

平成 22 年 6 月 21 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17013086

研究課題名（和文）レトロウイルス挿入変異を用いた発がん分子機構の研究

研究課題名（英文）Research on the molecular mechanism of carcinogenesis using retroviral insertional mutagenesis

研究代表者

中村 卓郎 (NAKAMURA TAKURO)

財団法人 癌研究会・癌研究所 発がん研究部・部長

研究者番号：00180373

研究成果の概要（和文）：発がんの分子機構を明らかにする目的で、レトロウイルス挿入変異を利用してがんの進展に重要な遺伝子群を同定した。Hoxa9/Meis1 の特異的協調遺伝子として同定した Trib1 は、その MEK と C/Ebpa に対する機能修飾が白血病発症に重要であった。プレ B-ALL の抑制遺伝子 Bash 変異の協調遺伝子候補として 7 種の共通挿入部位を同定した。大腸上皮を用いた in vitro 実験系や PiggyBac トランスポゾン の利用により非造血腫瘍解析への途を開いた。

研究成果の概要（英文）：To clarify the molecular mechanism of carcinogenesis, a series of disease genes that are important for cancer progression by using retrovirus insertional mutagenesis. Trib1 has been identified as a specific cooperative gene for Hoxa9/Meis1, and its modulation effects for MEK and C/Ebpa is required for leukemogenesis. Seven common integration sites have been identified as candidate cooperative genes for the mutation of Bash that is a preB-ALL tumor suppressor. Application of the mutagenesis system on non-hematopoietic neoplasms by utilizing the in vitro system of colon epithelial cells and the Piggybac transposon.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	24,000,000	0	24,000,000
2006年度	26,000,000	0	26,000,000
2007年度	26,000,000	0	26,000,000
2008年度	26,000,000	0	26,000,000
2009年度	26,000,000	0	26,000,000
総計	128,000,000	0	128,000,000

研究分野：病理学・分子遺伝学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：レトロウイルス挿入変異、協調遺伝子、骨髄性白血病、間葉系腫瘍、ホメオボックス遺伝子、前駆細胞、トランスポゾン、Trib1

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトの主な高発がん性疾患やがん組織の解析によってがん発生の初期に関与する重要な遺伝子は大部分が同定されたかの感が強かった。し

かしながら、がんの進展や悪性化が単一の遺伝子変化によるものではなく多段階の事象を経て行われることは明らかで、その過程の解明が今後の重要課題となった。一方、シグナル伝達、

転写、蛋白修飾、蛋白の細胞内局在、運動性における異常が発がんに関与していることは明らかになったが、個々の異常が発がん過程全体にどう有機的に寄与しているか、また、増殖、不死化、アポトーシス阻害、脱分化のそれぞれのステップが個々のがんではどのような遺伝子変化に因るものか、といった根本的な疑問に対する解答は依然概念的であり、これからのがんの治療に向けてもより詳細な情報が必要と考えられた。

このようながんの遺伝子変化の重層性を解明する手段として、動物モデルの活用が重要であり、マウス造血器腫瘍の系では、内在性レトロウイルスを有するマウスにおいて多くの原因遺伝子が同定されて来た。レトロウイルスはゲノムに挿入されて、がん化に意味のある部位に挿入され細胞がクローン性増殖を示すと、このウイルスゲノムを標識として比較的容易に周辺にあるがんの原因遺伝子を同定することができる(図1)。マウスゲノム情報がデータベース検索により入手可能となり、腫瘍から遺伝子情報まで迅速に到達することが出来るようになったので、本法は他の変異誘導システムに比べて極めて有利となった。

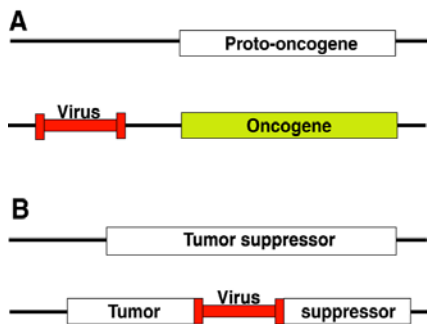


図 1

## 2. 研究の目的

本研究は、レトロウイルス挿入変異を利用してがんの進展に重要な発がんの協調遺伝子 (cooperative gene) を同定し、発がんの分子機構とがん細胞における遺伝子間相互作用を明らかにすることを主な目的とする。さらに、これまで造血器腫瘍に適用が限られていた挿入変異システムを他の組織に応用する技法を開発し、より多くのヒトがんの遺伝子変化の解析への応用を目指す。

特に、がんが高頻度で発生するような遺伝子変化を有するマウス (トランスジェニックモデル、ノックアウトモデル等) に対して、交配により或いは直接投与によりレトロウイルスを導入し、特定の遺伝子異常に協調する遺伝子群を包括的に同定して分子経路を整理する。

## 3. 研究の方法

(1)骨髄性白血病原因遺伝子 *Hoxa9* 及び *Meis1* の協調遺伝子の同定: ホメオボックス遺伝子 *Hoxa9* をマウス骨髄に強発現させると AML が発生するが、その際 *Meis1* は特異的協調遺伝子として AML の進展を促進させることが我々や他のグループの研究から明らかになっている。しかしながら、正常骨髄細胞は *Hoxa9* と *Meis1* の発現のみで白血病化するのではなくさらなる遺伝子変化が必要であると考えられる。*Hoxa9* と *Meis1* を IRES 配列を介して 1 個のレトロウイルスベクターに組み込んで骨髄細胞に導入し、AML を発生させた後、協調遺伝子を同定する。また同定した協調遺伝子の機能解析を行って、分子経路間の協調作用について考察する。

(2)In vitro レトロウイルス挿入変異系の確立と上皮系がん原因遺伝子の同定: マウス上皮系幹細胞、特に消化管上皮を大量に培養しレトロウイルスベクターの挿入により不死化や形質転換を誘導し、原因遺伝子を同定する。レトロウイルスの挿入効率を上げるため Bloom 症候群モデルマウスの細胞の利用も考慮に入れる。この系の確立によって上皮系腫瘍発生の分子機構に迫る。

(3)リンパ腫感受性遺伝子の効果の検討: SL/Kh マウスは内在性レトロウイルスの挿入と *Bomb1* locus の変異により高率で B 細胞性リンパ腫を発症する。*Bomb1* locus 野生型の SL/Kh congenic マウスを作製しレトロウイルス挿入部位を比較検討する。

(4)協調遺伝子の分子経路の検討: 原因遺伝子に対して得られた協調遺伝子の機能を検討する。単なる蛋白としての機能解析にとどまらず、発がん過程における役割について機能補完性、シグナルの上流と下流の問題に注目して、培養細胞や動物モデルを用いた解析を行う。

(5) Bash 変異マウスに MMLV を感染させることによって同定した Bash 変異に協調する遺伝子候補 *C/Ebp-b*、*Sos1* について、協調作用を in vitro 及び in vivo の系で検証を進め、その preB 細胞増殖・分化における機能的意義について調べる。

## 4. 研究成果

(1)急性骨髄性白血病 (AML) の発症において、*Hoxa9* と *Meis1* の協調作用が重要であるが、さらに完全な白血病が形成されるまでにどのような発がんシグナルが必要か検討した。*Hoxa9* と *Meis1* を単一のレトロウイルスベクターでマウス正常骨髄細胞に導入し放射線照射したマウスに骨髄移植をすると、100%の被移植マウスに平均 18 週で AML の発症を認めた。この AML からレトロウイルス挿入部位

を単離し、共通挿入部位から Hoxa9/Meis1 の協調遺伝子候補として Trib1、Evi1、Ahi1、Rara、Pitpnb を同定した。Trib1 と Evi1 については再度 Hoxa9/Meis1 とともに骨髄細胞に導入し、*in vitro* 及び *in vivo* の実験系で白血病発症に対する協調作用を確認した。Trib1 は単独の発現でも 100%のマウスが AML を発症し、この場合 Trib1 レトロウィルスの挿入部位から共通挿入部位として Hoxa7 と Hoxa9 を同定して、Trib1 と Hoxa の協調作用は遺伝学的にも確認された。Trib1 は MAPK のリン酸化を亢進することが知られているが、Trib1 陽性 AML でこの事実を確認した。Trib1 は、MAPK のリン酸化を亢進することを Trib1 陽性 AML を IL-3 により刺激して確認したが、さらに Trib1 は IL-3 欠乏時における MAPK リン酸化を遷延させて、その結果白血病細胞のアポトーシスを阻害することがわかった。Hoxa9 と Meis1 及び Trib1 単独の遺伝子導入により発症した AML では特異的な協調遺伝子の活性化が確認されたのに対して、Hoxa9/Meis1/Trib1 3 者による AML では、更なる特異性の高い協調遺伝子は認められず、AML の進展に伴って遺伝子間の相互作用は特異性が低くなる傾向が示された。さらに、Trib1 による MAPK の活性化には Trib1 と MEK1 の会合が深く関わっていると考えられ、Trib1 は核内において MEK1 の ATP 結合領域及び MEKK 結合領域と会合していることが示された。さらに、Trib1 の解析を進め、C 末端領域に存在する MEK1 結合モチーフを同定した。この結合モチーフを欠いた変異体は白血病発症能や骨髄細胞に対する自己複製促進能を失っていたのみならず、Hoxa9/Meis1 の白血病発症能に対する dominant な抑制効果を示した。また、Trib1 は C/Ebpa とともに結合し C/Ebpa と MEK1 は Trib1 との協調作用において拮抗していることが示唆された。Trib1 の C/Ebpa に対する結合領域は、Trib1 の N 端側に存在していた。一方、MEK1 結合部位の欠失変異体は C/Ebpa に対する分解促進能も失い、Trib1 の C/Ebpa に対する作用は MAPK 経路を介していることが示された。

(2) Apc 遺伝子のヘテロ変異を有する Min マウス由来大腸上皮細胞株にレトロウィルスを導入して、軟寒天培地でコロニー形成を誘導した。これらの形質転換コロニーからレトロウィルス挿入部位を同定し、このシステムが造血細胞以外の組織にも適応出来る可能性を示したのみならず、共通挿入部位 Dnah3 と Ahnak を発見し、これらの遺伝子の活性化が Apc 変異による細胞骨格の異常を強めていることを示した。

(3) マウス pre-B 細胞性腫瘍の感受性遺伝子座 Bomb1 の解析を進め、この遺伝子座の範囲をこれまでの 36 Mb から最終的に 1.5 Mb に絞り込み候補遺伝子として Enpep/Bp1 を同定するとともに、Bomb1 特異的な SNPs を明らかにした。

(4) 協調遺伝子が存在する分子経路間の相互作用を考察した。Hoxa9/Meis1 は上流の MLL を含めて、Trib1 が機能を修飾する MAPK 経路と特異的相互作用を示すことが示唆された。さらに、Hoxa9 と Meis1 の分子機構の詳細を明らかにした。Hoxa9 と Meis1 によりトランスフォームした骨髄細胞から Meis1 を除去すると、細胞分化の促進・細胞増殖能と自己複製能の低下が顕著に認められ、細胞回転促進遺伝子の発現低下や顆粒球・マクロファージ・血小板分化関連遺伝子の発現増強が認められた。特に Cd34 や c-Maf は Meis1 の標的遺伝子として重要な役割を果たしていることが示された。さらに、Meis1 の標的遺伝子を明らかにする目的で ChIP sequencing を行った。全ゲノムレベルで Meis1 及び Hoxa9 の結合部位を明らかにし、候補遺伝子を同定した。さらに、Meis1 の有無による Hoxa9 の結合部位のシフトが明らかになった。

(5) B 細胞受容体シグナル経路においてアダプターとして機能している Bash 遺伝子のホモノックアウトマウスは pre-B 細胞の分化異常と pre-B-ALL が生じ、Bash は ALL のがん抑制遺伝子と考えられている。Bash ホモノックアウトマウスにモロニー白血病ウィルスを接種して pre-B-ALL 発症が促進することを見出した。7 種類の共通挿入部位を同定し Bash 変異に協調する遺伝子候補を同定した。この内 C/Ebpb の short isoform 及び Pu. 1 の発現亢進と Bash 変異が preB 細胞の自己複製能の亢進に協調作用を示すことを明らかにした。

(6) レトロウィルス挿入変異部位のシーケンス特異性について検討し、RNA の二次構造との関連性を示唆した。*in vitro* において逆転写酵素とレトロウィルス LTR を用いて実際にヘアピン構造が予測される塩基配列に高頻度でウィルス挿入が生じることを見出した。

(7) 挿入変異原として PiggyBac (PB) トランスポゾンも導入し、非血液腫瘍への応用を行った。ヒト骨軟部肉腫の原因となっているキメラ遺伝子群を間葉系幹細胞・前駆細胞にレトロウィルスベクターまたは PB トランスポゾンに組み込んで導入すると、組み込み後のトランスポジションが生じ未分化な間葉系悪性腫瘍が誘導された。キメラ遺伝子が本来生じている肉腫の形質の反映にはキメラが発現する母地となる細胞環

境が重要であることが示唆された。さらに、SYT-SSX1、EWS-ERG、EWS-FLI1 を胎児由来間葉系前駆細胞に導入した後ヌードマウスに移植すると、SYT-SSX1 により滑膜肉腫様短紡錘形肉腫が EWS-ERG により Ewing 肉腫様小円形細胞肉腫が発生した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 19 件)

1. Tsuruyama T, Imai Y, Takeuchi H, Hiratsuka T, Maruyama Y, Kanaya K, Kaszynski R, Jin G, Okuno T, Ozeki M, Nakamura T, Takakuwa T, Manabe T, Tamaki K, Hiai H. Dual retrovirus integration tagging: identification of new signaling molecules Fiz1 and Hipk2 that are involved in IL-7 signaling pathway in B lymphoblastic lymphomas. **J Leukocyte Biol**, 査読有, in press.
2. Fujino T, Nomura K, Ishikawa Y, Makino H, Umezawa A, Aburatani H, Nagasaki K, Nakamura T. Function of EWS-POU5F1 in sarcomagenesis and tumor cell maintenance. **Am J Pathol**, 査読有, 176, 1973-1982, 2010.
3. Kaszynski RH, Akatsuka S, Hiratsuka T, Jin G, Ozeki M, Okuno T, Nakamura T, Manabe T, Takakuwa T, Hiai H, Toyokuni S, Tamaki K, Tsuruyama T. A quantitative trait locus responsible for inducing B-cell lymphoblastic lymphoma is a hotspot for microsatellite instability. **Cancer Sci** 査読有, 101, 800-805, 2010.
4. Makino H, Toyoda M, Matsumoto K, Saito H, Nishino K, Fukawatase Y, Machida M, Akutsu H, Uyama T, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Fujino T, Ishikawa Y, Nakamura T, Umezawa A. Mesenchymal to embryonic incomplete transition of human cells by chimeric OCT4/3 (POU5F1) with physiological co-activator EWS. **Exp Cell Res**, 査読有, 315, 2727-2740, 2009.
5. Miyazaki K, Yamasaki N, Oda H, Kuwata T, Kanno Y, Miyazaki M, Komeno Y, Kitaura J, Honda Z, Warming S, Jenkins NA, Copeland NG, Kitamura T, Nakamura T, Honda H. Enhanced expression of *p210BCR/ABL* and aberrant expression of *Zfp423/ZNF423* induce blast crisis of chronic myelogenous leukemia. **Blood**, 査読有, 113, 4702-4710, 2009.
6. Komai Y, Fujiwara M, Fujii Y, Mukai H, Yonese J, Kawakami S, Yamamoto H, Migita T, Ishikawa Y, Kurata M, Nakamura T, Fukui I. Adult Xp11 translocation renal cell carcinoma diagnosed by cytogenetics and immunohistochemistry. **Clin Cancer Res**, 査読有, 15, 1170-1176, 2009
7. Su Q, Prosser HM, Campos LS, Ortiz M, Nakamura T, Warren M, Dupuy AJ, Jenkins NA, Copeland NG, Bradley A, Liu P. A DNA transposon based approach to validate oncogenic mutations in the mouse. **Proc Natl Acad Sci USA**, 査読有, 105, 19904-19909, 2008.
8. Kuwata T, Nakamura T. BCL11A is a SUMOylated protein and recruits SUMO-conjugation enzymes in its nuclear body. **Genes Cells**, 査読有, 13, 931-940, 2008.
9. Hiratsuka T, Tsuruyama T, Kaszynski R, Kometani K, Minato N, Nakamura T, Tamaki K, Hiai H. Bone marrow pre-B expansion by SL/Kh Bomb1 locus: not sufficient for lymphomagenesis. **Leukemia Res**, 査読有, 32, 309-314, 2008.
10. Tanaka M, Jin G, Yamazaki Y, Takahara T, Takuwa M, Nakamura T. Identification of candidate cooperative genes of the *Apc* mutation in transformation of the colon epithelial cell by retroviral insertional mutagenesis. **Cancer Sci**, 査読有, 99, 979-985, 2008.
11. Jin G, Yamazaki Y, Takuwa M, Takahara T, Kaneko K, Kuwata T, Miyata S, Nakamura T. Trib1 and Evl1 cooperate with Hoxa and Meis1 in myeloid leukemogenesis. **Blood**, 査読有, 109, 3998-4005, 2007.
12. Kawamura-Saito M, Yamazaki Y, Kaneko K, Kawaguchi N, Kanda H, Mukai H, Gotoh T, Motoi T, Fukayama M, Aburatani H, Takizawa T, Nakamura T. Fusion between CIC and DUX4 up-regulates PEA3 family genes in Ewing-like sarcomas with t(4;19)(q35;q13) translocation. **Hum Mol Genet**, 査読有, 15, 2125-2137, 2006.
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 leukaemogenesis in BXH2 mice. **Br J Haematol**, 査読有, 131, 495-507, 2005
14. 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**, 査読有, 24, 4477-4485, 2005
15. Nakamura T. NUP98 fusion in human leukemia: dysregulation of the nuclear pore and homeodomain proteins. **Int J Hematol**, 査読有, 82, 21-27, 2005
16. Nakamura T. Meis and Hox: a mighty pair

- defeats apoptosis. **Blood**, 査読有, 105, 909-910, 2005
17. Nakamura T. Retroviral insertional mutagenesis identifies oncogene cooperation. **Cancer Sci**, 査読有, 96, 7-12, 2005
  18. 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**, 査読有, 43, 217-222, 2005
  19. 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**, 査読有, 105, 784-793, 2005
- [学会発表] (計 68 件)
1. Molecular dissection of myeloid leukemogenesis, 中村卓郎  
第 68 回日本癌学会学術総会  
2009 年 10 月 2 日 (横浜)
  2. The role of homeodomain proteins in myeloid leukemogenesis, Nakamura T  
US-Japan Cooperative Cancer Workshop on Stem Cells in Normal and Malignant Hematopoiesis  
2009 年 3 月 29 日 (ハワイ)
  3. The role of homeodomain genes in myeloid leukemogenesis, Nakamura T  
International Symposium on New Frontiers in Cancer Research  
2009 年 3 月 18 日 (札幌)
  4. ホメオドメイン遺伝子経路を巡る白血病発症機構, 中村卓郎  
平成 20 年度がん特定研究 5 領域合同シンポジウム  
2009 年 2 月 3 日 (東京)
  5. Identification of new molecular pathways in carcinogenesis by retroviral tagging, Nakamura T  
金沢大学がん生物国際シンポジウム 2008  
2008 年 1 月 24 日 (金沢)
  6. Understanding multi-step carcinogenesis using retroviral insertional mutagenesis, Nakamura T  
The 12th Korea-Japan Cancer Research Workshop  
2007 年 12 月 22 日 (札幌)
  7. Molecular mechanisms of Hoxa9/Meis1-induced myeloid leukemogenesis, Nakamura T  
第 66 回日本癌学会学術総会  
2007 年 10 月 4 日 (横浜)
  8. Molecular mechanisms of Hoxa9/Meis1-induced myeloid leukemogenesis, Nakamura T  
7th International Workshop on Molecular Aspects of Myeloid Stem Cell Development and Leukemia  
2007 年 5 月 15 日 (Annapolis, MD, USA)
  9. Homeodomain proteins in leukemogenesis and hematopoiesis, Nakamura T  
USA-Japan Cooperative Seminar on Hematological Malignancy  
2007 年 3 月 21 日 (Kauai, HI, USA)
  10. レトロウイルス挿入変異を用いた白血病発症機構の解析, 中村卓郎  
第 23 回日本疾患モデル学会総会シンポジウム  
2006 年 11 月 30 日 (伊香保)
  11. レトロウイルス挿入変異を用いた白血病発症過程の解析, 中村卓郎  
第 65 回日本癌学会総会シンポジウム  
2006 年 9 月 28 日 (横浜)
  12. Molecular evolution of Hoxa9/Meis1-induced myeloid leukemia, Nakamura T  
International Symposium on Functional Mouse Genomics  
2006 年 7 月 21 日 (Frederick, MD, USA)
  13. Hoxa9/Meis1 cooperation and the molecular pathway in leukemogenesis, Nakamura T  
EMBO/SEMM Workshop on homeodomain proteins, hematopoietic development and leukemias  
2006 年 3 月 25 日 (Riva del Garda, Italy)
  14. レトロウイルス挿入変異システムを用いた発がん分子過程の解析, 中村卓郎  
第 3 回日本癌学会カンファレンス  
2006 年 3 月 10 日 (蓼科)
- [図書] (計 0 件)  
[産業財産権]  
○出願状況 (計 0 件)
- 名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :
- 取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.jfcr.or.jp/laboratory/tci/carcinogenesis/index.html>

#### 6. 研究組織

権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計◇件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.jfcr.or.jp/laboratory/tci/carcinogenesis/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中村 卓郎 (NAKAMURA TAKURO)

財団法人 癌研究会・癌研究所

発がん研究部・部長

研究者番号：00180373

##### (2) 研究分担者

鶴山 竜昭 (TURUYAMA TATUAKI)

京都大学・医学研究科 病理系法医学教室・

講師

研究者番号：0030842

(H20～H21：連携研究者)

田中 美和 (TANAKA MIWA)

財団法人 癌研究会・癌研究所

発がん研究部・研究員

研究者番号：70345883

(H21)

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：