

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2005～2007

課題番号：17390283

研究課題名 (和文) 転写因子による造血制御機構と白血病発症機構の解析

研究課題名 (英文) Analysis of mechanisms in hematopoietic regulation and leukemia development

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

研究成果の概要：多くの白血病は染色体転座によって形成されるキメラ型転写因子を原因として発症する。本研究においては、t(3;21)の結果形成される RUNX1/EVI1 の機能を発生工学的に解析するとともに、その標的遺伝子の探索を行った。また、12p13 転座の標的がん抑制遺伝子 TEL の機能を分子生物学的・細胞生物学的に解析するとともに、骨髄異形成症候群における発現の変化を観察した。さらに、inv(12)の結果形成される TEL/PTPRR の機能を解析した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	5,200,000	0	5,200,000
2006年度	4,100,000	0	4,100,000
2007年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	12,600,000	990,000	13,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：転写因子、RUNX1/EVI1、TEL、がん抑制因子、染色体転座、白血病、骨髄異形成症候群、ノックインマウス

## 1. 研究開始当初の背景

急性白血病・骨髄異形成症候群においては、染色体相互転座によるキメラ遺伝子の形成が重要な発症機構のひとつであると考えられている。代表的な転座は 21q22 転座、12p13 転座であり、それぞれの標的遺伝子は RUNX1 遺伝子、TEL 遺伝子である。これらの遺伝子は転写因子をコードしている。RUNX1 及び TEL は造血の発生及び分化制御に重要な役割を担っていることが細胞生物学的・発生工学的に示されて来た。一方、染色体転座の結果形成されるキメラ遺伝子は野生型の転写因子

の機能をドミナント・ネガティブに抑制したり、転座相手依存性に新規の機能を獲得したりして、がん遺伝子としての機能を発揮することが示されている。急性巨核芽球性白血病、慢性骨髄性白血病及び骨髄異形成症候群の急性白血病移行期に観察される t(3;21)の結果形成される RUNX1/EVI1 遺伝子は自らクローニングしたキメラ遺伝子であり、野生型 RUNX1 に対するドミナント・ネガティブ効果、TGFβシグナルの遮断効果、JNK の抑制効果、AP1 活性の刺激効果を発揮することを明らかにしてきた。一方、急性骨髄性白血病症例に

観察された inv(12)より新規キメラ遺伝子 TEL/PTPRR のクローニングに成功した。PTPRR は TEL の転座相手としては初めての受容体型ホスファターゼである。

## 2. 研究の目的

本研究では、TEL の正常造血制御に果たす役割を明らかにするとともに、TEL キメラ及び AML1 キメラを原因とする転座型白血病の発症機構の解明を目的として以下の解析を行う。

- (1) TEL の細胞生物学的機能を解析し、その分子基盤を明らかにする。
- (2) TEL 遺伝子の異常が骨髄異形成症候群発症に関与する可能性について検討する。
- (3) TEL/PTPRR の分子生物学的・細胞生物学的機能の解析を行う。
- (4) RUNX1/EVI1 の発生工学的機能を解析する。
- (5) RUNX1/EVI1 の標的分子を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) TEL の細胞生物学的機能の解析

TEL の発現ベクターをマウス骨髄細胞 32D に遺伝子導入し、サイトカインの存在下で分化能・増殖能への影響を検討した。また、PI/Annexin V の二重染色及びミトコンドリアの膜電位測定 (JC-1 染色) により、アポトーシスの誘導の有無を評価した。さらに、アポトーシス誘導の分子基盤を明らかにするために、p53 蛋白の発現をウエスタン解析、ゲルシフト・アッセイ及びレポーター・アッセイにより検討した。さらに、p53 の標的遺伝子 (p21、Bax、Puma、Bid、Bak) の発現を real-time PCR 法で解析した。最後に、TEL のアポトーシスの誘導効果が p53 を介するものであるかどうかを、p53 抑制剤 pifithrin- $\alpha$  の添加及び Bcl-2 の共発現により検討した。

### (2) 骨髄異形成症候群における TEL 発現の検討

MDS の患者 40 例 (RA 13 例、RARS 1 例、RAEB 18 例、RAEB-t 6 例、CMMoL 2 例) 及び正常人 9 例の骨髄有核細胞より mRNA を抽出した。これを鋳型として real-time PCR 法により TEL mRNA の発現レベルを定量した。また、p53 及び TEL の遺伝子変異の有無を直接シーケンス法を用いて検討した。

### (3) TEL/PTPRR の機能の解析

inv(12)の結果短縮型 TEL (tTEL) と TEL/PTPRR キメラが発現していることが明らかになった。これらの異常分子の分子生物学的機能を評価するために、ウエスタン解析

で細胞内局在を、免疫沈降法で野生型 TEL との会合の有無を、ゲルシフト・アッセイにより DNA 結合能を、ETS レポーター・アッセイにより転写抑制能を解析した。また、野生型 PTPRR をコントロールとしてホスファターゼ・アッセイを施行した。さらに、tTEL 及び TEL/PTPRR の細胞生物学的機能を評価するために、発現ベクターを用いてヒト白血病細胞株 UT-7/GM に導入し、GM-CSF 存在下及び非存在下での増殖の変化を観察した。最後に、これらの異常分子発現に伴う MAP キナーゼ、PI3 キナーゼ、JAK/STAT 各シグナルの活性化状態の変化を評価するために、シグナル伝達分子のリン酸化状態をウエスタン法で解析した。

### (4) RUNX1/EVI1 の発生工学的機能の解析

RUNX1/EVI1 のノックインヘテロマウスは中枢神経系への出血と胎仔肝造血の廃絶により胎生致死となる。胎仔肝造血を詳細に評価する目的で、造血コロニー・アッセイを施行し、造血細胞の電子顕微鏡的観察を行った。さらに、RUNX1/EVI1 の標的遺伝子を明らかにするために、造血関連遺伝子の発現を半定量 PCR 法により解析し、RUNX1 ノックアウトマウスと比較した。

また、ノックインキメラマウスの白血病発症の有無を観察した。

### (5) RUNX1/EVI1 の標的分子の検討

RUNX1/EVI1 の骨髄系細胞の分化に及ぼす効果を検討する目的で、発現ベクターをマウス LG-3 細胞に導入した。G-CSF 存在下での分化を形態学的に評価するとともに、ペルオキシダーゼ染色により定量的にも評価した。C/EBP $\alpha$  は標的遺伝子の転写を活性化することにより顆粒球分化を促進するが、自らの遺伝子プロモーターの転写も活性化することが知られている。そこで、RUNX1/EVI1 と C/EBP $\alpha$  の会合の有無を免疫沈降法で評価するとともに、CEBPA プロモーターを用いたレポーター・アッセイ及びゲルシフト・アッセイを用いて、RUNX1/EVI1 が C/EBP $\alpha$  の転写活性化能及び DNA 結合能に及ぼす影響を検討した。RUNX1/EVI1 の骨髄球に対する分化抑制効果が C/EBP $\alpha$  の抑制を介するものであるかどうかを、RUNX1/EVI1 発現細胞に C/EBP $\alpha$  を共発現させることで検討した。

## 4. 研究成果

### (1) TEL の細胞生物学的機能の解析

TEL 発現 32D 細胞は IL-3 存在下では増殖速度がやや低下したが、G-CSF の存在下では急速に死滅した。この際に sub-G1 分画及び PI(-)/Annexin V(+)分画が増加しており、ミトコンドリアの膜電位が低下していたこと

から、内因性のアポトーシスが誘導されていることが明らかになった。興味深いことに、TEL 発現細胞では p53 蛋白の発現レベルが高く、p53-DNA 複合体もより強く形成されており、p53 の転写活性化能が亢進していた。p53 の発現を負に制御する MDM2 の発現には変化がなかった。p53 の標的遺伝子の発現を検討した所、G-CSF の存在下で Puma の発現が経時的に増加していくことが証明された。TEL のアポトーシスの誘導効果は pifithrin- $\alpha$  の添加により一時的に抑制されることから、p53 の発現亢進を介するものである可能性が示唆された。Bcl-2 を共発現させた場合には、TEL によるアポトーシスの誘導効果が完全に回避されたことから、少なくとも TEL のアポトーシス誘導効果はミトコンドリアを介する内因性経路の活性化によるものであることが明らかになった。

TEL は線維芽細胞において細胞周期の回転を止めアポトーシスを誘導することから、がん抑制因子として機能すると考えられていた。今回、TEL は造血細胞においてもがん抑制因子としての機能があること、しかも p53 の上位の制御因子であることが明らかにされた。

#### (2) 骨髄異形成症候群における TEL 発現の検討

正常及び多くの骨髄異形成症候群検体で TEL の発現が観察されたが、6 例の骨髄異形成症候群検体ではほとんど発現が観察されなかった。病型の内訳は、RA 3 例、RAEB 2 例、RAEB-t 1 例であった。骨髄異形成症候群の約 1 割の症例で発現が低下していると考えられた。一方、TEL の遺伝子変異は観察されなかったが、p53 の遺伝子変異は RA 1 例、RAEB-t 2 例、CMMoL 1 例の 4 例に観察された。TEL 遺伝子の低発現と p53 遺伝子の変異が同一症例で認められることはなかった。

骨髄異形成症候群においては、TEL は遺伝子座の欠失あるいはドミナント・ネガティブアイソフォームの相対的発現増加により失活していることが知られているが、発現の低下により失活している症例が存在することが明らかになった。TEL の発現が低下する機序は現在の所不明である。一方、p53 の LOH と遺伝子変異による失活は骨髄異形成症候群の白血病化に役割があることが知られている。今回 p53 の遺伝子変異と TEL 遺伝子の発現低下は相補的に観察されたことから、TEL の発現低下は p53 失活のひとつの重要な機序であると考えられた。

#### (3) TEL/PTPRR の機能の解析

野生型 TEL が核内に局在しているのに対して、tTEL 及び TEL/PTPRR は細胞質内に

局在していた。tTEL 及び TEL/PTPRR は野生型 TEL とヘテロマーを形成しており、共発現により野生型 TEL を核から細胞質に引き出す機能があることが明らかになった。tTEL 及び TEL/PTPRR には DNA 結合能・転写抑制能は存在しなかったが、共発現により野生型 TEL の DNA 結合能・転写抑制能を抑制した。両分子とも野生型 PTPRR とは異なり、ホスファターゼ活性は示さなかった。TEL/PTPRR は GM-CSF 依存性に増殖するヒト白血病細胞株 UT-7/GM にサイトカイン非依存性の増殖をもたらした。tTEL にはそのような効果は認められなかった。tTEL 及び TEL/PTPRR 発現細胞ではモック細胞と異なり、GM-CSF 除去後も STAT3 のリン酸化状態が維持されていることが明らかになった。他のシグナル伝達経路の活性化は観察されなかった。

inv(12)型白血病においては、がん抑制因子 TEL の失活と STAT3 の恒常的活性化が白血病の発症機構であると考えられた。TEL/PTPRR に tTEL には存在しないどのような付加的分子生物学的機能があるのかは不明であった。

#### (4) RUNX1/EVI1 の発生工学的機能の解析

胎仔肝細胞を用いたコロニー・アッセイにより、RUNX1 ノックアウトマウスの胎仔肝には造血前駆細胞が全く存在しないのに対して、RUNX1/EVI1 ノックインマウスの胎仔肝には分化異常があり（赤芽球には分化せず、異形成のある骨髄球及び巨核球には分化する）、自己複製能の亢進した造血前駆細胞が残存していることが明らかになった。

胎仔肝細胞における遺伝子発現の解析の結果、RUNX1 ノックアウトマウスでは PU.1 の発現がほぼ消失していたが、RUNX1/EVI1 ノックインマウスでは残存していた。PU.1 の発現維持が RUNX1/EVI1 ノックインマウスの胎仔肝における造血前駆細胞の残存に関与している可能性がある。PU.1 の標的遺伝子 CD11b の発現も RUNX1/EVI1 ノックインマウスにのみ認められた。一方、RUNX1 ノックアウトマウスと RUNX1/EVI1 ノックインマウスの両方で赤芽球分化に重要な LMO2 及び SCL の発現が著減していた。いずれのマウスにおいても GATA1 の発現は維持されていたが、RUNX1/EVI1 ノックインマウスでは GATA1 の標的遺伝子 ALAS-E 及び  $\beta$ -globin の発現がより強く抑制されていた。これは RUNX1/EVI1 陽性細胞で発現している PU.1 が GATA1 の機能を負に制御している結果であると考えられた。RUNX1/EVI1 ノックインマウスの造血前駆細胞が赤芽球分化能を失っているのは、赤芽球分化に必須の転写因子群が機能的に失活しているためと推測された。

RUNX1/EVI1 キメラマウスに生後 5 ヶ月で急性巨核芽球性白血病の発症が観察された。白血病細胞は肝脾に浸潤しており、電子顕微鏡的血小板ペルオキシダーゼが陽性であった。このことは、RUNX1/EVI1 が腫瘍の表現型を決定するとともに、ワン・ヒットで白血病を発症させる可能性を示唆している。

#### (5) RUNX1/EVI1 の標的分子の検討

RUNX1/EVI1 をマウス LG-3 細胞に遺伝子導入した所、G-CSF 存在下での好中球への終末分化が阻害された。COS7 細胞に過剰発現させた RUNX1/EVI1 と C/EBP $\alpha$  の会合が免疫沈降法で証明されたことから、両者は機能的に相互作用する可能性が示唆された。レポーター・アッセイでは、RUNX1/EVI1 は C/EBP $\alpha$  の転写活性化能を抑制したが、EVI1 部分の CtBP 結合部位の変異体はその抑制能を失っていた。従って、RUNX1/EVI1 はヒストン脱アセチル化酵素のリクルートを介して C/EBP $\alpha$  の転写活性化能を抑制すると考えられた。さらに、ゲルシフト・アッセイにより、RUNX1/EVI1 は C/EBP $\alpha$  の DNA 結合能を抑制することも明らかになった。最後に、RUNX1/EVI1 発現 LG-3 細胞に C/EBP $\alpha$  を過剰発現させた所、分化能の回復が観察された。RUNX1/EVI1 は C/EBP $\alpha$  を標的として分化抑制効果を発揮し、造血幹細胞腫瘍を白血病化させる可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Maki K, Porcher C, Shimizu R, Yamamoto M, Mitani K: Leukaemia-related transcription factor TEL/ETV6 expands erythroid precursors and stimulates haemoglobin synthesis. **Cancer Sci** (in press). (査読有り)
2. Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Ohyashiki K, Yamagata T, Mitani K: Enhanced expression of the EVI1 gene in NUP98/HOXA-expressing leukemia cells. **Int J Hematol** 89: 253-256, 2009. (査読有り)
3. Sasaki K, Yamagata T, Mitani K: Histone deacetylase inhibitors trichostatin A and valproic acid circumvent apoptosis in human leukemic cells expressing the RUNX1 chimera. **Cancer Sci** 99: 414-422, 2008. (査読有り)
4. Tokita K, Maki K, Mitani K: RUNX1/EVI1 that blocks myeloid differentiation inhibits CCAAT-enhancer binding protein  $\alpha$  function. **Cancer Sci** 98: 1752-1757, 2007. (査読有り)
5. Yamagata T, Nakamura Y, Mitani K: Low expression of ETV6/TEL found in patients with myelodysplastic syndrome. **Int J Hematol** 86: 282-285, 2007. (査読有り)
6. Tokita K, Maki K, Tadokoro J, Nakamura Y, Arai Y, Sasaki K, Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Mitani K: Chronic idiopathic myelofibrosis expressing a novel type of *TEL-PDGFRB* chimera responded to imatinib mesylate therapy. **Leukemia** 21: 190-192, 2007. (査読有り)
7. Nakamura Y, Maki K, Sasaki K, Kitabayashi I, Mitani K: A novel TEL/ETV6 binding protein KAP1 does not contribute to its transcription-repressive activity. **Int J Hematol** 84: 377-380, 2006. (査読有り)
8. Yamagata T, Maki K, Waga K, Mitani K: TEL/ETV6 induces apoptosis in 32D cells through p53-dependent pathways. **Biochem Biophys Res Comm** 347: 517-526, 2006. (査読有り)
9. Maki K, Yamagata T, Yamazaki I, Oda H, Mitani K: Development of megakaryo-blastic leukemia in Runx1-Evil knock-in chimaeric mouse. **Leukemia** 20: 1458-1460, 2006. (査読有り)
10. 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. (査読有り)
11. 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. (査読有り)
12. 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. (査読有り)

[学会発表] (計 14 件)

1. Mitani K: Roles of leukemia-related transcription factor TEL in erythropoiesis. 第 8 回国際ポルフィリン・ヘムシンポジウム 2008. 10. 16 (島根)
2. 佐々木 光: RUNX1 キメラ型白血病に対

- するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の作用機序の解析 第 69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会 2007. 10. 12 (横浜)
3. 石前峰斉: 7:11 転座における HOXA 遺伝子とその協調因子遺伝子の発現 第 69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会 2007. 10. 11 (横浜)
  4. 江口真理子: 白血病関連転写因子 TEL は赤芽球系前駆細胞を増加させる 第 69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会 2007. 10. 11 (横浜)
  5. 山形哲也: MDS 症例における p53 関連経路の解析 第 69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会 2007. 10. 11 (横浜)
  6. 石前峰斉: 白血病関連転写因子 TEL は赤芽球系前駆細胞を増加させる 第 66 回日本癌学会総会 2007. 10. 4 (横浜)
  7. 牧 和宏: RUNX1 関連白血病発症の分子機構と新規治療法の開発 第 66 回日本癌学会総会 2007. 10. 5 (横浜)
  8. Mitani K: Normal and abnormal hematopoiesis by leukemia-related transcription factor TEL. USA-Japan Cooperative Cancer Research Program 2007. 3. 21 (Kauai)
  9. 中村由香: 新規 TEL 結合蛋白 KAP-1 の同定と機能解析 第 68 回日本血液学会総会・第 48 回日本臨床血液学会総会 2006. 10. 7 (福岡)
  10. 鍋田勝哉: AML1/Evi1 による C/EBP $\alpha$  の抑制効果 第 68 回日本血液学会総会・第 48 回日本臨床血液学会総会 2006. 10. 6 (福岡)
  11. 牧 和宏: Runx1-Evi1 ノックインキメラマウスの急性巨核芽球性白血病の発症 第 68 回日本血液学会総会・第 48 回日本臨床血液学会総会 2006. 10. 7 (福岡)
  12. 鍋田勝哉: AML1/Evi1 による C/EBP $\alpha$  の抑制効果 第 65 回日本癌学会総会 2006. 9. 28 (横浜)
  13. 佐々木光: ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の AML1 キメラ型白血病に対する有用性の検討 第 67 回血液学会総会・第 47 回日本臨床血液学会総会 2005. 9. 18 (横浜)
  14. Mitani K: Dysplastic definitive hematopoiesis in AML1/Evi-1 knock-in mice. The 8<sup>th</sup> International symposium on myelodysplastic syndrome. 2005. 5. 13 (Nagasaki)

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

和賀 一雄 (WAGA KAZUO)  
獨協医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 00285917  
佐々木 光 (SASAKI KO)  
獨協医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 60282638  
牧 和宏 (MAKI KAZUHIRO)  
獨協医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 50337391

### (3) 連携研究者

なし