにした (図 1)。HOXA9 もポリコム複合体 1 もともに白血病の発症に関与することから、Geminin の分解制御が造血幹細胞の活性制御だけでなく白血病の発症にも関与する可能性が考えられた。さらに、Geminin がクロマチンリモデリング因子である Brahma/Brg1 と結合すること、クロマチンリモデリングを制御していることも明らかにした (図 2)。Brahma/Brg1 も白血病発症と病態に関与していることが

知られており、この結果からも Geminin が白血病と病態制御において中核因子として機能していることが考えられた。これらの成果から Geminin の白血病病態制御に関わる分子機序の解明おける大きな手がかりとなり、これにより白血病の新たな分指標的治療への応用も考えられる。

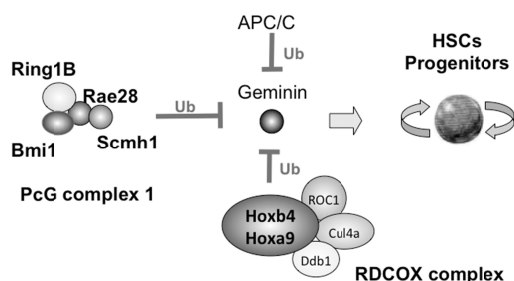


図 1

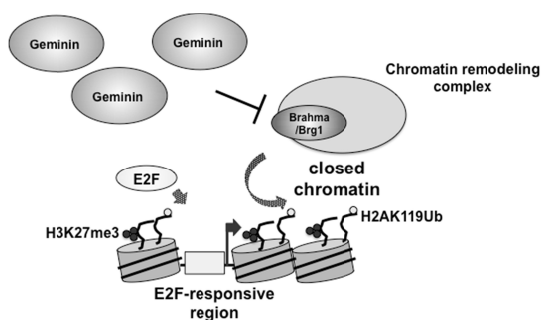


図 2

## 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 3 件)

1. Transcription of the Geminin gene is regulated by a negative-feedback loop.  
Ohno Y, Saeki K, Yasunaga S, Kurogi T, Suzuki-Takedachi K, Shirai M, Mihara K, Yoshida K, Voncken JW, Ohtsubo M, Takihara Y. Mol Biol Cell. 2014 Apr;25(8):1374-83 査読あり
2. Hoxa9 transduction induces hematopoietic stem and progenitor cell activity through direct down-regulation of geminin protein.  
Ohno Y, Yasunaga S, Janmohamed S, Ohtsubo M, Saeki K, Kurogi T, Mihara K, Iscove NN, Takihara Y. PLoS One. 2013;8(1):e53161. 査読あり
3. Scmh1 has E3 ubiquitin ligase activity for geminin and histone H2A and regulates geminin stability directly or indirectly via transcriptional repression of Hoxa9 and Hoxb4.

Yasunaga S, Ohtsubo M, Ohno Y, Saeki K, Kurogi T, Tanaka-Okamoto M, Ishizaki H, Shirai M, Mihara K, Brock HW, Miyoshi J, Takihara Y. Mol Cell Biol. 2013 Feb;33(4):644-60. 査読あり

〔学会発表〕(計 4 件)

Toshiaki Kurogi, Yoshinori Ohno, Shin'ichiro Yasunaga, Kyoko Suzuki-Takedachi, Manabu Shirai, Motoaki Ohtsubo, Yoshihiro Takihara, Negative feed-back loop regulates E2F-mediated transcriptional activation of the Geminin gene. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 3~6 日、神戸ポートアイランド

Yoshinori Ohno, Shin'ichiro Yasunaga, Toshiaki Kurogi, Kyoko Suzuki-Takedachi, Yoshie Nakashima, Motoaki Ohtsubo, Yoshihiro Takihara Negative feed-back loop regulates transcription of the Geminin gene, which governs HSC activity 第 75 回日本血液学会学術集会 2013 年 10 月 11~13 日 ロイトン札幌

Yoshinori Ohno, Shin'ichiro Yasunaga, Keita Saeki, Motoaki Ohtsubo, Toshiaki kurogi, Yoshie Nakashima, Yoshihiro Takihara Scmh1 is required for maintaining hematopoietic homeostasis through the molecular network governing Geminin expression. 第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 11~14 日 福岡国際会議場

Yoshinori Ohno, Shin'ichiro Yasunaga, Motoaki Ohtsubo, Keita Saeki, Yoshie Nakashima, Yoshihiro Takihara Repression of Geminin plays an important role in Hoxa9-induced hematopoiesis and leukemogenesis 第 74 回日本血液学会学術集会 2012 年 10 月 19~21 日 国立京都国際会議場

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/dscb/index.html>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

大野 芳典 (Ohno Yoshinori)

広島大学 原爆放射線医科学研究所 助教

研究者番号：10548986