

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10027

研究課題名（和文）小児白血病におけるAPOBEC3Bの発がん機構の解明

研究課題名（英文）Pathogenesis of APOBEC3B in childhood leukemia

研究代表者

竹谷 健（TAKETANI, TAKESHI）

島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授

研究者番号：30359880

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）：APOBEC3Bが小児白血病の発がんに寄与しているか検討した。小児白血病検体におけるAPOBEC3B遺伝子の発現頻度は少なかったが、APOBEC3B遺伝子の発現に関わらず、50%の症例でC/T変化の遺伝子変異を認めた。また、IKAROS遺伝子とPAX5遺伝子のshRNA、TEL-AML1融合遺伝子をそれぞれ導入した臍帯血由来CD34陽性細胞に、APOBEC3B遺伝子を発現させた一部がclon性増殖を示した。そのcloneは、分化能の低下、自己複製能の亢進およびアポトーシスの低下が認められたことから、APOBEC3B遺伝子が小児白血病の発症に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成人の発がんの機序として、紫外線や放射線、抗がん剤、喫煙などの外因子が知られているが、小児がんにおいては、外因子に暴露される機会が成人に比べて極めて少ない。今回、ウイルス防御の1つであるAPOBEC3Bが小児白血病の発症に寄与している可能性を示したことから、感冒などのウイルス感染の予防が小児がん発症の予防になる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：We examined whether APOBEC3B as a viral defense mechanism contributes to carcinogenesis in childhood leukemia. The frequency of APOBEC3B gene expression in pediatric leukemia samples was low, but C/T mutations were found in 50% of cases, regardless of APOBEC3B gene expression. In addition, cord blood-derived CD34-positive cells into which the shRNA of the IKAROS gene and the PAX5 gene and the TEL-AML1 fusion gene were introduced, respectively, and part of the APOBEC3B gene simultaneously expressed showed cloned proliferation. The clone was found to have reduced differentiation ability, enhanced self-renewal ability and reduced apoptosis. These results suggest that the APOBEC3B gene may contribute to leukemic transformation of pediatric preleukemic clones.

研究分野：小児科

キーワード：APOBEC3B

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1) 本研究に関する国内外の研究動向および位置づけ

ほとんどの悪性腫瘍で発がんに関わる遺伝子変異が同定されているが、どのような機序で遺伝子変異が起こるかはわかっていない。しかし、昨今の網羅的遺伝子解析により、多くのがんでは遺伝子変異の塩基置換において、C→T(相補鎖ではG→A)への変異が圧倒的に多数を占めていることが明らかとなった(Nature 2007;446:153)。塩基置換を引き起こす原因として、紫外線や放射線、抗がん剤、喫煙などの外因子が知られているが、小児白血病においては、外因子に暴露される機会が成人に比べて極めて少ないため、細胞内因子による発がん機構の関与が考えられている。

APOBEC3Bは、ウイルス感染により、ウイルスDNA/RNAのシトシンを脱アミノ化(CをTに置換させる)ことによってウイルスの増幅を防ぐことで細胞内生体防御の働きをする、遺伝子編集酵素(シトシン脱アミノ化酵素)である。このAPOBEC3Bがリンパ腫で高発現しており、リンパ腫に認められるc-MycやA20などの遺伝子変異を引き起こすことが明らかとなった(Science reports 2012;2:806)。最近では、乳がんや子宮頸がん、頭頸部がんなどで、発がんだけでなく予後不良因子としても関与していることが報告されている(Nature Genetics 2013;45:977)。

2) これまでの研究成果を踏まえ着想に至った経緯

我々はこれまで、11p15転座型造血器腫瘍において、11p15の切断部位から単離されたNUP98遺伝子の転座相手として、2q31よりHOXD11遺伝子を、7p15よりHOXA13遺伝子を、12q13よりHOXC11遺伝子を単離・同定した。これらのNUP98-HOX融合遺伝子を有する造血器腫瘍に、FLT3-ITD、RAS遺伝子変異、WT1遺伝子異常が高頻度に認められ、予後不良であることも明らかにした。また、小児造血器の遺伝子解析におけるAML1/RUNX1遺伝子変異解析、MLL遺伝子再構成を有した乳児白血病におけるFLT3遺伝子変異および網羅的遺伝子発現解析を行った。

以上の研究成果から、また、これまでの報告から、小児白血病の1例ごとに、融合遺伝子あるいは遺伝子変異が10個前後存在することが明らかにした。

小児白血病の発がん機構として、ガスリーー紙の解析で出生時にTEL-AML1やAML1-MTG8のような融合遺伝子が認められることから、それらと協調する遺伝子変異は出生後に出現して、白血病化を引き起こすことが報告されている(Greaves M, Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2009)。

したがって、出生後に早期から高頻度にウイルス感染に罹患する小児において、ウイルス防御機構としてのAPOBEC3Bが高発現することによって、発がんに関与する遺伝子のC→Tへの変異を引き起こし、白血病を引き起こす可能性が高いことが推測される。

2. 研究の目的

1) 小児白血病におけるAPOBEC3B遺伝子の発現および臨床像との関連の検討

小児白血病検体を用いてAPOBEC3B遺伝子の発現を調べる。また、その発現と臨床像との関連を明らかにする。さらに、APOBEC3Bが発現している検体を用いて、それぞれの白血病検体で認められる遺伝子異常を同定して、それらの遺伝子異常の塩基置換がC→Tへの変異であるかどうかを明らかにする。

2) APOBEC3Bの白血病化への関与

TEL-AML1などの融合遺伝子を有する細胞に、APOBEC3Bを導入後、CからTに変異する遺伝子異常が起こるか、また、導入後の増殖能、アポトーシス、自己複製能等を検討して、白血病化に関与するか明らかにする。さらに、APOBEC3Bを抑制することで白血病化を抑制できるかを検討する。

3. 研究の方法

1) 小児白血病におけるAPOBEC3B遺伝子の発現および臨床像との関連の検討

小児白血病(急性リンパ性白血病および急性骨髄性白血病)の初診時の臨床検体を用いて、APOBEC3Bの遺伝子は発現をQuantitative RT-PCRで測定する。その後、発現の程度と

臨床像(病型、年齢、性、白血球数、臓器浸潤、染色体、遺伝子異常、再発、予後)との関連を調べる。また、APOBEC3B 遺伝子が発現していた検体に認められる遺伝子異常を同定して、それらの遺伝子異常の塩基置換が C→T への変異であるかどうかを検討する。

2) APOBEC3B の白血病化への関与

IKAROS 遺伝子、PAX5 遺伝子および p16 遺伝子を shRNA で抑制した臍帯血由来 CD34 細胞および TEL-AML1 融合遺伝子、AML1-MTG8 融合遺伝子を導入した臍帯血由来 CD34 細胞を作成して、pre-leukemic clone を作成する。

これらの preleukemic clone において、APOBEC3B 遺伝子を導入後に白血病化するかわかりやすくするために、細胞の増殖能 (colony assay, liquid culture)、自己複製能 (replating assay)、アポトーシスおよび細胞周期への影響 (western blotting, flow cytometry)、分化能 (flow cytometry, immunofluorescence) を検討する。

4. 研究成果

1) 小児白血病における APOBEC3B 遺伝子の発現および臨床像との関連の検討

NCBI の Gene Expression Omnibus に登録されている小児白血病の SNP array を解析した結果、小児白血病で認められる遺伝子変異のうち、C→T への変異が 50% 以上で存在することを同定した。また、小児の急性リンパ性白血病 56 例、および急性骨髄性白血病 21 例に関して、APOBEC3B 遺伝子発現を Quantitative RT-PCR で測定した結果、それぞれ 9 例、5 例で発現していた。発現の有無と臨床像(病型、年齢、性、白血球数、臓器浸潤、染色体、遺伝子異常、再発、予後)との関連を検討したが、明らかな関係は認めなかった。しかし、APOBEC3B 遺伝子発現を認めた白血病に認められた遺伝子変異のうち、C→T の変化を認めた例は 9 例であった。なお、APOBEC3B 遺伝子発現がなかった白血病では、C→T の変化を認めた遺伝子変異を起こしていたのは、19 例であった。したがって、APOBEC3B 遺伝子は、白血病の維持よりは白血病の発症に寄与している可能性が示唆された。

2) APOBEC3B の白血病化への関与

IKAROS 遺伝子、PAX5 遺伝子および p16 遺伝子を shRNA で抑制した臍帯血由来 CD34 陽性細胞および TEL-AML1 融合遺伝子、AML1-MTG8 融合遺伝子を導入した臍帯血由来 CD34 陽性細胞を作成して、リンパ系前駆細胞を維持する培地で培養して、pre-leukemic clone を作成した。APOBEC3B 遺伝子をレトロウイルスに挿入して BaF3 細胞および CD34 陽性細胞に導入したところ、すべての細胞がアポトーシスした。したがって、APOBEC3B 遺伝子の持続的発現は細胞毒性が強いと判断して、Cre/loxP システムを組み込んだベクターを作成して、発現時間を調整した。その結果、72 時間以上ではすべての細胞がアポトーシスすることが明らかとなった。そのため、preleukemic clone に APOBEC3B 遺伝子を導入した細胞において、APOBEC3B 遺伝子を 6 時間、12 時間、24 時間発現させた。その結果、ある preleukemic clone が他の clone に比べて優位に増殖することが明らかとなった。その増殖した clone は、分化能の低下、自己複製能の亢進およびアポトーシスの低下が認められた。したがって、APOBEC3B 遺伝子が preleukemic clone の白血病化に寄与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mishima S, Matsuda C, Ishihara T, Nagase M, Taketani T, Nagai A.	4. 巻 56
2. 論文標題 Single nucleotide polymorphisms of the DGKB and VCAM1 genes are associated with granulocyte colony stimulating factor-mediated peripheral blood stem cell mobilization.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Transfus Apher Sci	6. 最初と最後の頁 154-159
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.transci.2016.10.011.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Abe M, Pelus LM, Singh P, Hirade T, Onishi C, Purevsuren J, Taketani T, Yamaguchi S, Fukuda S.	4. 巻 11
2. 論文標題 Internal Tandem Duplication in FLT3 Attenuates Proliferation and Regulates Resistance to the FLT3 Inhibitor AC220 by Modulating p21Cdkn1a and Pbx1 in Hematopoietic Cells.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0158290
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1371/journal.pone.0158290.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hirade T, Abe M, Onishi C, Taketani T, Yamaguchi S, Fukuda S.	4. 巻 103
2. 論文標題 Internal tandem duplication of FLT3 deregulates proliferation and differentiation and confers resistance to the FLT3 inhibitor AC220 by Up-regulating RUNX1 expression in hematopoietic cells.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Int J Hematol.	6. 最初と最後の頁 95-106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1007/s12185-015-1908-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----