

## 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

白血病関連因子 AML1 は、CBFb, p300, MOZ, PML, HIPK1/2 と複合体を形成し、MOZ 及び HIPK1/2 は成体型造血に必須であることを明らかにした。AML1/EVI-1 ヘテロノックインマウスは、成体型造血における著しい分化障害を認めた。急性骨髄性白血病に観察される inv(12)(p13q13) より TEL/PTPRR をクローニングした。TEL/PTPRR は STAT3 を恒常的にリン酸化し、GMS-CSF 依存性の細胞株を非依存的に増殖させた。白血病で見られる AML1 遺伝子の変異 R139Q、R174Q、R177Q、I150ins について遺伝子改変マウスを作製し、これらの変異はすべて AML1 の生物作用を完全に廃絶させるものであることを明らかにした。TEL-AML1 融合遺伝子をマウス造血幹細胞に導入すると、B 細胞の分化阻害がみられた。TEL-AML1 白血病臨床検体を対象に、アレイ CGH 解析により二次的遺伝子異常につき検討し、全例で複数の遺伝子異常を見出した。HoxA9 と Meis1 の共発現による AML の発症における協調遺伝子候補として Trib1、Evi1、Ahl1、Rara、Pitpnb、AK039950 を同定した。Trib1 と Evi1 はレトロウィルスの挿入により発現が亢進し、HoxA9 と Meis1 による白血病発症を促進した。7 番染色体長腕(7q)領域の AML や MDS の発症を抑制する遺伝子を同定するため、長鎖 PCR 支援マイクロアレイ CGH 法を独自に開発し、7q 領域内にある共通微小欠失領域の三つの遺伝子を同定した。

### 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
都 築 忍	1*愛知県がんセンター 室長	TEL-AML1 転座型急性リンパ性白血病の発症機構解析
辻 村 秀 樹	*2千葉県がんセンター 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

\* 1 平成 17 年 4 月～平成 18 年 3 月

\* 2 平成 16 年 4 月～平成 17 年 3 月

## 総合研究報告

## 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おり、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。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分子生物学的、細胞生物学的、発生工学的に解析することにより、白血病発症の機構を解明し、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。また、白血病発症には染色体転座に加えて多段階の遺伝子変化の重積が必要である。キメラ遺伝子等の発がんの初期に必要な遺伝子変化に特異的に協調作用を示す遺伝子異常を同定し、多段階発がんの分子機構・分子経路を明らかにすることにより、白血病の顕在化や悪性化を防ぐ分子標的治療法の開発に応用する。

## 2 研究方法

マウス AML1 遺伝子の第5エクソンにヒト *EVI-1* cDNA をイン・フレームでつなげたノックイン・ターゲティングベクターを構築し、AML1/*EVI-1*ヘテロノックインマウスを作製した。胎仔肝細胞の形態観察、コロニー・アッセイ、継代培養アッセイ、造血系転写因子の発現解析を行った。一方、*TEL/PTPRR* をクローニングし、細胞内局在を検討するとともに、DNA 結合能（ゲルシフト・アッセイ）と転写抑制能（レポーター・アッセイ）を解析した。さらに、GM-CSF 依存性のヒト白血病細胞株 UT-7/GM に遺伝子導入して増殖能への影響を解析するとともに、各種のシグナル伝達経路の活性化状態を検討した。

白血病で見られる AML1 遺伝子の点突然変異のホットスポットのうち R139Q、R174Q、R177Q の3種類、挿入型変異である I150ins をあわせた計4種類の変異をマウス AML1 cDNA に導入した。次いで ES 細胞での相同組換えを用いて AML1 遺伝子座のエクソン4に変異マウス cDNA をインフレームで挿入した。相同組み換え体 ES 細胞を用いて、定法どおり胚細胞系列に変異が伝達されたマウス系

列を樹立した。

CGH (comparative genomic hybridization) 法・アレイ CGH 法を用いて TEL-AML1 白血病臨床検体における遺伝子の量的異常を網羅的に分析した。

Dnalc4 及び Bim 遺伝子を細胞に導入して免疫沈降法により両者の相互作用を解析するとともに、Dnalc4 を Ba/F3 細胞に導入してアポトーシスに対する抑制効果を調べた。Bcl11a ノックアウトマウスの胎児肝細胞を IL-7 存在下で培養し、B 細胞分化の初期に誘導される遺伝子の発現を調べた。また、Bcl11a の各 isoform をマウス正常骨髄細胞に導入し、この細胞を骨髄移植して腫瘍発生を調べた。さらに、Bcl11a 遺伝子に変異を導入して SUMO 化部位を決定した。従来用いていた複製能を有するレトロウイルスではなく複製能を欠損したレトロウイルスに HoxA9 と Meis1 を組み込んでレトロウイルス挿入変異実験を行い、白血病の誘導と挿入部位の同定を行った。

長鎖 PCR 支援マイクロアレイ CGH システムにより 7q 欠失の共通欠失領域を同定し、この領域の責任遺伝子候補の cDNA をクローニングした。

## 3 研究成果

AML1/*EVI-1*ヘテロノックインマウスは胎生 13.5 日に中枢神経系への出血で死亡し、胎仔肝の成体型造血（二次造血）は肉眼的および組織学的に欠如していた。造血コロニー・アッセイにおいて 5 は、胎生 12.5 日の AML1/*EVI-1*ヘテロノックインマウス胎仔肝では少数の CFU-M を認めるのみであったが、胎生 13.5 日では多数の CFU-Mix を認めた。この CFU-Mix は自己複製能が亢進していたが、赤芽球への分化能を失っており、骨髄球の成熟障害を認めた。また、電子顕微鏡的観察では、巨核球に分離膜形成が観察されなかった。AML1/*EVI-1*ヘテロノックインマウス胎仔肝で造血前駆細胞が維持されているのは、PU.1 の発現が維持されていることと関係していると考えられた。AML1/*EVI-1* は個体レベルで野生型 AML1 に対してドミナント・ネガティブに作用するが、*EVI-1* 部分には付加的機能があると推測された。

inv(12)型白血病より *TEL/PTPRR* キメラ遺伝子をクローニングした。*PTPRR* 遺伝子は受容体型ホスファターゼをコードする。*TEL/PTPRR* キメラ遺伝子より発現する短縮型 TEL および TEL/*PTPRR* は主に細胞質分画に存在し、野生型 TEL の核移行を妨げる機能があった。野生型 TEL と短縮型 TEL あるいは TEL/*PTPRR* の結合は免疫沈降法で証明された。これらの分子は DNA 結合能を失っており転写抑制能を示さなかったが、野生型 TEL の転写抑制能を

容量依存性に抑制した。短縮型 TEL および TEL/PTPRR を UT-7/GM 細胞に遺伝子導入したところ、TEL/PTPRR 発現細胞は GM-CSF 非存在下でも増殖を続けた。短縮型 TEL あるいは TEL/PTPRR 発現細胞においては GM-CSF 非存在下でも STAT3 のリン酸化状態が維持されていた。従って、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と考えられた。

白血病で見られる AML1 遺伝子の変異 R139Q、R174Q、R177Q、I150ins の遺伝子改変マウス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。AML1 の機能低下は多くの白血病発症において共通する分子基盤となっていることが伺われる。しかしながら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、白血病の自然発症を認めず、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た。

アレイ CGH により、TEL-AML1 白血病検体において、比較的狭い染色体領域に集中して遺伝子の欠失があることを見出した。このことにより、必ず1つ以上の遺伝子領域が欠失していることが明らかとなり、この欠失領域はランダムではなく多数例で共通していることから、同領域内の遺伝子が欠失することが白血病発症に重要な役割を果たすことが強く示唆される。現在各領域における責任遺伝子について検索を進めているが、欠失遺伝子は大別して、p16、BTG などの細胞回転に関わる遺伝子、ARF や ATM など p53 経路に関与する遺伝子、あるいは細胞死に関わる遺伝子が見られ、これらの遺伝子が欠失することで細胞増殖や細胞の生存に有利に働く可能性が強く示唆された。

NUP98-HoxA9 の白血病発症における協調遺伝子として同定した Dnalc4 の Bim の抑制を介した抗アポトーシス作用を明らかにした。レトロウイルス挿入変異法を改良して、白血病発症において HoxA9 と Meis1 の共発現に協調する遺伝子として Trib1、Evi1 を同定し、Trib1 の MAPK 経路における役割を明らかにした。Bcl11a/Evi9 遺伝子が B 細胞の分化において必須であること、その isoform のうち AZ は T 細胞性腫瘍を cell non-autonomous に誘導すること、Bcl11a 蛋白が nuclear body を形成し SUMO 化による修飾を受けることを明らかにした。

7 番染色体長腕(7q)領域にその存在が想定されてきた、AML や MDS の発症を抑制する遺伝子を同定するため、「長鎖 PCR 支援マイクロアレイ CGH 法」を独自に開発し、7q 領域内にある共通微小欠失領域を同定した。この領域(約 120Kb)には三つの遺伝子が座位した。三遺伝子とも脊椎動物にのみ存在し、互いに密接に関連していたが、

既知遺伝子との相同性はなかった。ひとつの遺伝子産物は分裂期の紡錘糸に結合し、その発現を抑制すると分裂前期での停止や染色体の赤道上で整列異常が生じた。あとの二遺伝子は、Ku70/Ku80/DNA-PKcs 複合体と結合し、放射線照射により核内移行し、発現を抑制すると放射線感受性が亢進したことから、DNA 二重鎖切断時の非相同組換え断端結合(NHEJ)による修復に関与している模様である。三遺伝子の欠損は染色体の数的異常や、ゲノム修復エラーの蓄積を引き起こし、白血病の発症を促進している可能性が示唆された。

マウス骨髄前駆細胞より AML1 複合体を精製し、AML1 複合体には CBF  $\beta$  の他にヒストンアセチル化酵素 p300/CBP や MOZ、PML-I、リン酸化酵素 HIPK2 が含まれることを見いだした。MOZ 及び p300 は AML1 を介した転写を促進し、AML1 のリン酸化修飾が AML1 複合体の制御に重要であることが示された。この AML1 のリン酸化部位はセリン 249 及び 276 であり、AML1 複合体に含まれる HIPK2 がこれらをリン酸化することを明らかにした。HIPK2 は AML1 のリン酸化に加えて AML1 存在下で MOZ 及び p300 のリン酸化も促進し、AML1 による転写を活性化した。p300 のリン酸化はそのヒストンアセチル化活性を増強し、Gal4-p300 キメラ転写因子による転写を活性化した。MOZ のリン酸化は AML1 との結合を増強させ AML1 複合体を安定化した。ノックアウトマウスを用いた解析から、MOZ<sup>-/-</sup>マウスは胎生 14.5-15.5 日に死亡し、胎児肝における赤血球分化を含む成体型造血に異常が見られた。また、HIPK1/2 二重欠失マウスは胎生 10.5 日までに致死で、P-Sp 組織培養から得られる造血細胞に異常が見られる他に、血管発生・血管新生が見られなかった。この HIPK1/2 マウスでは p300 や CBP のリン酸化が顕著に低下し、その表現型が p300 及び CBP 欠失マウスの表現型と類似することから p300 及び CBP の HIPK1/2 によるリン酸化がその機能に重要であると考えられた。

#### 4 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益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た。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た。