

16 - 9 造血器腫瘍における染色体転座関連遺伝子の基礎的・臨床的研究

主任研究者 国立がんセンター 北 林 一 生

研究成果の要旨

急性白血病において最も高頻度に染色体転座の標的となる AML1 遺伝子が ETO 遺伝子と融合する 8;21 転座型急性骨髄性白血病では c-Kit の点変異が高頻度に検出されることを確認し、これらの患者は予後が非常に不良であり、試験管内実験によりイマチニブが有効である可能性が示された。AML1 遺伝子の白血病関連点突然変異である R139Q、R174Q、そして R177Q を導入した遺伝子改変マウスを作製し、これらの点突然変異が AML1 の生物作用を完全に廃絶させること、AML1 は HIPK2 によりリン酸化されて AML1 複合体による転写が促進されることを明らかにした。また、急性骨髄性白血病に観察された inv(12)(p13q13)より新規キメラ遺伝子 TEL/PTPRR をクローニングし、TEL/PTPRR 遺伝子産物はがん抑制因子 TEL に対するドミナント・ネガティブ効果と STAT3 シグナルの恒常的活性化効果により白血病を発症すると結論された。一方、t(15;17)転座により生じる PML-RARα が転写コリプレッサー N-CoR と直接結合して N-CoR を細胞質にリクルートすることにより小包体依存的に分解すること、NUP98-HOXA9 の協調遺伝子 DnalC4 は Bim と結合し細胞死を抑制すること、Bcl11a は B 細胞分化に必須で、cell non-autonomous に胸腺リンパ腫を誘導することを見い出した。

研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
北 林 一 生	国立がんセンター研究所 部長	AML1 複合体因子の機能解析
三 谷 絹 子	獨協大学 教授	12p13 転座型白血病の発症機構の解析
中 村 卓 郎	財団法人癌研究会癌研究所 部長	マウスモデルを用いた転座関連遺伝子の解析
石 井 俊 輔	理化学研究所・筑波研究所 主任研究員	PML と核内構造体の基礎的研究
稲 葉 俊 哉	広島大学・原爆放射線医科学研究所 教授	AML1 遺伝子変異と協調して白血化を促進するパートナー遺伝子異常の同定と機能解析
奥 田 司	京都府立医科大学大学院医学研究科 講師	AML1 遺伝子機能の基礎的・臨床的研究
辻 村 秀 樹	千葉県がんセンター 医長	B 細胞性リンパ腫の発症と予後における t(14;18)転座と、転写因子 IRF-4 および IRF-8 の役割に関する検討

総括研究報告

1 研究目的

ヒト白血病では高頻度に特異的な染色体転座が見られ、

その結果生じる融合遺伝子産物の発現やがん遺伝子の発現異常が発症に関与する。このなかで AML1 及び PML 遺伝子は、ヒト白血病において最も高頻度に染色体転座の標

的となり、他の遺伝子と融合して異常な融合蛋白質を生じる。また、AML1 の機能を損なう点変異も多く報告されていて、AML1 の機能異常が白血病発症に深く関与すると考えられる。AML1 は成体型造血に必須でありことが示されており、様々な造血細胞特異的な遺伝子の発現を制御することにより造血細胞の分化・増殖を制御すると考えられる。最近、本研究班主任研究者の北林らにより急性白血病における染色体転座の主要な標的である AML1 及び PML が複合体として作用することが明らかにされた。本研究は、AML1 及び PML などの染色体転座関連因子及びそれらの融合タンパク質の機能を明らかにして、それらの因子を分子標的とした白血病治療薬を開発するための基礎的な知見を得ることを目的とする。

白血病の分子標的治療薬として第一に考えられるのは、白血病特異的に発現する融合蛋白質の活性を抑制する薬剤である。既に臨床応用されているイマチニブ（グリベックTM）は慢性骨髄性白血病において 90% 以上で発現する BCR-ABL 融合チロシンキナーゼを特異的に阻害する。しかしながら、急性白血病では染色体転座の種類が多様で、急性骨髄性白血病で最も多いとされる AML1-MTG8、CBFb-MYH11、PML-RARα の発現はそれぞれ全体の 10-20% 程度であり、これらの融合蛋白質が共通の分子標的にはなりにくい。そこで、次に期待できる治療薬は、染色体転座の主要な標的である AML1 複合体を活性化する試薬である。これまでに機能が解析された AML1-MTG8、CBFb-MYH11、TEL-AML1、MOZ-CBP はいずれも AML1 に対しドミナントネガティブに作用し、AML1 による転写活性化を抑制することが明らかになっている。多くの白血病では対立遺伝子は正常であることから、正常な AML1 複合体も共存していると考えられ、融合蛋白質により抑制された AML1 複合体を再活性化する試薬が得られれば急性白血病の治療への応用が期待できる。イマチニブは Abl または Bcr-Abl キナーゼの阻害薬として開発されたが、c-Kit や PDGF 受容体の機能をも阻害する。実際、c-Kit 点変異を持つ gastrointestinal stromal tumor (GIST) や PDGF 受容体異常を有する好塩基球増多症にその適応は拡大している。AML 患者の中にもイマチニブが有効な症例があるという考えもあるが、これまでの試みは患者の選別を十分に行なっておらず、その結果は失望的であった。そこで 8;21 転座型 AML に高頻度に検出される c-Kit の点変異がイマチニブによる治療の対象となる可能性を考え、基礎的な検討をおこなった。

2 研究成果

AML1 の点突然変異のホットスポットのうち、R139Q、R174Q、R177Q の 3 種類についてノックイン法によってマウス胚細胞系列に導入し、その個体への影響について検討した。3 種類の変異を持つヘテロ接合マウスはいずれも健康に生誕し、生育し、さらに交配も可能であった。また、これまでのところいずれのヘテロ接合マウスにおいても成体における顕著な造血障害は観察されていない。白血球数、赤血球数さらに血小板数については、野生型の同胞と比較するかぎり、有意な違いはいまのところ見出せていない。また、血球の形態にも異常を認めなかった。すなわち、これらの点突然変異は、融合型 AML1 白血病遺伝子で観察されたような強いドミナント・ネガティブ作用を、少なくとも個体レベルにおいては、持たないものと考えられる。今後、これらの変異がもたらす生物作用の詳細について、遺伝子改変マウスの解析を通じて明らかにしてゆきたい。一方、いずれの点突然変異についても、そのホモ接合体は出生せず胎生期死亡となることが明らかになった。これらのマウスでは変異をヘテロで保有することになり、ヒト症例での白血病細胞内での遺伝学的状況を再現していることが予想される。しかしながら、これまでの観察では、その生存期間内には、白血病の自然発症が認められていない。このことから、AML1 の変異だけでは造血前駆細胞の完全な腫瘍化には至らず、白血病発症には付加的遺伝子変異の蓄積を要することが示唆される。

8;21 転座型白血病 47 例を検討したところ 12 例 (25.5%) にキナーゼ領域内の点変異を見出したが、傍細胞膜ドメイン内の変異はなかった。c-Kit 点変異を有する 8;21 転座型 AML 患者と有さない患者との間で、発症年齢や性比、染色体所見などに有意差はなかった。寛解導入成功率も両者とも 90% 以上であったが、再発率には大きな差が認められた。5 年以上の無病生存者は、c-Kit 変異のない 25 症例中 13 例に対し、変異のある 12 症例では 1 例のみであった。この結果は c-Kit 点変異を有する 8;21 転座型 AML は通常の治療に加えて、寛解持続期間を延長する追加治療を行なう必要があることを示している。c-Kit 変異 (Asn822Lys) を有する Kasumi-1 細胞株と変異のない SKNO-1 細胞株のイマチニブ感受性を検討した。Kasumi-1 はイマチニブ感受性で、Ph¹ 染色体陽性白血病由来の細胞株よりもむしろ低い濃度で細胞分裂が停止し、アポトーシスが誘導されたが、SKNO-1 は高濃度のイマチニブ存在下でも旺盛な増殖を続けた。無血清培養下で、

Kasumi-1 には強い自己リン酸化が見られ、イマチニブ添加によって脱リン酸化され、SKNO-1 では自己リン酸化がなかった。次に未治療の 8;21 転座型 AML 患者骨髓血から単核球を分離して短期培養を行ない、イマチニブ感受性を検討した。白血病細胞は c-Kit 変異の有無に関わらず、70%以上の細胞が分化しながら 4 日以上生存した。しかし通常濃度のイマチニブを加えると、c-Kit 変異のある 4 症例（全例 Asp816 変異）では生存率が 20%以下まで減少し、ほぼ死滅したのに対し、c-Kit 変異のない 4 症例ではイマチニブ非添加と区別がつかなかった。また c-Kit 変異のある症例では自己リン酸化が見られ、イマチニブにより脱リン酸化された。全 AML の約 15%が 8;21 転座を有しており、その約 25%が c-Kit 変異陽性であるとして、全 AML の 4%にイマチニブが効く可能性がある。このタイプの AML は通常の化学療法でほとんど CR に入るが、再発が非常に多いため、CR 導入後の寛解維持療法として、長期間（数年間）イマチニブを投与することが考えられる。

AML1 複合体をアフィニティー精製し、AML1 と共に精製される特異的なポリペプチドを同定した。これまでにヒストンアセチル化酵素 p300/CBP に加え、MOZ や mSIN3A・PML など様々なタンパク質が AML1 複合体に含まれることを明らかにしている。これらに加え約 150kD のポリペプチドはタンパク質リン酸化酵素 HIPK2 であることが明らかになった。AML1 と p300/CBP 及び MOZ との複合体はマウス骨髓性前駆細胞 M1 のマクロファージへの分化に伴って増加し、逆に転写コリプレッサーである mSIN3A との複合体はこの分化に伴って消失することが示された。これらのことから、AML1 複合体の変化が細胞分化における遺伝子発現の変化に重要な役割の担っていると考えられた。さらに M1 細胞の分化に伴って AML1 のリン酸化状態が変化し、未分化 M1 細胞では低リン酸化型 AML1 がドミナントであるが分化に伴って高リン酸化型の AML1 が増加してくることが示された。このリン酸化の変化は AML1 複合体の変化と良く一致した。これらの結果から、AML1 複合体の機能制御には AML1 のリン酸化が重要であると考えられた。リン酸化を制御するタンパク質リン酸化酵素の候補として、AML1 複合体に含まれる HIPK2 について検討したところ、確かに AML1 が HIPK2 によりリン酸化され、AML1 による転写を強く促進することが示された。特に AML1 による MOZ 或いは p300 との協調的な転写活性化を HIPK2 は促進し、これらの活性化は AML1 のリン酸化部位をアラニンに置換した変異体では殆ど見られなくなった。さらに HIPK2 は AML1 だけでなく、AML1 存在下で p300

や MOZ もリン酸化した。これらのリン酸化により、p300 のヒストンアセチル化活性は上昇し、MOZ と AML1 との結合は安定化することが明らかになった。これらの結果から、HIPK2 は AML1 との結合を介して p300 や MOZ をリン酸化し、AML1 複合体を活性化することが示唆された。HIPK2 を活性化するような試薬は白血病治療薬として期待できると考えられる。

急性骨髓性白血病に観察された inv(12)(p13q13)より新規キメラ遺伝子 *TEL/PTPRR* をクローニングした。*TEL/PTPRR* 遺伝子産物はがん抑制因子 TEL に対するドミナント・ネガティブ効果と STAT3 シグナルの恒常的活性化効果により白血病を発症すると結論された。ホスファターゼ・アッセイでは、野生型 PTPRR にはホスファターゼ活性が検出されたが、短縮型 TEL および TEL/PTPRR には検出されなかった。短縮型 TEL および TEL/PTPRR を GM-CSF 依存性の UT7/GM 細胞に遺伝子導入した。GM-CSF 非存在下では、モック細胞および短縮型 TEL 発現細胞は 1 週間以内に死滅したが、TEL/PTPRR 発現細胞は 28 日を過ぎても増殖を続けた。各種のシグナル伝達物質のリン酸化状態について検討したところ、STAT3 は GM-CSF 除去後モック細胞においては速やかに脱リン酸化されたのに対して、短縮型 TEL あるいは TEL/PTPRR 発現細胞においてはそのリン酸化状態は維持されていた。inv(12)型白血病の発症にはがん抑制因子 TEL の失活と STAT3 シグナルの活性化が関与している可能性が示唆された。ドミナント・ネガティブ効果の分子基盤としては、ヘテロダイマー形成による野生型 TEL の核内移行および DNA 結合の抑制等が考えられるが、STAT3 リン酸化の機序は不明である。しかしながら、短縮型 TEL と TEL/PTPRR の共通の機能のみでは白血病発症に至らないと考えられ、TEL/PTPRR の PTPRR 部分にホスファターゼ活性以外の何らかの未知の機能が存在することが推測される。

15;17 転座で生じる PML-RARα が転写コリプレッサー N-CoR と直接結合し、N-CoR を細胞質にリクルートし、ER (ER endoplasmic reticulum) 依存的に分解することを見出した。これは PML-RARα の N-CoR 分子の 2 ケ所に結合し、N-CoR 蛋白質のコンフォメーションが変化するため、N-CoR が unfolded 蛋白質として認識されるためと推定された。APL 由来の NB4 細胞において N-CoR を過剰発現させると分化が誘導されることから、細胞質の PML-RARα による N-CoR 蛋白質の分解は PML-RARα による白血病発症に、少なくとも部分的には、寄与していると考えられる。

骨髓顆粒球系に特異的に NUP98-HOXA9 が発現するトラ

ンスジェニックマウスでは約 20%に骨髓増殖症が発生し、さらに 1 年以上の経過を経て急性骨髓製白血病 (AML) が発生した。NUP98-HOXA9 トランスジェニックマウスと BXH2 マウスを交配し、発症した AML の共通レトロウィルス挿入部位から NUP98-HOXA9 の協調遺伝子として Meis1、Dnalc4、Fcgr2b/Fcrl、Con1、Con2 を同定した。Dnalc4 は、Dynein motor 複合体を構成する Dynein 軽鎖の一つをコードし、Bim に結合してアポトーシスを抑制する Dlc1 と相同性を有する。そこで、Dnalc4 にも同様の機能があるか検討した。Dlc1 と同様 Dnalc4 は Bim EL 及び Bim L と共沈することが明らかとなったが Bim S とは介合しなかった。IL-3 依存性の Ba/F3 細胞に Dnalc4 を導入すると、IL-3 非存在下での Ba/F3 細胞のアポトーシスを有意に阻害することが判明した。これらの結果から、Dnalc4 は Bim に結合し、その機能を抑制することでアポトーシスを阻害している可能性が考えられた。NUP98-HOXA9 tg/BXH2 マウス AML では Dnalc4 への挿入は単一の腫瘍でしばしば Meis1 への挿入と同時に認められることが示され、NUP98-HOXA9、Meis1 及び Dnalc4 の活性化は増殖 / 分化抑制 / アポトーシス阻害を引き起こす遺伝子変化の蓄積と考えられた。

3 倫理面への配慮

ヒト試料を研究に使用する際には、事前に各研究施設の倫理委員会の審査を受け、研究によって提供者の不利が生じない事と研究の科学的な妥当性を検討し、承認を得た後に行っている。動物実験については各研究施設の倫理審査委員会の審査を受け、承認を受けた後に動物の生命の尊重と苦痛をとまなう実験への十分な配慮のもとに実験を遂行している。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Hisa T, Nakamura T, et al. Hematopoietic, angiogenic and eye defects in Meis1 mutant animals. EMBO J. 23, 450-459, 2004
2. Nakamura T. Retroviral insertional mutagenesis identifies oncogene cooperation. Cancer Sci .96, 7-12, 2005
3. Iwasaki M, Nakamura T, et al. Identification of cooperative genes for NUP98-HOXA9 in myeloid leukemogenesis using a mouse model. Blood. 105, 784-793, 2005
4. Yamaguchi S, Nakamura T, et al. EWSR1 is fused to POU5F1 in a bone tumor with translocation t(6;22)(p21;q12). Genes Chromosomes Cancer. in press
5. Nakamura T. NUP98 fusion in human leukemia: dysregulation of the nuclear pore and homeodomain proteins. Int J Hematol. in press
6. Imai Y, Mitani K, et al.: The corepressor mSin3A regulates phosphorylation-induced activation, intranuclear location, and stability of AML1. Mol Cell Biol. 24, 1033-1043, 2004.
7. Maki K, Mitani K, et al.: Leukemia-related transcription factor TEL is negatively regulated through ERK-induced phosphorylation. Mol Cell Biol. 24, 3227-3237, 2004.
8. Yamaguchi Y, Mitani K, et al.: AML1 is functionally regulated through p300-mediated acetylation on specific lysine residues. J Biol Chem. 279, 15630-15638, 2004.
9. Ichikawa M, Mitani K, et al.: AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. Nat Med.10, 299-304, 2004. (Author list corrected in Erratum Nat Med. 11, 102, 2005.
10. Sasaki K, Mitani K, et al.: Functional analysis of a dominant-negative DETS TEL/ETV6 isoform. Biochem Biophys Res Comm. 317, 1128-1137, 2004.
11. Gunji H, Mitani K, et al.: TEL/AML1 shows dominant-negative effects over TEL as well as AML1. Biochem Biophys Res Comm. 322, 623-630, 2004.
12. Goyama S, Mitani K, et al.: The transcriptionally active form of AML1 is required for hematopoietic rescue of the AML1-deficient embryonic para-aortic splanchnopleural (P-Sp) region. Blood. 104, 3558-3564, 2004.
13. Mitani K: Molecular mechanisms of leukemogenesis by AML1/EVI-1. Oncogene. 23, 4263-4269, 2004.
14. Khan MM, Ishii S, et al.: The fusion oncoprotein PML-RAR α induces endoplasmic reticulum-associated degradation of N-CoR and ER stress. J. Biol. Chem., 279, 11814-11824, 2004.
15. Kanei-Ishii C, Ishii S, et al.: Wnt-1 signal

- induces phosphorylation and degradation of c-Myb protein via TAK1, HIPK2, and NLK. *Genes Dev.* 18, 816-829, 2004.
16. Nomura T, Ishii S, et al.: Oncogenic activation of c-Myb correlates with a loss of negative regulation by TIF1 β and Ski. *J. Biol. Chem.* 279, 16715-16726, 2004.
17. Kanei-Ishii C, Ishii S, et al.: Differential sensitivity of v-Myb and c-Myb to Wnt-1-induced protein degradation. *J. Biol. Chem.* 279, 44582-44589, 2004.
18. Tanikawa, J., Ishii S, et al.: p53 suppresses c-Myb-induced trans-activation and transformation by recruiting the corepressor mSin3A. *J. Biol. Chem.*, 279, 55393-55400, 2004.
19. Harada H, Inaba T, et al.: High incidence of somatic mutations in the AML1/RUNX1 gene in myelodysplastic syndrome and low blast percentage myeloid leukemia with myelodysplasia. *Blood.* 103, 2316-2324, 2004.
20. Matsunaga T, Inaba T, et al.: Regulation of annexin II by cytokine-initiated signaling pathways and E2A-HLF oncoprotein. *Blood.* 103, 3185-3191, 2004.
21. Takeshita A, Inaba T, et al.: Deletion 6p23 and add(11)(p15) leading to NUP98 translocation in a case of therapy-related atypical chronic myelocytic leukemia transforming to acute myelocytic leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* 152, 56-60, 2004.
22. Kuribara R, Inaba T, et al.: Roles of Bim in apoptosis of normal and Bcr-Abl-expressing hematopoietic progenitors. *Mol. Cell. Biol.* 24, 6172-6183, 2004.
23. Matsushita T, Inaba T, et al.: The Adenovirus E1A and E1B19K genes provide a helper function for transfection-based AAV vector production. *J. Gen.Virol.* 85, 2009-2014, 2004.
24. Inukai T, Inaba T, et al.: TEF, an anti-apoptotic bZIP transcription factor related to the oncogenic E2A-HLF chimera, inhibits cell growth by downregulating expression of the common β chain of cytokine receptors. *Blood.* *in press*
25. Matsui H, Inaba T, et al.: Structure of the human Bim gene and its transcriptional regulation in Baf-3, interleukin-3-dependent hematopoietic cells. *Mol. Biol. Rep.* *in press*
26. Nishimura M, Okuda T, et al.: VWRPY-motif-dependent and -independent roles of AML1/Runx1 transcription factor in murine hematopoietic development. *Blood.* 103, 562-570, 2004.
27. Nakao M, Okuda T, et al.: Novel loss-of-function mutations of the haematopoiesis-related transcription factor, AML1/RUNX1, detected in acute myeloblastic leukaemia and myelodysplastic syndrome. *British Journal of Haematology.* 125, 709-719, 2004.
28. Fukushima-Nakase Y, Okuda T, et al.: Shared and distinct roles mediated through C-terminal subdomains of Acute Myeloid Leukemia/Runt-related transcription factor molecules in murine development. *Blood*, *in press*.
29. Yasuda J, Kitabayashi I, et al. Nemo-like kinase suppresses a wide range of transcription factors, including nuclear factor-kappaB. *Cancer Sci.* 95, 52-57, 2004.
30. Yaguchi H, Kitabayashi I, et al. Menin missense mutants associated with multiple endocrine neoplasia type 1 are rapidly degraded via the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol Cell Biol.* 24, 6569-6580, 2004.
31. Yokoyama A, Kitabayashi I, et al. Leukemia proto-oncoprotein MLL forms a SET1-like histone methyltransferase complex with menin to regulate Hox gene expression. *Mol Cell Biol.* 24, 5639-5649, 2004.
32. Nguyen LA, Kitabayashi I, et al. Physical and functional link of the leukemia-associated factors AML1 and PML. *Blood*, **105**, 292-300, 2005.
33. Kishimoto M, Kitabayashi I, et al. Mutations and Deletions of the CBP Gene in Human Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*, **11**, 512-519, 2005.