

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：32692

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893292

研究課題名(和文)白血病細胞の増殖を制御するシグナル分子機構の解明

研究課題名(英文)Elucidating the mechanisms to Signal molecular mechanisms that control the growth of leukemia cells

研究代表者

奥橋 佑基 (OKUHASHI, Yuki)

東京工科大学・医療保健学部・助教

研究者番号：90734715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：HedgehogシグナルとWntシグナル、Notchシグナルはがん細胞の増殖に関与していることが知られているが、具体的なメカニズムはまだ明らかになっていない。本研究では、Hedgehogシグナル関連遺伝子のGLI-1 siRNAとWntシグナル関連遺伝子のCTNNB1 siRNAを用いて、シグナルへの効果とその関係性を明らかにする研究を行った。

その結果、NB4細胞株において、Wnt、Hh、Notch、mTORシグナル間に相互作用が存在する可能性が示唆された。症例ごとの白血病幹細胞の特性を検出する分子学的検査法の開発や、分子標的薬の選択に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Although Hedgehog (Hh) and Wnt signaling pathways are known to play a role in cancer cell growth, their specific effects on leukemia cells are not fully understood. To clarify the effects of siRNA-mediated knockdown of GLI1 and Catenin beta 1 (CTNNB1), which respectively mediate Hh and Wnt signaling, on cell proliferation as well as Notch and mTOR signaling were studied in leukemia cell lines.

siRNA-mediated knockdown experiments suggested that Hh and Wnt signaling had insignificant effect on the proliferation of the leukemia cell lines used in this study. In NB4 cells, GLI1 as well as CTNNB1 knockdown increased the level of NOTCH1, the cleaved NOTCH1 fragment, HES1, and phosphorylated mTOR protein.

In this study, we report a novel interaction, namely, the activation of Notch and mTOR signaling by the suppression of Hh and Wnt signaling in NB4 cells. The molecular mechanism and significance of this phenomenon as well as its translation to other cell lines needs further examination.

研究分野：病態検査学

キーワード：白血病 シグナル伝達 siRNA 臨床血液学

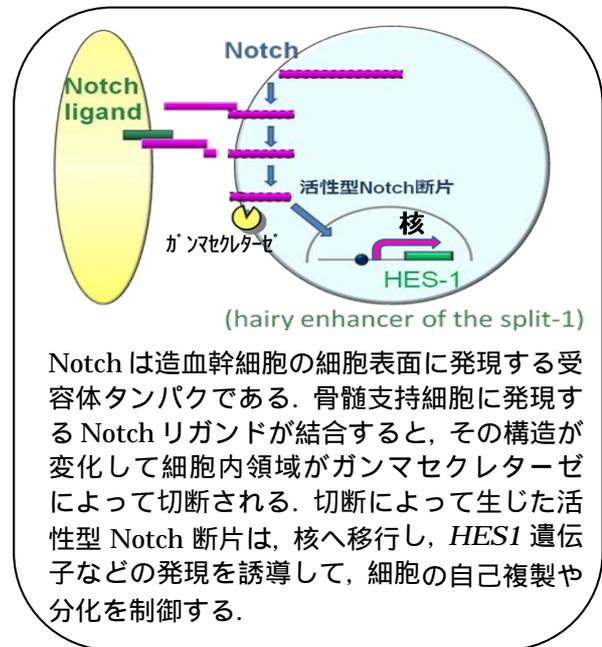
1. 研究開始当初の背景

白血病は造血幹細胞が腫瘍化して生じた白血病幹細胞の自己複製能亢進と分化停止によって、無制限に白血病細胞が増殖する疾患である。幹細胞の自己複製や分化には Notch, Wnt, Hedgehog シグナルなどのさまざまなシグナルが関与することが知られている (図 1, 2, 3)。これらのシグナルの異常による過剰な自己複製と分化抑制が白血病発症に関わる可能性がある。実際、急性 T リンパ芽球性白血病 (T-ALL) の半数の症例に NOTCH1 遺伝子変異があることが報告され (Weng et al. Science, 306: 269, 2004), 研究代表者も急性骨髄性白血病にも Notch1 タンパクに異常があることを報告し、白血病細胞の増殖における Notch シグナルの分子メカニズムの一端を解明した (Okuhashi et al. Anticancer Res, 33: 4293, 2013)。

研究開始当初までに、研究代表者は白血病細胞の増殖と分化には Notch, Wnt, Hedgehog シグナルが関与しており、Notch シグナル阻害剤の  $\gamma$ -secretase inhibitor (GSI), Wnt シグナル阻害剤の Quercetin, Hedgehog シグナル阻害剤の Cyclopamine はそれぞれ細胞増殖抑制効果があり、白血病の有用な治療法になる可能性があることを見出した (Okuhashi et al. Anticancer Res, 31: 893, 2011)。しかし、シグナル阻害剤の基質は他のタンパクにも多く存在するため、阻害剤が目的とするシグナル伝達系以外に作用した結果、細胞の増殖が抑制された可能性が考えられた。従って、阻害剤の作用の分子機序を明らかにする必要がある。

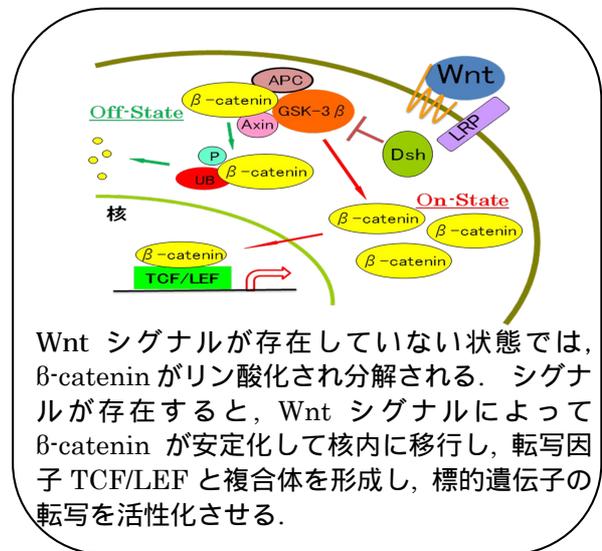
また、Notch, Wnt, Hedgehog シグナルは相互的に作用している可能性が示唆されたが、それぞれのシグナルがシグナル伝達系のどこで関わっているのか具体的にはまだ明らかになっていない。さらに、T-ALL の増殖には Notch1 だけでなく Notch2 も関与していることを見出したが、詳細な分子機序は不明であった。白血病細胞の増殖、分化におけるシグナル伝達系の分子機序がより明らかになれば、新たな分子標的薬の開発や分子生物学的検査法の確立等が期待される。よって、白血病細胞の増殖と分化におけるシグナル伝達系の分子機序を明確にすべきであると考えられる。

以上を踏まえ、Notch, Wnt, Hedgehog 関連遺伝子の発現がそれぞれのシグナル伝達系へ与える作用および白血病幹細胞の増殖と分化に与える効果を検討し、阻害剤を用いたこれまでの研究から生じた問題点を解決する研究を計画した。



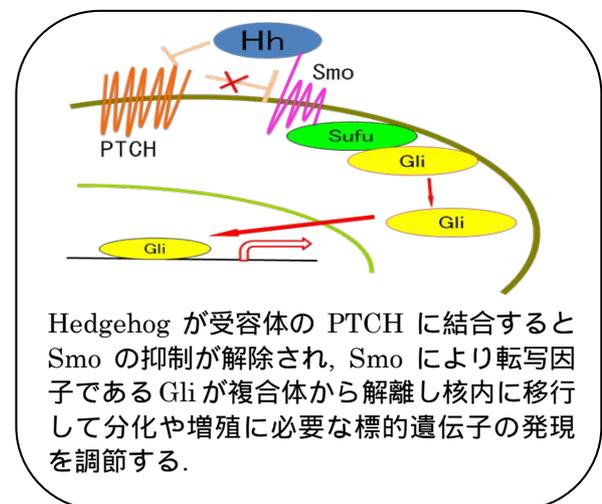
Notch は造血幹細胞の細胞表面に発現する受容体タンパクである。骨髄支持細胞に発現する Notch リガンドが結合すると、その構造が変化して細胞内領域がガンマセクレターゼによって切断される。切断によって生じた活性型 Notch 断片は、核へ移行し、HES1 遺伝子などの発現を誘導して、細胞の自己複製や分化を制御する。

図 1 . Notch シグナル



Wnt シグナルが存在していない状態では、 $\beta$ -catenin がリン酸化され分解される。シグナルが存在すると、Wnt シグナルによって  $\beta$ -catenin が安定化して核内に移行し、転写因子 TCF/LEF と複合体を形成し、標的遺伝子の転写を活性化させる。

図 2 . WNT シグナル



Hedgehog が受容体の PTCH に結合すると Smo の抑制が解除され、Smo により転写因子である Gli が複合体から解離し核内に移行して分化や増殖に必要な標的遺伝子の発現を調節する。

図 3 . Hedgehog シグナル

## 2. 研究の目的

本研究は白血病細胞の増殖における Notch, Wnt, Hedgehog シグナル伝達系の効果とその分子メカニズムを明らかにし, より効果的な分子標的治療薬の標的分子の発見を目指し, 以下のことを明らかにすることを目的とする。

(1) Wnt シグナルを介在する  $\beta$ -Catenin をコードする CTNNB1 遺伝子, Hedgehog 関連遺伝子である GLI1 遺伝子の発現をそれぞれノックダウンさせ, 白血病細胞の増殖への作用を明らかにする。

(2) Notch, Wnt, Hedgehog 関連遺伝子の siRNA を混合させて白血病細胞に導入することで, 細胞増殖に相乗的な効果が得られないかを調べる。

(3) Notch, Wnt, Hedgehog シグナルの抑制が細胞の分化や増殖に関与している mTOR シグナル伝達系などの他のシグナル伝達系へ及ぼす効果を研究する。

(4) (3) で相互作用が確認された場合, そのシグナル伝達系の関連遺伝子の発現もノックダウンし, 白血病細胞の増殖への効果を検討する。

## 3. 研究の方法

細胞: 白血病細胞株 10 株を用いた。

### 【siRNA の導入効率の検討】

Wnt シグナル関連遺伝子である CTNNB1 の siRNA (siCT) と, Hedgehog シグナル関連遺伝子である GLI1 の siRNA (siGT) をそれぞれ, エレクトロポレーション装置を用いて細胞内に導入後, 以下の条件で液体培養する。

未処理の細胞

Control siRNA (siCont)を導入した細胞

siCT を導入した細胞

siGT を導入した細胞

目的の遺伝子の発現が抑制されたかどうかを測定する方法として,

(1) 細胞から RNA を抽出し, cDNA を合成後, 定量 RT-PCR 法によって, 目的遺伝子である CTNNB1 と GLI1 の mRNA 発現量の変化を解析する。

(2) 細胞からタンパクを抽出し, イムノブロット法によって, 目的タンパクである  $\beta$ -Catenin タンパクと GLI1 タンパクの発現量を解析する。

### 【細胞の分化の検討】

siRNA 導入後の細胞の分化の有無を, ライト染色とフローサイトメトリによって評価する。

### 【siRNA による遺伝子発現量の解析】

~ で記した条件で液体培養後, 抽出した RNA から cDNA を合成し, 発現に変化が予測される Wnt, Hedgehog シグナルの下流

に存在する関連遺伝子に対し, 定量 RT-PCR 法を用いてその変化を解析する。さらに, Akt, mTOR, BCL-XL, CyclinD1, MYC, GATA-1 等の他のシグナル伝達関連遺伝子発現量の変化を解析する。

### 【siRNA によるタンパク発現の検討】

遺伝子発現量の解析で mRNA 発現量に変化が認められた遺伝子のタンパクに対する抗体を用いて, イムノブロット法によるタンパクの発現や活性化の変化を調べる。

## 4. 研究成果

用いたすべての細胞株において, 定量 RT-PCR では siCT 導入で CTNNB1 遺伝子の mRNA 発現量が有意に減少し, イムノブロットでは, siCT 導入により  $\beta$ -Catenin タンパクが減少した。siGT 導入で GLI1 遺伝子の mRNA 発現量が減少した。これらの結果から, 用いた siRNA が標的とする遺伝子をノックダウンしていることを確認した。

また, これらの細胞株に siCT と siGT をそれぞれ単独で導入した結果, 細胞増殖に大きな変化はみられなかった。さらに, siCT と siGT 2 種類の siRNA と Notch シグナルをノックダウンさせる Notch1 siRNA (siN1) を混合して細胞株に導入したが, 増殖に相乗効果は認められなかった。なお siN1 を用いて Notch シグナルをノックダウンさせて白血病細胞の増殖作用を解析した研究は研究代表者により完了しており, Notch シグナルが白血病細胞の増殖に関与していることを海外学術誌に報告している。

イムノブロットでは, AML の NB4 において, siCT 導入で活性型 Notch1 タンパク, HES1 タンパク, MYC タンパク, リン酸化 mTOR タンパクの増加が認められた。siGT 導入でも上記と同じタンパクの増加が認められただけでなく,  $\beta$ -Catenin タンパクの増加がみられた。他の細胞株では siRNA が標的とするタンパク以外の変化は認められなかった。

本研究から, 一部の白血病細胞において Wnt シグナルや Hedgehog シグナルは細胞増殖に必須ではないが, Wnt, Hedgehog, Notch, mTOR シグナル間に相互作用が存在する可能性が示唆された (図 4)。白血病細胞におけるこれらのシグナル相互作用は既にくつか報告されているが, siRNA によってシグナルの相互作用を明らかにした実験は本研究が初である。白血病細胞の増殖におけるシグナル伝達系の分子機序が解明されれば, 症例ごとの白血病幹細胞の特性を検出する新たな分子生物学的検査法の開発や, 副作用が少ない分子標的薬の選択に役立つことが期待される。

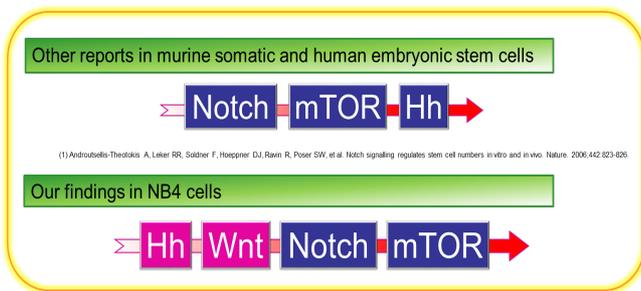


図4．本研究から新たに示唆されたシグナル間のクロストーク

## 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 0件)

〔学会発表〕(計 3件)

奥橋佑基, Notch シグナル阻害剤に耐性を示す白血病細胞の分子病態, 第62回臨床検査医学会学術集会, 2015年11月20日, 長良川国際会議場・岐阜都ホテル(岐阜県・岐阜市)

Yuki Okuhashi, Effects of *GLI1* and *CTNNB1* Knockdown on Notch Signaling and Proliferation of AML and T-ALL Cell Lines. 56th ASH Annual Meeting and Exposition. 2014年12月6日, Moscone Center, San Francisco, CA (United States of America)

奥橋佑基, Wnt シグナル, Hedgehog シグナル関連遺伝子のノックダウンが及ぼす白血病への効果, 第61回日本臨床検査医学会学術集会, 2014年11月24日, 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

〔その他〕

第62回日本臨床検査医学会 国際学会奨励賞, 2015年11月20日

## 6．研究組織

(1)研究代表者

奥橋 佑基 (OKUHASHI Yuki)  
東京工科大学・医療保健学部・助教  
研究者番号: 90734715