

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17824

研究課題名(和文)ゲノム編集技術を用いた白血病幹細胞の分化制御に関わる因子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification of regulator of differentiation of leukemia stem cell using genome editing system

研究代表者

倉吉 健太 (kurayoshi, kenta)

金沢大学・がん進展制御研究所・博士研究員

研究者番号：00802901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：急性骨髄性白血病(AML)は、造血幹・前駆細胞から生じる悪性腫瘍で、異常増殖と分化不全を特徴とする。白血病幹細胞の未分化性維持に必須な転写因子FOXOの機能解析の過程で、分化が解糖系をはじめとした代謝制御と深く関連していることを見いだした。本研究では、FOXO下流の代謝関連遺伝子に着目し、未分化維持因子の探索を進めるとともに、生体に存在するすべての代謝酵素、トランスポーターを対象にCRISPR機能的スクリーニングを行い、白血病幹細胞の未分化性に寄与する代謝制御機構を解析した。未分化維持に寄与する代謝酵素を複数同定した。また、その阻害剤は白血病細胞特異的に抗増殖作用を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

すべての代謝酵素、トランスポーターを対象として未分化維持因子を網羅的に探索した結果、未分化維持に寄与する代謝酵素を複数同定した。本研究により、未分化維持に特に重要な経路及び代謝分子を特定することができ、代謝による未分化維持機構の一端が明らかとなった。また、代謝酵素の活性阻害は白血病特異的に抗増殖作用を示した。その研究成果は、将来、白血病患者に対して有用な治療薬の開発につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Acute myeloid leukemia (AML) is malignant disease characterized by abnormal proliferation and differentiation blockade. We have found that metabolic reprogramming including glycolysis are related with differentiation in the process of research into FOXO's function. In this project, regulators of differentiation blockade are explored from FOXO target genes related with metabolism or all metabolic enzymes and transporters using CRISPR Cas9 screening. We have found that some metabolic enzymes play pivotal role in differentiation blockade. Moreover, the inhibitor represses proliferation of leukemia specifically.

研究分野：造血器腫瘍

キーワード：分化 代謝

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病 (AML) は、造血幹・前駆細胞から生じる悪性腫瘍で、骨髄球系細胞の異常増殖と分化不全を特徴とする。AML では、特に未分化な形質を示す集団、いわゆる白血病幹細胞が存在することが知られ、抗がん剤に対して抵抗性を示す。従って、その未分化維持機構を理解し、分化誘導法を開発することは、白血病根治に向けて重要な課題と言える。申請者らは、造血幹細胞の未分化性制御の基本原理の解明を目指し、転写因子 FOXO に着目し、造血幹細胞および白血病幹細胞での未分化性維持機構を解析してきた。その過程で、FOXO 阻害剤 (AS1842856) は複数の AML 細胞株の分化誘導効果、最終的に増殖停止に導くこと、ゼノグラフト系において、生体内で AML 分化誘導効果と増殖抑制効果を示すこと、10-100nM のレベルでは臍帯血由来造血幹細胞 (CD34⁺) には強い影響を及ぼさない一方で、AML 患者由来白血病幹細胞 (CD34⁺) から前駆細胞 (CD34⁻) 細胞への分化誘導効果を示唆するデータを得られた。このことから、FOXO により制御を受ける分子群の中に白血病幹細胞特異的に未分化維持に寄与する遺伝子が存在することが判明した。

FOXO 阻害剤処理した後、遺伝子発現量解析を行い、247 遺伝子の候補分子を得た。これら FOXO 下流候補分子すべてに対する sgRNA ライブラリーを作製し、これらの分子の機能評価を行った。スクリーニングの結果、5 つの分子 (RUNX1, ZEB2, L-Myc, SLC38A2, GOLGA80) の欠損が白血病細胞の増殖を停止することが判明した。L-Myc は、糖、脂質など多彩な代謝制御に関わる Myc ファミリーに属す。SLC38A2 は、アミノ酸トランスポーターとして中性アミノの取り込みに寄与する。さらに、FOXO 阻害剤は優位に解糖系を活性化した。これらのことから、糖やアミノ酸を含む代謝制御が、白血病幹細胞の未分化維持に関与している可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、FOXO により制御を受ける代謝調節分子、特に L-Myc, SCL38A2 に焦点をあて、白血病幹細胞の未分化維持に関わる分子機構を理解する。さらに、生体に存在するすべての代謝酵素、トランスポーターを対象に CRISPR 機能的スクリーニングを行い、白血病幹細胞に寄与する代謝制御機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) FOXO 下流の代謝分子の未分化性維持への寄与

遺伝子破壊細胞を作成した後、分化マーカー CD11b および形態変化を指標に判定した。

(2) 未分化維持に寄与する代謝分子の特定

CRISPR/Cas9 スクリーニングを用いて未分化維持に寄与する代謝分子を探索した。sgRNA を細胞内に導入した後、分化マーカー CD11b を指標に分化細胞を sort し、未分化維持に寄与する sgRNA のセレクションを行った。その後、PCR にて sgRNA を単離した後、LentiCRISPRv2 に再導入し、同様なセレクションを繰り返した。そのセレクションにより濃縮された sgRNA を次世代シーケンサーにて同定することで、未分化維持因子候補を特定した。個々の sgRNA を細胞に再導入し、sgRNA の分化誘導能を確認することで、未分化維持因子を確定した。また、その阻害剤が遺伝子破壊と同様に分化および増殖阻害を誘導するかを検討した。

(3) スクリーニングで同定した因子の阻害剤の薬効評価および作用機序の同定

阻害剤が正常造血に比べ、白血病細胞特異的に抗増殖作用を示すかをコロニー形成アッセイにて検討した。その作用機序を調べるために、トランスクリプトーム解析を行った。発現変動を示した因子を過剰発現もしくは遺伝子破壊することで、薬剤による分化誘導および増殖停止を阻害するかを検討した。

4. 研究成果

(1) FOXO 下流の代謝分子の未分化性維持への寄与

SLC38A2 及び L-Myc の遺伝子破壊は、増殖阻害、細胞死を誘導した。しかしながら、SLC38A2 及び L-Myc の遺伝子破壊は分化マーカーCD11b の増加および形態変化を誘導せず、SLC38A2 及び L-Myc は未分化維持には寄与しないことが判明した。

(2) 未分化維持に寄与する代謝分子の特定

すべての代謝酵素、トランスポーターを対象とした sgRNA ライブラリーを作成し、未分化維持に寄与する遺伝子を探索した。その結果、すでに未分化維持に寄与すると報告のある LSD1 (lysine-specific demethylase 1) が hit 遺伝子の候補に含まれており、本スクリーニングが機能していたことを支持する。また、個々の sgRNA を細胞に再導入し分化誘導作用の再確認を行った。その結果、電子伝達系、鉄の恒常性維持、リソソームの機能維持に関わる遺伝子が未分化維持に寄与することが明らかとなった。特に、リソソームの機能維持に関わる遺伝子の破壊は顕著に分化を誘導した。また、リソソームの阻害剤も分化誘導および増殖阻害作用を示した。従って、リソソームの機能維持が白血病細胞の未分化維持に重要であることが判明した。

(3) スクリーニングで同定した因子の阻害剤の薬効評価および作用機序の同定

リソソームの活性は白血病細胞で亢進している。そこで、リソソーム阻害剤は白血病細胞特異的に抗増殖作用を示す可能性を考え、その薬効を正常造血細胞および白血病細胞で比較した。その結果、リソソーム阻害剤は白血病細胞で特異的にコロニー形成能を低下させた。従って、リソソームは白血病の治療標的として有望であることが示唆された。リソソームは鉄の恒常性維持に必須の役割を果たす。また、本スクリーニングにおいて、鉄の恒常性維持に寄与する遺伝子を未分化維持因子として同定した。従って、リソソーム阻害剤による分化誘導に鉄が寄与する可能性が考えられた。そこで、リソソームの阻害剤に加え鉄を添加したところ、その薬剤による分化誘導および増殖停止が阻害された。従って、リソソームは鉄の恒常性の維持することで未分化性維持に寄与することが明らかとなった。また、その作用機序を調べるために、トランスクリプトーム解析を行った。リソソーム阻害剤は分化誘導因子 HIF の標的遺伝子の発現を亢進し、鉄の添加はその発現亢進を阻害した。そこで、HIF1a および 2a の遺伝子破壊細胞を作成し、リソソーム阻害剤による分化誘導への影響を調べた。しかしながら、HIF1a および 2a の遺伝子破壊はリソソーム阻害剤による分化誘導を減弱しなかった。従って、HIF1a および 2a はリソソーム阻害剤による分化誘導に寄与しないことが明らかとなった。また、リソソーム阻害剤は未分化維持に寄与するがん遺伝子の発現を低下させた。そこで、そのがん遺伝子の過剰発現細胞を作成し、リソソーム阻害剤による分化誘導作用への影響を調べたところ、分化誘導が部分的に阻害された。従って、リソソーム下流の未分化維持因子を同定することができた。以上本研究により、リソソーム-鉄経路が白血病の未分化維持に寄与すること、また、その下流分子を特定することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 倉吉健太、上野将也、高瀬雄介、布施香子、大田久美子、田所優子、平尾敦
2. 発表標題 FOXOによる白血病細胞分化制御機構の解明
3. 学会等名 第24回造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 倉吉健太、上野将也、高瀬雄介、布施香子、大田久美子、田所優子、平尾敦
2. 発表標題 白血病細胞未分化制御機構の解明による治療法開発
3. 学会等名 金沢大学がん進展制御研究所・国立がん研究センター研究所 若手研究発表会
4. 発表年 2020年

〔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
---------	---------