

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

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。170 症例の白血病から 4 例の *AML1* 遺伝子の挿入型あるいは欠失型変異を検出した。これらの変異のノックインホモ接合マウスは *AML1* 欠損と同様に胎生期死亡した。*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が、白血病をみられなかった。*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。*MOZ*^{-/-}マウスは胎生致死で、成体型造血に異常が見られ、*MOZ* は造血幹細胞の形成・維持に必須であることが明らかとなった。*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	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

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 研究成果

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。*AML1/EVI-1* ヘテロノックインマウスは胎生致死（胎生 13.5 日）であった。病理所見では中枢神経系の出血および胎仔肝での成体型造血の欠如を認めた。胎生 13.5 日の胎仔肝の造血コロニー・アッセイにおいて多数の CFU-Mix を認めたが、これらは赤芽球へ分化せず、骨髓球の成熟に異常を認めた。また、継代培養実験により *AML1/EVI-1* 発現造血前駆細胞はより高い自己複製能を持つことが確認された。胎仔肝における造血系転写因子の発現を解析したところ、*AML1* ノックアウト細胞とは異なり、*AML1/EVI-1* ヘテロノックイン細胞では野生型細胞と同等の PU.1 の発現を認めた。以上の結果から、*AML1/EVI-1* は *AML1* に対してドミナント・ネガティブ効果を持つことが個体レベルで初めて証明された。また、報告されている *AML1/MTG8* ヘテロノックインマウスと比較して、成体型造血における著しい分化障害を認めた。この相違点は *AML1/EVI-1* と *AML1/MTG8* が発症させるヒト白血病の表現型の違いに深く関連していると考えられた。

急性骨髄性白血病に観察される *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* 遺伝子から短縮型 *TEL* と *TEL/PTPRR* キメラが発現していた。野生型 *TEL* は核内に存在するが、短縮型 *TEL* および *TEL/PTPRR* は細胞質内に存在していた。これらの異常分子は野生型 *TEL* とヘテロダイマーを形成し、その核移行を抑制した。また、短縮型 *TEL* と *TEL/PTPRR* は DNA 結合能および転写抑制能を示さなかったが、野生型 *TEL* の転写抑制能をドミナントに阻害した。*TEL/PTPRR* は GM-CSF 依存性のヒト白血病細胞株 UT-7/GM を GM-CSF 非存在下でも増殖させた。さらに、短縮型 *TEL* あるいは *TEL/PTPRR* を発現させた UT-7/GM 細胞は GM-CSF 除去後も STAT3 のリン酸化状態を維持していた。*inv(12)* 型白血病ではがん抑制因子 *TEL* が機能的に失活し、STAT3 シグナルが恒常的に活性化していると考えられた。

ヒト造血器腫瘍関連 *AML1* 遺伝子変異の頻度やその特性を検討する目的で自験の 170 症例について runt ドメインに相当するエクソン 3～6 の変異を DNA-based PCR および single-strand conformation polymorphism (SSCP) を用いてスクリーニングした。結果として 1 例のサイレント変異と 4 例の挿入型あるいは欠失型変異（計 5 例：2.9%）を検出した。3 例は N 末端近くのフレームシフトによる単純な機能喪失型変異であった。一方、骨髓異形成症候群 RAEB 亜型の 1 例において、3 塩基の挿入によって DNA 結合ドメイン内にイソロイシン残基が 1 個挿入される (I150ins) 変異を検出した。I150ins 変異体は機能共役分子である CBF β の存在下でも転写活性化能をもたず、またホットスポット点変異として知られる R139Q や R174Q と異なって、野生型 *AML1* の作用を競合阻害しなかった。ノックインの方法を用いて I150ins 変異をマウス胚細胞系列に導入したところ、ホモ接合マウスは *AML1* 欠損と同様に胎生期死亡し、この微細な変異はその生物作用を完全に廃絶させるものであることが示された。一方、ヘテロ接合マウスは顕著な造血異常を示さず、造血器腫瘍の自然発生は観察されなかった。*AML1* 遺伝子の片アレルの不活化は白血病発症における 1 ステップとなっていることが伺われるところであるが、この新規遺伝子改変マウスは、今後 *AML1* 変異と協調して白血病発症にかかわるパートナー遺伝子変異を特定してゆくうえで役立つものと思われる。

TEL-AML1 融合遺伝子をマウス造血幹細胞に導入し、この細胞を放射線照射同系マウスに骨髓移植することにより骨髓キメラマウスを作成し、*TEL-AML1* 融合遺伝子が造血に及ぼす影響を検討した。その結果、B 細胞の分化阻

害に伴うプロ B 細胞の相対的蓄積と未分化造血細胞の増加がみられた。2 次骨髄移植においても同様の結果が得られたものの、このマウスは長期観察でも白血病を起こすことはなかった。以上から、TEL-AML1 型白血病の白血病性幹細胞は未分化細胞分画にあって長く体内に存続し、B 細胞への分化の阻害に伴いプロ B 細胞が相対的に蓄積し、この細胞に何らかの 2 次的異常が起こってプロ B 細胞性白血病に至ると考えることができる。そこで、白血病発症に必須である付加的(二次的)遺伝子異常につき、TEL-AML1 白血病臨床検体を対象に、アレイ CGH 解析を行って検討した。その結果、全例で TEL-AML1 以外に複数の遺伝子異常を見出した。特に、特定の遺伝子領域が多数例で集中して欠失していることが判明し、この欠失遺伝子の白血病化への役割が強く示唆された。

HoxA9 と Meis1 を単一のレトロウイルスベクターに組み込みマウス正常骨髄細胞に導入し、この細胞を X 線照射したマウスに骨髄移植し、HoxA9 と Meis1 の共発現による AML の発症における協調遺伝子をレトロウイルス挿入変異を用いて同定した。HoxA9 と Meis1 を単一のレトロウイルスベクターに組み込んで発現させた骨髄細胞を移植されたマウスは、全例が平均 18 週の潜伏期間の後 AML を発症した。この AML におけるレトロウイルス挿入部位を単離し、共通挿入部位に存在する協調遺伝子候補として Trib1、Evl1、Ahl1、Rara、Pitpnb、AK039950 を同定した。Trib1 と Evl1 はレトロウイルスの挿入により発現が亢進し、HoxA9/Meis1 と共にマウス骨髄細胞に導入すると HoxA9 と Meis1 による白血病発症を促進し、協調遺伝子であると考えられた。Trib1 は MEK と結合して MAPK カスケードの活性化を亢進することが知られている。また、HoxA9/Meis1 の活性化は Flt3 の発現を上昇させることが最近報告された。Trib1、HoxA9、Meis1 を発現する白血病細胞では HoxA9、Meis1 のみの白血病細胞と比較して IL-3 刺激による ERK のリン酸化を有意に亢進することを明らかにした。このことは、Trib1 と HoxA9/Meis1 の協調作用が Flt3 の活性化の促進及び遷延化を介している可能性を強く示唆していた。

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。7q 共通欠失領域には、データベース上三つの遺伝子が存在したので *Miki*、*Titan*、*Kasumi* と命名した。脊椎動物にのみ相同性のある遺伝子が認められ、魚類と鳥類では *Miki* と *Titan* が融合した遺伝子がひとつ存在するが、マウスま

で分離して *Miki* と *Titan* になり、さらにヒトまでに *Titan* が遺伝子重複し *Kasumi* が出現した。三遺伝子は既知遺伝子との相同性がなかった。*Titan* と *Kasumi* は Ku70/Ku80/DNA-PKcs 複合体と結合するほか、放射線照射により核内に移行した。また、RNA 干渉法により *Kasumi* 蛋白質の発現を抑制すると、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。一方、*Miki* は間期には細胞質にび散的に存在するが、分裂期には、まず中心体に共局在し、M 期の進行に伴い中心体より伸びる紡錘糸に局在した。*Miki* の蛋白質発現を抑制すると、分裂前期での停止や分裂中期の赤道上の染色体整列異常が認められた。造血幹細胞の大多数が骨髄ニッチ内において G0 期で停止しているため、DNA 損傷の大半は姉妹染色分体が存在しない G0/G1 期で起き、その修復には NHEJ が主に機能すると推察される。*Kasumi*/*Titan* の欠損は NHEJ の機能異常につながり、造血幹細胞における遺伝子異常の蓄積を促進することが推察される。一方、*MIKI* の発現抑制により染色体の分配異常など分裂期の異常が生じたことは、白血病に頻繁に見られる染色体の数的異常に *MIKI* の欠損が関与する可能性を示唆している。

MOZ の造血における役割を解析するため、MOZ 欠損マウスを作製し、MOZ ホモ欠損マウスは胎生 15.5 日までに全ての胎仔が死亡し、胎仔肝臓における成体型造血に顕著な異常が見られることを見出した。胎生 14.5 日の MOZ ホモ欠損マウス胎仔肝臓では、造血幹細胞及び造血前駆細胞の広範な減少が見られ、赤血球の最終分化障害、B リンパ球の減少、骨髄性細胞の増加も見られた。造血幹細胞及び造血前駆細胞の広範な減少は MOZ ヘテロ欠損マウスでも見られた。造血幹細胞での MOZ の機能を解析するために、MOZ ホモ欠損マウスの胎児肝細胞(Ly5.2)を野生型競合細胞(Ly5.1)と共に、放射線照射したマウス(Ly5.1/Ly5.2)に移植したところ、MOZ ホモ欠損マウス由来細胞は、移植後のマウスの末梢血及び胸腺、脾臓、骨髄のどの造血組織にも全く見られなかった。加えて MOZ ヘテロ欠損マウス由来細胞も、移植マウスにおける割合が野生型マウス由来細胞と比べて減少していた(図3)。移植細胞数を増加させると MOZ ヘテロ欠損細胞の骨髄再構築能の減少は回復したが、MOZ ホモ欠損細胞の骨髄再構築能は全く回復しなかった。これらの結果から、MOZ は造血幹細胞の形成・維持に必須であることが示された。AML1 は造血幹細胞の形成には必須であるが、その維持には必要ではないことから、MOZ 欠損マウスの表現型は AML1 の機能阻害だけでは説明できない。そこで、造血に

関与するいくつかの転写因子について MOZ との結合を検討した。その結果、MOZ は PU.1 及び c-Myb と強く結合し、レポーター遺伝子を用いた解析から MOZ は PU.1 及び c-Myb による転写活性化を促進することが明らかとなった。PU.1 及び c-Myb は造血幹細胞の維持に重要であることから、MOZ は AML1 に加えて PU.1 及び c-Myb の転写コアクチベーターとして作用して造血幹細胞の形成・維持に関与することが示唆された。さらに胎生 12.5 日の胎仔肝臓における遺伝子発現の変化をマイクロアレイにより解析した。その結果、MOZ ホモ欠損マウスでは TPO 受容体 c-Mpl、SCF 受容体 c-Kit 及び HoxA9 の発現の低下が見られた (図 4)。c-Mpl 及び c-Kit を介したシグナルは造血幹細胞の維持に必須であることが示されていることから、これらの発現低下が MOZ 欠損マウスで見られた造血異常の原因である可能性が示唆された。以上の結果から、MOZ は AML1・PU.1・c-Myb の転写コアクチベーターとして作用して、c-Mpl 及び c-Kit の発現を制御することにより、造血幹細胞の形成・維持に重要な作用をすることが示唆された。

転写コリプレッサー HIPK2 は Sumo 化され、PML と共に nuclear body (NB) に局在する。私達は昨年度、c-Myb 活性が Wnt-1 刺激により HIPK2 を介したシグナルカスケードによりリン酸化され、プロテアソーム依存的に分解されることを明らかにした。今年度は、Myb ファミリーの別のメンバーである A-Myb もやはりこのシグナル伝達経路で負に制御されること、しかし A-Myb はプロテアソーム依存的に分解されることなく、A-Myb と CBP との結合が阻害され、かつ A-Myb 結合領域でのヒストン H3 K-9 のメチル化が促進されることによって、A-Myb 活性が抑制されることを明らかにした。

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. Takahashi, W., Sasaki, K., Komatsu, N., Mitani, K.
TEL/ETV6 accelerates erythroid differentiation

and inhibits megakaryocytic maturation in a human leukemia cell line UT-7/GM. *Cancer Sci*, 96:340-348, 2005.

2. Maki, K., Yamagata, T., Asai, T., Yamazaki, I., Oda, H., Hirai, H., Mitani, K. Dysplastic definitive hematopoiesis in *AML1/Evi-1* knock-in embryos. *Blood*, 106:2147-2155, 2005.
3. Nakamura, F., Nakamura, Y., Maki, K., Sato, Y., Mitani, K. Cloning and characterization of a novel chimeric gene *TEL/PTPRR* in acute myelogenous leukemia with *inv(12)(p13q13)*. *Cancer Res*, 65:6612-6621, 2005.
4. Seo, S., Asai, T., Saito, T., Suzuki, T., Morishita, Y., Nakamoto, T., Ichikawa, M., Yamamoto, G., Kawazu, M., Yamagata, T., Sakai, R., Mitani, k., Ogawa, S., Chiba, S., Hirai, H. Crk-associated substrate lymphocyte type is required for lymphocyte trafficking and marginal zone B cell maintenance. *J Immunol*, 75:3492-501, 2005.
5. Yamagata, T., Maki, K., Mitani, K. Runx1/AML1 in normal and abnormal hematopoiesis. *Int J Hematol*, 82:1-8, 2005.
6. 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*, 105:4298-4307, 2005.
7. Iwasaki M, Kuwata T, Yamazaki Y, Jenkins NA, Copeland NG, Osato M, Ito Y, Kroon E, Sauvageau G, Nakamura T. Identification of cooperative genes for NUP98-HOXA9 in myeloid leukemogenesis using a mouse model. *Blood*, 105:784-793, 2005.
8. Yamaguchi S, Yamazaki Y, Ishikawa Y, Kawaguchi N, Mukai H, Nakamura T. EWSR1 is fused to POU5F1 in a bone tumor with translocation t(6;22)(p21;q12). *Genes Chromosomes Cancer*, 43:217-222, 2005.
9. Nakamura T. Retroviral insertional mutagenesis identifies oncogene cooperation. *Cancer Sci*, 96:7-12, 2005.
10. Nakamura T. Meis and Hox: a mighty pair defeats apoptosis. *Blood*, 105:909-910, 2005.
11. Nakamura T. NUP98 fusion in human leukemia: dysregulation of the nuclear pore and homeodomain proteins. *Int J Hematol*, 82:21-27, 2005.

12. Yanagida M, Osato M, Yamashita N, Liqun H, Jacob B, Wu F, Cao X, Nakamura T, Yokomizo T, Takahashi S, Yamamoto M, Shigesada K, Ito Y. Increased dose of Runx1/AML1 acts as a positive modulator of myeloid leukemogenesis in BXH2 mice. *Oncogene*, 24:4477-4485, 2005.
13. Yamashita N, Osato M, Huang L, Yanagida M, Kogan SC, Iwasaki M, Nakamura T, Shigesada K, Asou N, Ito Y. Haploinsufficiency of Runx1/AML1 promotes myeloid features and leukaemogene. *Br J Haematol*, 131:495-507, 2005.
14. Inukai T., Inaba T., Dang J., Kuribara R., Ozawa K., Miyajima A., Wu W., Look A.T., Arinobu Y., Iwasaki H., Akashi K., Kagami K., Goi K., Sugita K., Nakazawa S. 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* 105: 4437-4444, 2005
15. Matsui H., Shinjyo T., Inaba T. Structure of the human Bim gene and its transcriptional regulation in Baf-3, interleukin-3-dependent hematopoietic cells. *Mol. Biol. Rep.* 32: 79-85, 2005
16. Yamasaki M, Mishima K.H., Yamashita H., Kashiwagi K., Murata K., Minamoto A., Inaba T. Neuroprotective effects of erythropoietin on glutamate and nitric oxide toxicity in primary cultured retinal ganglion cells. *Brain Res.* 1050: 15-26, 2005
17. Niimi H., Harada H., Harada Y., Ding Y., Imagawa J., Inaba T., Kyo T., Kimura A. Hyperactivation of the RAS signaling pathway in myelodysplastic syndrome with AML1/RUNX1 point mutations. *Leukemia*, *in press*
18. Kurahashi, T., Nomura, T., Kanei-Ishii, C., Shinkai, Y. & Ishii, S. The Wnt-NLK signaling pathway inhibits A-Myb activity by inhibiting the association with coactivator CBP and methylating histone H3. *Mol. Biol. Cell*, 16: 4705-4713, 2005.
19. Morita Y., Kanei-Ishii, C., Nomura T. & Ishii, S. TRAF7 sequesters c-Myb to the cytoplasm by stimulating its sumoylation. *Mol. Biol. Cell*, 16: 5433-5444, 2005.
20. Nguyen LA, Pandolfi PP, Aikawa Y, Tagata Y, Ohki M, Kitabayashi I. Physical and functional link of the leukemia-associated factors AML1 and PML. *Blood*, 105, 292-300, 2005.
21. Kishimoto M, Kohno T, Okudela K, Otsuka A, Sasaki H, Tanabe C, Sakiyama T, Hiramata C, Kitabayashi I, Minna JD, Takenoshita S, and Yokota J Mutations and Deletions of the CBP Gene in Human Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*, 11, 512-519, 2005.
22. Okamoto, K, Kashima, K, Pereg, Y, Ishida, M, Yamazaki, S, Nota, A, Teunisse, A, Migliorini, D, Kitabayashi, I, Marine, JC, Prives, C, Shiloh, Y, Jochemsen, AG, Taya, Y. DNA damage-induced phosphorylation of MdmX at serine 367 activates p53 by targeting Mdx for mdm2-dependent degradation. *Mol. Cell. Biol.*, 25, 9608-9620, 2005.
23. Katsumoto T, Aikawa Y, Atsushi Iwama A, Ueda S, Ichikawa H, Ochiya T, Kitabayashi I. MOZ is essential for maintenance of hematopoietic stem cells. *Genes & Dev.*, *in press*.
24. Enari M., Ohmori, K., Kitabayashi, I., Taya, Y. Requirement of clathrin heavy chain for p53-mediated transcription. *Genes & Dev.*, *in press*