

令和元年6月18日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09858

研究課題名(和文) RUNX1-EVI1転座型白血病の分子機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms in RUNX1-EVI1-type leukemia

研究代表者

三谷 絹子 (Mitani, Kinuko)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：50251244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：RUNX1-EVI1は、t(3;21)の結果形成されるキメラ型転写因子遺伝子であり、急性巨核芽球性白血病の発症、あるいは、慢性骨髄性白血病及び骨髄異形成症候群の白血病化の原因遺伝子である。骨髄移植実験により、RUNX1-EVI1型モデルマウスを得た。モデルマウスの一部は、8ヶ月以内に急性巨核芽球性白血病を発症しており、ヒト白血病を模倣しているものと考えられた。白血病細胞は、二次移植、三次移植により、継代が可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RUNX1-EVI1型白血病は極めて予後が不良であり、化学療法のみでは治癒は困難である。今回作製されたモデルマウスを解析することにより、予後不良の白血病の発症機構が詳細に解明されることが期待される。また、これらの知見を基にして、今後新規の分子標的療法の開発が可能となる。RUNX1-EVI1はキメラ型転写因子であり、すでに臨床応用されているヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の効果も検証する予定である。

研究成果の概要(英文)：RUNX1-EVI1 is a chimeric transcription factor generated by t(3;21) and causes the development of acute megakaryoblastic leukemia or transformation of chronic myelocytic leukemia and myelodysplastic syndrome. By using transplantation experiments, we created RUNX1-EVI1-type model mice. A part of the mice developed acute megakaryoblastic leukemia within eight months, which was considered to mimic human leukemia. Passage of the leukemic cells was possible through the second and third transplantation.

研究分野：血液内科学

キーワード：RUNX1-EVI1 t(3;21) 急性巨核芽球性白血病 SKP2 ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト白血病の多くは造血幹細胞レベルの異常で発症してくることが知られている。急性骨髄性白血病 (AML) では正常幹細胞と類似の性質を有する白血病幹細胞 (leukemic stem cell: LSC) が存在し、この LSC より盛んに増殖するより分化した白血病細胞集団が供給される。一方、慢性骨髄性白血病 (CML) 及び骨髄異形成症候群 (MDS) のような慢性に経過する骨髄性腫瘍の場合にも、病初期から LSC が存在する。しかしながら、これらの LSC は分化傾向を示し(ただし、MDS の場合には無効造血を起こす) 直ちに急性白血病に移行する訳ではない。発症後に様々な遺伝子変異を獲得することにより、一定の期間を経過した後、急性白血病に移行する。骨髄性白血病の原因遺伝子は、class I 変異 (増殖促進: チロシンキナーゼ遺伝子の活性化型変異)、class II 変異 (分化抑制: 転写因子、p53 の失活型変異) 及び class III 変異 (エピジェネティック制御異常: DNA メチル化制御遺伝子変異、ヒストン修飾遺伝子変異、RNA スプライシング制御因子遺伝子変異) に分類される。AML の LSC は、発症時より、class II あるいは class III の遺伝子異常を背景にすでに class I の遺伝子変異を獲得している。一方、CML の原因遺伝子 BCR-ABL は非受容体型チロシンキナーゼ遺伝子であり、class I 変異に分類される。増殖能力のある LSC が class II 変異を獲得して分化能を失うことにより、急性転化を起こすと考えられている。MDS では病初期には class III 変異、特にメチル化制御因子遺伝子の変異が観察され、病期の進展とともに class III 変異のヒストン修飾制御因子遺伝子の変異、class II 変異の RUNX1 遺伝子の変異等が蓄積し、白血病化の際には class I 変異が役割を担う。これらの疾患を治癒させるには、LSC を根絶する必要がある。しかしながら、LSC は、正常の造血幹細胞と同様に自らを守る巧妙な仕組みを持っている。すなわち、骨髄微小環境を形成するニッチ細胞との相互作用により、化学療法や分子標的療法の効果を妨げる分裂静止期にとどまり、その生存を維持している。この生存の維持機構を解明し、これを標的とした分子標的療法を開発することにより、初めて白血病は治癒可能な疾患となる。さらに、慢性に経過する CML や MDS を急性化させる最後のワン・ヒットを回避する、あるいは、その機能を抑制することが出来れば、生命予後の大幅な改善が期待される。

2. 研究の目的

本研究代表者は、CML の巨核芽球性急性転化の症例から t(3;21)(q26;q22) の結果形成されるキメラ型転写因子遺伝子 RUNX1-EVI1 をクローニングした (Mitani, Hirai, et al. EMBO J, 1994)。t(3;21)(q26;q22) は急性巨核芽球性白血病 (FAB 分類 M7: AMgL) 及び CML あるいは MDS の白血病化の際に観察される染色体異常であり、RUNX1-EVI1 は造血幹細胞腫瘍の白血病化の原因遺伝子であると考えられる。RUNX1-EVI1 は、Runt ドメインまでの RUNX1 の N 末端領域に EVI1 の全長が結合した構造を持っている。RUNX1 は RUNT ファミリーに属する転写因子である。N 末の Runt ドメインで DNA に結合し、C 末の転写活性化領域で標的遺伝子の転写を活性化する。RUNX1 の細胞生物学的機能は骨髄球系細胞の分化誘導である (Tanaka, Mitani, Hirai, et al. EMBO J, 1995)。RUNX1 の機能は発生工学的に解析されている。ノックアウトマウスでは、卵黄嚢における一次造血は保存されるが、胎仔肝における成体型造血は完全に廃絶する。コンディショナル技術を用いて RUNX1 遺伝子を誘導性に後天的に欠失させると、造血前駆細胞の数が増加し、T・B リンパ球の発生及び巨核球の成熟が抑制される (Ichikawa, Mitani, Hirai, et al. Nat Med, 2004)。一方、EVI1 は zinc finger 型の転写因子である。過剰発現は AMgL に特徴的に観察されるが、一般的に AML の予後不良因子である。RUNX1-EVI1 には主に 2 つの機能がある。ひとつは野生型 RUNX1 に対するドミナント・ネガティブ効果であり (Tanaka, Mitani, Hirai, et al. MCB, 1995)、もうひとつは EVI1 の過剰発現効果である。後者には、TGFβシグナルに対する阻害効果 (Kurokawa, Mitani, Hirai, Nature, 1994; Tanaka, Mitani, Hirai, et al. Blood, 1998)、顆粒球の分化因子 CEBPA に対する抑制効果 (Tokita, Mitani, et al. Cancer Sci, 2007)、AP-1 活性に対する刺激効果 (Tanaka, Mitani, Hirai, et al. JBC, 1994) がある。これらの機能は細胞生物学の系で証明されたものであるが、分子生物学的には EVI1 部分でのコリプレッサー CtBP を介するヒストン脱アセチル化酵素のリクルートが重要な分子基盤である。本研究グループはすでに発生工学マウス (ヘテロノックインマウス) を作製し、個体レベルでの機能を検証している (Maki, Mitani, et al. Blood, 2005)。RUNX1-EVI1 ヘテロノックインマウスは胎生中期に中枢神経と脊髄の出血により致死となり、胎仔肝造血は完全に廃絶していた。これらの表現型は RUNX1 ノックアウトマウスとほぼ同じであり、RUNX1-EVI1 は個体レベルでも野生型 RUNX1 に対してドミナント・ネガティブ効果を発揮することが明らかになった。一方、造血コロニー・アッセイにより、RUNX1-EVI1 の胎仔肝には、三血球系統に分化・形態異常 (赤芽球消失、骨髄球の分化抑制、巨核球の分離膜の異常) を示し、継代能力のある造血前駆細胞が存在することが示された。ヘテロノックインマウスは胎生致死であったため、出生後の造血能に対する効果は解析できなかったが、キメラノックインマウスは AMgL を発症した (Maki, Mitani, et al. Leukemia, 2006)。本研究では、多数の個体を解析するために骨髄移植実験によりモデルマウスを作製し、発症した腫瘍の表現型を詳細に解析するとともに、RUNX1-EVI1 の下流候補分子の検証を行う。さらに、RUNX1-EVI1 個体の骨髄ニッチ細胞の機能の変化を解析する。最後に、RUNX1-EVI1 を標的とした分子治療の可能性を追求する。

3. 研究の方法

(1) RUNX1-EVI1 の白血病モデルマウスの解析

RUNX1-EVI1 レトロウイルスを 5-FU 処理後のマウス骨髄細胞に感染させ、骨髄移植を行うことにより、すでに白血病モデルマウスを得ている。白血病細胞を用いて、以下の解析を行う。

骨髄、脾臓、肝臓のスタンプ標本及び病理組織標本を用いて形態学的観察を行う。腫瘍細胞の電子顕微鏡的観察も行い、特に PPO (血小板ペルオキシダーゼ) の有無を確認する。表面マーカー解析 (造血幹細胞マーカー, Sca1, c-kit; 巨核球マーカー, CD41; 赤芽球マーカー, CD71, TER119; 骨髄球マーカー, Gr-1, Mac-1) を行い、白血病細胞の細胞系列を決定するとともに、骨髄内での LSK 細胞 (c-kit+Sca-1+Lineage-) の増加の有無を確認する。造血細胞のコロニー・アッセイ法を用いて、RUNX1-EVI1 細胞のコロニー形成能の変化を検討する。また、コロニー形成細胞を形態学的に観察し、分化・形態の異常の有無を明らかにする。さらに、RUNX1-EVI1 コロニーが継代可能かどうかを明らかにする。

RUNX1-EVI1 骨髄移植マウスの白血病細胞を用いて継代移植実験を施行し、白血病の発症時期、表現型等を同様に解析する。

各白血病発症個体の白血病細胞よりゲノムを抽出して、ウイルスの挿入部位を明らかにする。このことにより、RUNX1-EVI1 の協調遺伝子の有無が明らかになる。

(2) RUNX1-EVI1 の分子生物学的機能 (標的遺伝子等) の解析

RUNX1-EVI1 の野生型 RUNX1 に対するドミナント・ネガティブ効果の標的候補を、マウス造血前駆細胞に RUNX1-EVI1 レトロウイルスを感染させると発現が低下し、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤処理後に発現が回復する遺伝子として同定している (Maki, Mitani, et al. Int J Hematol, 2013: アポトーシス誘導因子遺伝子の FADD と造血幹細胞制御因子遺伝子の SKP2)。

SKP2 の CHIP アッセイ及びレポーター・アッセイ: SKP2 が RUNX1/EVI1、すなわち RUNX1 の直接の標的遺伝子であるかどうかを CHIP アッセイ及びレポーター・アッセイにより確認する。CHIP アッセイには、RUNX1 蛋白を発現しており、RUNX1 の標的遺伝子 (CEBPA 等) の同定に用いられてきた白血病細胞株 Jurkat を用いる。RUNX1 結合部位 (PEBP2 部位) を含む SKP2 遺伝子のプロモーター・エンハンサー領域を増幅する PCR プライマーを作製する。レポーター・アッセイには、RUNX1 結合部位 (PEBP2 部位) を含む SKP2 遺伝子のプロモーター・エンハンサー領域をクローニングしたレポーターを用いる。RUNX1 と C/EBPβ 共発現により転写が活性化され、その転写活性化能を RUNX1-EVI1 がドミナント・ネガティブに抑制するかどうかを観察する。

RUNX1-EVI1 と SKP2 の分子生物学的相互作用の確認: RUNX1-EVI1 と SKP2 分子の会合の有無を免疫沈降法により確認する。最初は COS 細胞に RUNX1-EVI1 と SKP2 を過剰発現させる。会合が確認された場合には、RUNX1-EVI1 発現ヒト白血病細胞株 SKH1 (Mitani, et al. Br J Haematol, 1995) を用いて、内因性蛋白の会合の有無を確認する。さらに、SKP2 はユビキチンリガーゼであるので、共発現により RUNX1-EVI1 の発現が低下する可能性がある。SKH1 に SKP2 レトロウイルスを感染させて、RUNX1-EVI1 蛋白の発現レベル及びユビキチン化状態に変化がないかどうかをウエスタン解析により検討する。shRNA を用いて、SKP2 のノックダウン効果も明らかにする。

RUNX1-EVI1 と SKP2 の細胞生物学的相互作用の確認: SKP2 との共発現により RUNX1-EVI1 のマウス造血前駆細胞での細胞生物学的効果 (液体培養系における成熟好中球への分化抑制能及びメチルセルロース上でのコロニー形態異常・継代活性) が減弱するかどうかを確認する。さらに、モック細胞、SKP2 発現細胞、RUNX1-EVI1 発現細胞、RUNX1-EVI1+SKP2 発現細胞の発現アレイ解析を行い、SKP2 との共発現で回復する経路を同定する。最後にマウス個体での白血病発症を SKP2 がレスキューできるかどうか、あるいは、遅延させられるかどうかを観察する。そのために、個体由来の白血病細胞に SKP2 レトロウイルスを感染させた後、二次移植を行う。

RNA-seq 法による網羅的標的遺伝子の探索: SKP2 を同定したのと同様の手法を用いて、RNA-seq 法により網羅的な標的遺伝子の探索を行う。

(3) RUNX1-EVI1 型白血病におけるニッチの機能変化の検討

RUNX1-EVI1 モデルマウスとコントロールマウスの大腿骨細胞から骨髄組織を除き、コラゲナーゼ処理を施すことにより bone-derived cell (endosteal cell) を調整する。Sca-1 及び ALCAM (activated leukocyte cell-adhesion molecule) の発現パターンにより、白血病個体における骨芽細胞 (ALCAM-/Sca-1-, ALCAM+/Sca-1-) 及び間葉系前駆細胞 (ALCAM-/Sca-1+) の分布の変化を解析する (Nakamura, et al. Blood, 2010)。また、各分画において、RUNX2, オステオポンチン, オステオカルシン等の骨細胞マーカー、あるいは Endoglin 等の間葉系細胞のマーカーの発現の変化の有無を定量 PCR 法により検討する。RNA-seq を用いた網羅的検討も行う。

白血病細胞個体のニッチ形成ストローマ細胞を 2 週間程度培養・増幅した後、正常マウス骨髄由来の LSK 細胞とサイトカイン非存在下に 48 時間共培養する。共培養した造血細胞を用いて、コロニー (CFU-C あるいは CFU-Mix) 形成能の変化の有無を観察する。また、

共培養した細胞を用いて骨髄移植実験を行い、正常ニッチ細胞と共培養した場合に比べて、造血再構築能に変化がないかどうかを検討する。さらに、RNA-seq 解析を行い、共培養後の LSK 細胞の遺伝子発現に変化がないかどうかを、正常及び白血病個体由来ニッチ細胞と比較する。特に、細胞接着に関する遺伝子 (Cxcr4, Itg2b, Itgb2, cd44, cdn2, Vcam1 等) 及び幹細胞の維持に関連する遺伝子 (Gfi1, Hoxb4, Tel, Cdknfc, Foxo3, Sox2 等) の発現変化に注目する。

逆に、RUNX1-EV11 白血病モデルマウスから抽出した LSC を正常マウス由来のストローマ細胞と共培養した際のニッチ細胞の遺伝子発現の変化についても 同様に検討する。RUNX1-EV11 マウス由来の LSC が生物学的にストローマ細胞を教育したかどうかを明らかにする目的で、共培養後のストローマ細胞上で正常の LSK 細胞とさらに共培養を行い、この LSK 細胞のコロニー形成能の変化を検討するとともに、骨髄移植実験を施行する。マウス個体内で LSC が骨髄ニッチの骨芽細胞と相互作用しているかどうかを、免疫染色により検討する。幹細胞のマーカーとして Sca-1 を、ニッチ骨芽細胞のマーカーとして ALCA 及びオステオカルシンを用いる。

(4) RUNX1-EV11 型白血病モデルマウスにおけるヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の有効性の検討

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(トリコスタチン A 及びバルプロ酸)が RUNX1 転座型白血病細胞株において増殖を抑制し、アポトーシスを誘導することを報告している (Sasaki, Mitani, et al. Cencer Sci, 2008)。RUNX1-EV11 モデルマウス由来の白血病細胞を二次移植する際にヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の腹腔内投与を継続し、白血病発症の有無あるいは遅延の有無を観察する。

4. 研究成果

RUNX1-EV11 は、t(3;21)の結果形成されるキメラ型転写因子遺伝子であり、急性巨核芽球性白血病の発症、あるいは、慢性骨髄性白血病及び骨髄異形成症候群の白血病化の原因遺伝子である。RUNX1 に対するドミナント・ネガティブ効果と EV11 過剰発現効果により、白血病を発症させる。RUNX1-EV11 型モデルマウスを得た。モデルマウスの一部は、8 ヶ月以内に急性巨核芽球性白血病を発症し、一部は白血病を発症せず、1 年程度で末梢血の血小板数増加を示した。非白血病個体では、血小板数増加に加えて、貧血と白血球数低下を示す個体もあった。骨髄では、CD41 陽性の巨大な異形巨核球が増殖しており、異形赤芽球の増加も観察された。骨髄の線維化は見られなかった。これらの異形細胞は脾臓にも浸潤しており、巨脾を呈する個体では、正常の白脾髄の構造が破壊されていた。白血病個体では、貧血様肝臓と巨大脾腫が存在した。末梢血は汎血球減少症を呈し、特に貧血は重篤であった。白血病細胞は、形態学的に赤芽球様に見えるものと、巨核芽球様に見えるものが存在した。いずれの白血病細胞も c-kit、CD41 及び CD31 陽性であり、TER119 は陰性であった。電子顕微鏡解析では、血小板ペルオキシダーゼは陰性であったが、多数の中心体とアルファ顆粒が観察された。これらの白血病細胞は二次移植、三次移植が可能であり、二次移植、三次移植の個体はより早期に白血病を発症した。しかしながら、二次移植、三次移植の個体においても、白血病細胞の表現形質 (c-kit、CD41 及び CD31 陽性、TER119 は陰性) に変化はなかった。以上のことから、RUNX1-EV11 は巨核球系列の白血病を誘導することが明らかになった。本研究者は、in vitro の実験を用いて、RUNX1-EV11 の下流候補遺伝子として、造血幹細胞制御に役割を担う SKP2 を同定している。現在、SKP2 が in vitro (造血コロニー・アッセイ) 及び in vivo (二次移植) の系で、実際に下流遺伝子として機能するかどうかを検証している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- (1) Nakamura Y, Ichikawa M, Oda H, Yamazaki I, Sasaki K, Mitani K. (2018): RUNX1-EV11 induces dysplastic hematopoiesis and acute leukemia of the megakaryocytic lineage in mice. *Leukemia Res* 74, 14-20. (査読有り)
- (2) Mitani K, Nagata Y, Sasaki K, Yoshida K, Chiba K, Tanaka H, Shiraishi Y, Miyano S, Makishima H, Nakamura Y, Nakamura Y, Ichikawa M, Ogawa S. (2016): Somatic mosaicism in chronic myeloid leukemia in remission. *Blood* 128(24):2863-2866. (査読有り)

〔学会発表〕(計 6 件)

- (1) 三谷絹子 (2018): AML の分子標的療法と分子病態 (招請講演) 第 115 回日本内科学会総会・講演会
- (2) Ko Sasaki, Fusako Nagasawa, Kenichi Yoshida, June Takeda, Yuichi Shiraishi, Kenichi Chiba, Hiroko Tanaka, Ai Okada, Satoru Miyano, Motoshi Ichikawa, Seishi Ogawa, Kinuko Mitani (2017): Contribution of MIR9 on disease progression of chronic myelogenous leukemia. 第 79 回日本血液学会総会
- (3) 中村由香, 市川幹, 小田秀明, 山崎家春, 佐々木光, 三谷絹子 (2017): RUNX1-EV11 キメラ

遺伝子による白血病モデルマウスの解析. 第 54 回日本臨床分子医学会学術集会

- (4) Yuka Nakamura, Motoshi Ichikawa, Ieharu Yamazaki, Ko Sasaki, Kinuko Mitani (2016): RUNX1-EV11 fusion gene induces an acute megakaryoblastic leukemia in mice. 第 78 回日本血液学会総会
- (5) Kinuko Mitani (2016): Presidential Lecture Leukemogenesis by RUNX1-EV11 and afterward stories ~a message to young doctors and researchers~. 第 78 回日本血液学会総会 (横浜)
- (6) 市川 幹、永田安伸、佐々木光、吉田健一、千葉健一、田中洋子、白石友一、宮野 悟、中村幸嗣、中村由香、三谷絹子、小川誠司 (2016); 慢性骨髄性白血病寛解期における体細胞モザイク変異. 第 53 回日本臨床分子医学会学術集会

〔図書〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：市川 幹

ローマ字氏名：Ichikawa Motoshi

所属研究機関名：獨協医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：60463840

研究分担者氏名：佐々木 光

ローマ字氏名：Sasaki Ko

所属研究機関名：獨協医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：60282638

研究分担者氏名：中村 由香

ローマ字氏名：Nakamura Yuka

所属研究機関名：獨協医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁)：80364595