

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860734

研究課題名(和文)造血幹細胞と白血病幹細胞の活性制御機構におけるGemininの分子機能の解明

研究課題名(英文)Analysis for molecular role of Geminin in hematopoietic and leukemia stem cell

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：DNA複製制御因子でありクロマチンリモデリング制御因子でもあるGemininは、造血幹細胞の活性を支持するポリコム複合体1やHoxタンパク質(Hoxb4/Hoxa9)によりタンパク質発現の制御を受けている。本研究では、レトロウイルスベクターを用いたGeminin発現制御系と造血幹細胞におけるGemininの発現動態を可視化することのできるGeminin-EYFPノックインマウスを作製し、造血幹細胞と白血病幹細胞制御におけるGemininの分子生物学的役割を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Geminin negatively regulates DNA replication and chromatin remodeling through the direct interaction with Cdt1 and Brahma/Brg1, respectively. We previously demonstrated that Polycomb-group complex 1 and Hoxb4/Hoxa9 regulate the activity of hematopoietic stem cells (HSCs) through the ubiquitin proteasome system-mediated direct regulation of Geminin protein, and that Geminin suppresses the E2F-mediated transcriptional activity through the regulation of chromatin remodeling. Geminin is known as a regulator of DNA replication as well as chromatin remodeling. In this study, shRNA-mediated knockdown of Geminin and visualization of Geminin in Geminin-EYFP knockin mice further supported our hypothesis that Geminin acts as a key regulator for determining cell fate of HSCs, i.e., cellular quiescence, self-renewal and differentiation.

研究分野：幹細胞機能学

キーワード：Geminin 造血幹細胞 白血病幹細胞

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は、全血球系列に分化する多分化能と自己複製能とを併せ持ち、生涯にわたって造血を維持している。この造血幹細胞の活性を支持する細胞内因子として PcG 複合体 1 と Hoxb4 が上げられる。我々の研究グループは PcG 複合体 1 のメンバーである Rae28 遺伝子の欠損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 (J.Exp.Med.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いだすことに成功した (PNAS 2008)。Geminin は、細胞周期において DNA 複製ライセンス化を制御することで細胞増殖を調節するとともに、S 期への再突入を防ぎゲノムの安定性維持に寄与している。さらに、胚性幹 (ES) 細胞や人工多能性幹 (iPS)、神経幹細胞においてクロマチンリモデリング制御を介して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 (図 1)。

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 (Plos One 2013)。また、自己複製を行う造血幹細胞 (CD34-KSL <c-Kit+Sca1+Lin⁻>) 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いる (図 2、PNAS2008)。これらの結果は、PcG 複合体 1 と HOX 遺伝子群がともに Geminin 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を示し、Geminin が造血幹細胞の活性を支持する中核因子であると考えられた。

造血器腫瘍である白血病の発症・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行われていることが報告されている。この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作り出す多分化能を持ち、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。近年、PcG 複合体 1 のメンバーである Bmi1 遺伝子の欠損マウスを用いた解析から、PcG 複合体 1 が正常造血幹細胞の活性だけでなく白血病幹細胞の活性維持にも必須であることが明らかとなった。さらに、難治性白血病 (Mll-AF9、Mll-AF6、Mll-ENL など) では Hoxa9 を中心とした Hox 遺伝子群とコファクターの Meis1 の過剰な発現が認められ白血病発症に重要な働きを持っていることが示されている。造血幹細胞において PcG 複合体 1 と Hoxb4、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る。そして、白血病幹細胞においても自己複製や静止期維持を制御する中核因子として Geminin が働いていることが考えられた (図 1、2)。

そこで申請者は、造血幹細胞と白血病幹細胞における Geminin の発現動態と役割を解明し、その知見から新たな白血病に対する治療法を探索す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 の shRNA による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ことのできる Geminin-YFP ノックインマウスの作製し、この Geminin-YFP マウスの造血幹細胞の自己

複製と分化における Geminin の発現動態を解析することに成功している。そこで、この実験系を用いて造血幹細胞における Geminin の発現強度により細胞を分取し、Geminin による未分化性維持機構と自己複製の誘導について解析する。そして、この知見をもとに、Geminin の発現を制御することで造血幹細胞の活性を制御することを試みる。さらに、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し、その分子基盤を解析する。また、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、造血幹細胞と白血病幹細胞における Geminin の分子基盤を比較考察し、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 による造血幹細胞の活性を制御する分子基盤の解明

1) 造血幹細胞の自己複製と分化における Geminin の発現動態

申請者のグループはすでに 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。さらに、このマウスの骨髓細胞を用いて造血幹細胞分画 (CD34⁻ c-Kit+Sca1+Lin⁻) における Geminin の発現動態を FACSaria で解析に成功している。そこで、FACSaria を用いて造血幹細胞における Geminin の発現強度により細胞を分取しマウスに移植して、Geminin 発現強度と造血幹細胞活性を検証する。さらに、造血幹細胞における細胞周期を FACS で解析し、造血幹細胞の G1/S/G2/M 期の各細胞周期における Geminin の発現動態を解析する。そして、この細胞周期における Geminin 発現動態と Geminin 発現動態による造血幹細胞活性の比較を行い、静止期と自己複製中の造血幹細胞を同定する。

2) Geminin の発現動態と未分化性維持の検証

申請者の研究グループはこれまでの研究で、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、Geminin 発現

制御レトロウイルスベクターを用いて造血幹細胞中での Geminin の発現を制御し、移植実験を行い多分化能を検証する。そして、Geminin の発現変化による分化能への影響を解析することで Geminin が未分化性維持機構に関わっていることを証明する。

3) 造血幹細胞の自己複製と分化を掛ける分子基盤の同定

Geminin-YFP マウスを用いた解析により同定できた、静止期、自己複製中の造血幹細胞を分取し、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、レトロウイルスベクターを用いて Geminin の発現を制御することで、同定した遺伝子が Geminin の制御下にあることを検証する。また、Geminin がクロマチンリモデリングを制御して遺伝子の発現を制御していることを証明している(論文投稿中)。そこで、Geminin による遺伝子の発現制御がクロマチンの構造変化であるかどうかを解析する。そしてこれらの知見から、造血幹細胞の活性制御における Geminin の分子基盤について明らかにする。

○ Geminin による白血病幹細胞の活性を制御する分子基盤の解明

1) 白血病発症と幹細胞性獲得における Geminin の発現動態

MLL 融合遺伝子 MLL-AF9 は本来自己複製能を持たない骨髓球系前駆細胞に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(図2)。MLL-AF9 の制御下に Hoxa9 と Meis1 があり、MLL-AF9 による白血病の発症にはこれらの遺伝子の発現が重要であることが報告されている。しかし、Hoxa9+Meis1 は KSL 細胞においては白血病を発症させることができるが、自己複製能を持たない骨髓球系前駆細胞に対して自己複製能を付加することはできない。そこで、Geminin-EYFP マウスの骨髓細胞に MLL-AF9 と Hoxa9+Meis1 を導入して白血病を発症させ、そのときの Geminin の発現動態を解析・比較することで、白血病発症と幹細胞性獲得の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。

2) 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

白血病発症と幹細胞性獲得における

Geminin の発現強度に分けて細胞を回収し、次世代シーケンサーにかけ、Geminin の発現動態と相関し特異的な発現動態を示す遺伝子を同定する。さらに、Geminin の発現制御の実験系を用いて Geminin の発現を制御して、標的遺伝子が Geminin の制御下にあることを検証し、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いての Geminin の直接的、あるいは間接的な標的遺伝子を同定するとともに、その制御がクロマチン制御を介しているかどうかを検証する。そして、マウスモデル系における白血病幹細胞制御の Geminin の分子機能を解明する。

3) ヒト白血病を用いた解析

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 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

造血幹細胞と白血病幹細胞の活性制御を解析するために、造血幹細胞に Geminin 発現ベクターを導入するために、これまでに樹立したレトロウィルスの系を改良しさらに効率よく Geminin を導入することが可能になった。さらに、Geminin タンパク質を直接細胞に導入することのできる膜透過型 Geminin の開発に成功した(論文投稿中)。現在はこの発現系と直接導入系、shRNA による発現抑制系を駆使し、造血幹細胞での Geminin の発現制御に試みている。また、Geminin-EYFP トランスジェニックマウスを用いた解析から、Geminin の発現が無いとされた G1/G0 期の造血幹細胞の集団に Geminin の発現が少量ある Geminin-Low の分画を見出すことに成功し、この細胞群の造血システムにおける役割に着いて解析を進めている。白血病幹細胞にお

ける Geminin の分子機能について解析を進めるため、Geminin-EYFP マウスに白血病誘導遺伝子をレトロウィルスで導入する系を樹立し、現在解析を進めている。さらに、ヒトの白血病細胞を移植するための BRGS マウスを繁殖しており、十分なマウス数を確保次第移植実験を開始する予定である。

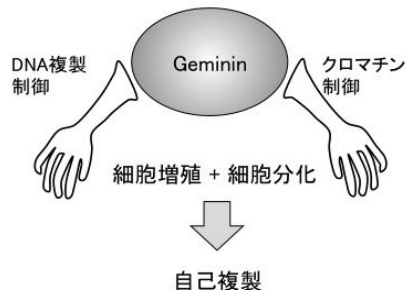


図1、造血幹細胞と白血病幹細胞における中核因子Geminin

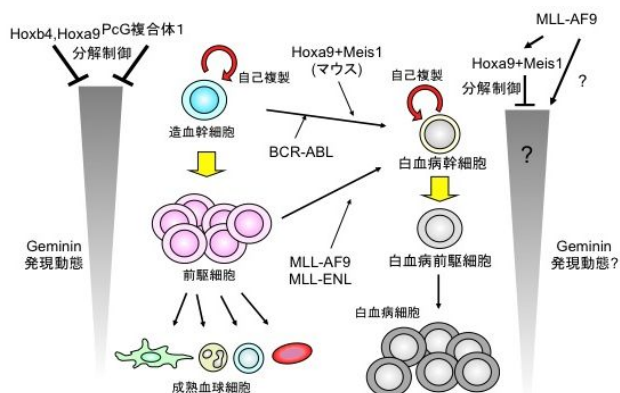


図2、正常造血幹細胞と白血病幹細胞の成立

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 2件)

1. Manipulation of Cell Cycle and Chromatin Configuration by Means of Cell-Penetrating Geminin. Ohno Y, Suzuki-Takedachi K, Yasunaga S, Kurogi T, Santo M, Masuhiro Y, Hanazawa S, Ohtsubo M, Naka K, Takihara Y. PLoS One. 2016 May 19;11(5):e0155558. (査読有り)
2. 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. (査読有り)

〔学会発表〕(計 6件)

1. 2015年第38回日本分子生物学会学術集会
 - 竹立恭子、大野芳典
 - DNA複製とクロマチンリモデリングを制御するCell-penetrating(CP)-Gemininの開発
 - 2015年12月1日～12月4日
 - 神戸 神戸ポートランド
2. 2015年第77回日本血液学会学術集会
 - 大野芳典
 - A new strategy for manipulating expression and activity of Geminin, a cell-fate determinant for HSCs
 - 2015年10月16日～10月18日
 - 金沢 石川県立音楽堂
3. 2015年第13回幹細胞シンポジウム
 - 大野芳典
 - Manipulation of Geminin activity by using cell-penetrating Geminin and its domain-specific mutants
 - 2015年5月29日～5月30日
 - 東京 東京大学伊藤国際学術研究センター
4. 2014年第37回日本分子生物学会学術集会
 - 黒木利和、大野芳典
 - Cell-penetrating recombinant Geminin protein may provide a new strategy for regulating self renewal and cellular differentiation in hematopoietic stem cells
 - 2014年11月25日～11月27日
 - 横浜 パシフィコ横浜
5. 2014年第76回日本血液学会学術集会
 - 大野芳典
 - Direct transmission of a cell-penetrating form of Geminin, a regulator for hematopoietic stem cells
 - 2014年10月31日～11月02日
 - 大阪 大阪国際会議場

〔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