

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04227

研究課題名(和文) 幹細胞白血病の分子病態と分化・増殖制御

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of leukemogenesis and stem cell regulation

研究代表者

野阪 哲哉 (Nosaka, Tetsuya)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30218309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまで、MLL-ENLによる白血病発症にPLZFが重要な役割を担うことを見出し、さらにPLZFの下流で、ハエの眼の発生に関与する遺伝子Eya2が重要な働きをすることを明らかにした。同時に、PLZF-RARAによる白血病発症にもEya2が関与することを見出した。今回、小児ALLの中で最も予後不良な白血病のひとつであるE2A-HLFによる白血病発症においてもEya2が重要な働きを担うことを明らかにし、難治性白血病の分子標的療法の可能性を示唆した。一方、MLL-ENL下流で発現が上昇しているTet1はコンディショナルノックアウトマウスの解析で白血病の表現型に影響を与えないことも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児の白血病は比較的予後が良いものが多いが、中には予後不良のものがある。小児急性リンパ性白血病の原因遺伝子の一つにE2A-HLFが知られているが、同遺伝子によって発症した白血病は予後が悪く、その分子機構も不明な点が多い。我々はE2A-HLFによって生じる白血病発症の分子機構としてEya2という転写活性化因子の関与を明らかにした。このことによって、難治性白血病に対する将来の分子標的療法の可能性を開いたと言える。

研究成果の概要(英文)：We previously showed that PLZF plays a critical role in MLL-ENL-mediated leukemogenesis, and Eya2, an essential gene for eye development in Drosophila, was found to be important as a downstream molecule of PLZF in the leukemogenesis. Here we report that Eya2 has a critical role in leukemogenesis by E2A-HLF, a responsible gene for one of the most aggressive pediatric lymphoid leukemias, suggesting Eya2 as a possible target for a molecular therapy against therapy-resistant leukemias. Meanwhile, Tet1, one of the upregulated genes downstream of MLL-ENL, has been found to give no effects on the phenotype of MLL-ENL-mediated leukemia, by analyses using Tet1 conditional knockout mice we have developed.

研究分野：血液学、分子生物学

キーワード：MLL Eya2 E2A-HLF 白血病 染色体転座

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は独自に開発した MLL (Mixed Lineage Leukemia) -ENL (Eleven Nineteen leukemia) 誘導発現型トランスジェニックマウスを用いた実験により、PLZF (Promyelocytic Leukemia Zinc Finger) 遺伝子が重要な働きを担っていることを明らかにし (Ono R et al., Blood, 2013)、さらに、PLZF の下流で Eya2 (Eyes absent homolog 2) 遺伝子が重要な働きをしていることを見出した (Ono R et al., Mol Cell Biol, 2017)。今回、予後不良の小児急性リンパ性白血病の原因遺伝子 E2A (Immunoglobulin enhancer-binding factor) -HLF (Hepatic Leukemia Factor) による白血病発症の分子機構を解析し、Eya2 の役割を探った。

2. 研究の目的

E2A-HLF による白血病発症の分子機構は未解明な点が多く、その詳細を探ることは将来的には治療にも役立つ可能性がある。今回、E2A-HLF の下流で Eya2 が細胞のがん化に関与している可能性を探る。

3. 研究の方法

E2A-HLF の野生型と変異体をレトロウイルスベクターに導入し、マウス造血幹・前駆細胞を用いて colony replating assay を行い、E2A-HLF によるトランスフォーメーションの分子機構を明らかにする。そして、Eya2 遺伝子発現レベルとの相関関係を解析する。さらに、shRNA を用いて Eya2 発現を抑制した場合の表現型を観察する。また、Eya2 遺伝子のプロモーター・エンハンサー領域を用いてクロマチン免疫沈降-定量的 PCR (ChIP-qPCR) 解析及びレポーターアッセイを行い、E2A-HLF による Eya2 遺伝子発現調節機構を解析する。同領域に E2A-HLF 結合コンセンサス配列が存在するかを調べ、存在する場合は、当該領域に変異を導入し、転写活性化への影響を解析する。

4. 研究成果

(1) E2A-HLF によるマウス造血幹・前駆細胞の不死化と Eya2 遺伝子発現レベルの相関

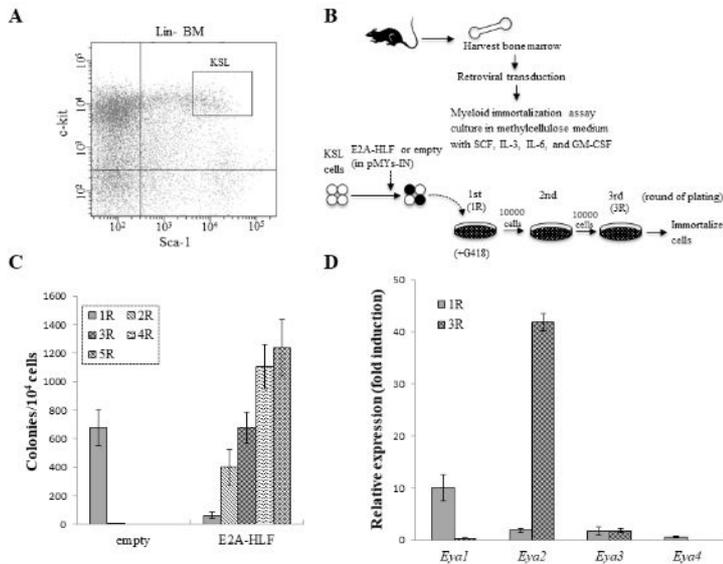


Figure 1

左図のように E2A-HLF を強制発現させたマウス造血幹・前駆細胞において Eya ファミリー遺伝子のうち、Eya2 が高発現していることが明らかになった。

(2) 種々の E2A-HLF 変異体と変異による不死化能の喪失

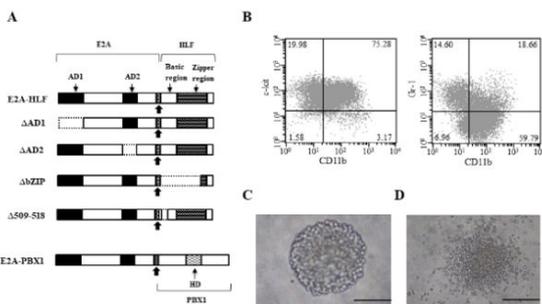


Figure 2

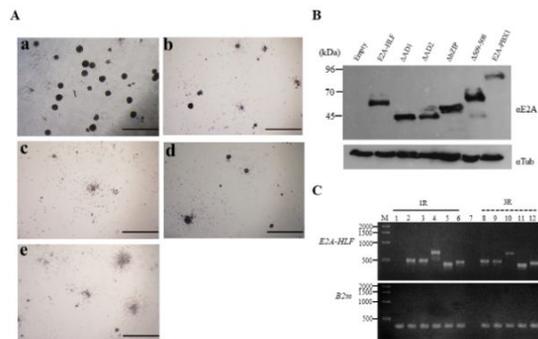


Figure 3

前頁図に示したとおり、E2A-HLF 各種変異体ではコロニー形成能が消失した(左図 C は野生型、D は  $\Delta 509-518$  変異体； 右図 A の a は野生型、b は  $\Delta AD1$ 、c は  $\Delta AD2$ 、d は  $\Delta bZIP$ 、e は  $\Delta 509-518$ )。

### (3) 各種 E2A-HLF 変異体と変異による Eya2 発現レベルの低下

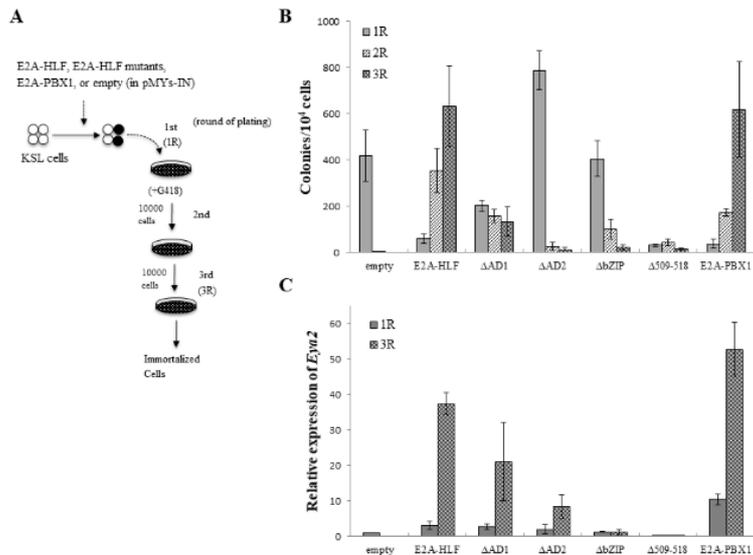


Figure 4

左図に示したとおり、各種 E2A-HLF 変異体は 3rd round でのコロニー形成能がほぼ消失し、その際、Eya2 の発現レベルも低下していた。E2A-PBX1 は陽性コントロール。

### (4) Eya2 ノックダウンとそれに伴う E2A-HLF による不死化能の抑制

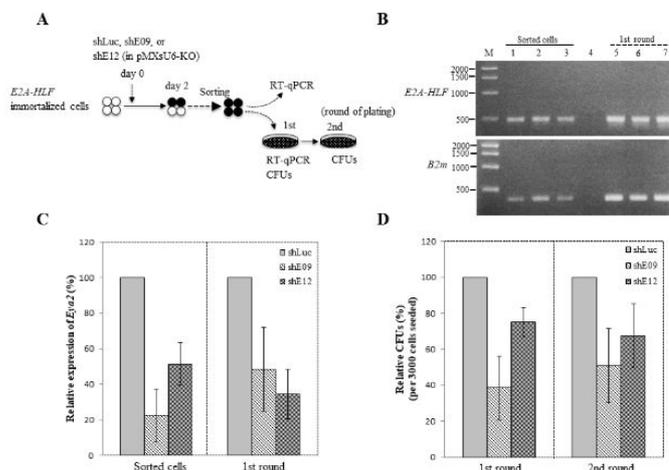


Figure 5

左図に示したとおり、レトロウイルスベクターを用いて Eya2 に対する shRNA を発現させ、Eya2 の遺伝子発現をノックダウンすると、コロニー形成能が低下した。

### (5) E2A-HLF による Eya2 遺伝子の発現増強は Eya2 プロモーター・エンハンサー領域に存在する E2A-HLF の DNA 結合コンセンサス配列を介して行われる

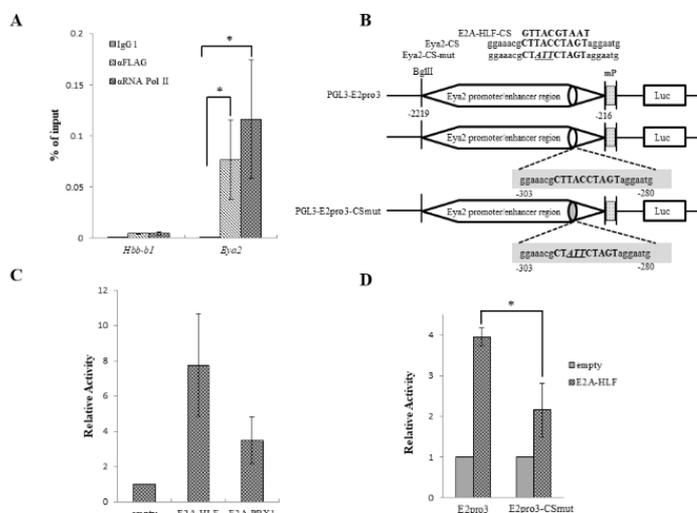


Figure 6

左図に示したとおり、ChIP-qPCR 解析にて、Eya2 遺伝子のプロモーター・エンハンサー領域 DNA に E2A-HLF が結合することが明らかになった。また、同領域には CTTACCTAGT という塩基配列が存在し、この配列は E2A-HLF の DNA 結合コンセンサス配列 GTTACGTAAT と類似する。この配列を CTTACTAGT というように変異配列に変えるとレポーターアッセイでは E2A-HLF による転写活性化が低下した。よって、このコア配列に E2A-HLF が結合することが示唆された。

以上が本研究課題の主な成果である。これらの結果から、予後不良の E2A-HLF 白血病の発症には Eya2 という転写活性化因子が関与していることが強く示唆され、将来的には分子標的治療として応用される可能性もあると考えられた。

並行して行っていた Tet1 関連の研究成果は以下のとおりである。Tet1 は連携研究者が大学院生時代に世界で初めて遺伝子を単離し (Ono R et al., Cancer Res, 2002) 当時は Lcx と名付けられたが、その後、ファミリー遺伝子が発見され、現在は Tet1-3 まで知られており、Lcx は Tet1 と呼ばれるようになった。Tet ファミリー遺伝子はエピゲノム修飾に関わり、今では非常にホットな基礎研究領域になっている。また、Tet2 は骨髄異形成症候群や骨髄性腫瘍、或いはある種の T 細胞性リンパ腫の患者細胞において機能喪失性遺伝子変異が見つかった。我々は Tet1 のコンディショナルノックアウトマウスを独自に作製し、機能解析を行った結果、Tet1 が欠損しても正常造血、異常造血ともに大きな影響はないことが判明した (Ono R et al., 投稿準備中)。他の Tet 遺伝子による機能性代償が働いているのかもしれない。以前に、レトロウイルス発現ベクターを用いた強制発現実験において MLL キメラ遺伝子による白血病発症において Tet1 は重要な役割を担っているという論文が発表されているが (Huang H et al., TET1 plays an essential oncogenic role in MLL-rearranged leukemia. Proc Natl Acad Sci USA 110: 11994-11999, 2013) 我々の今回の結果はその見解に対して否定的である。我々の実験系は誘導発現型トランスジェニックマウスを用いた内因性の発現レベルに近い MLL-ENL 発現系を用いているので、異なる結果が得られた可能性が高いと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Ono R, Masuya M, Ishii S, Katayama N, Nosaka T.	4. 巻 37
2. 論文標題 Eya2, a target activated by Plzf, is critical for PLZF-RARA-induced leukemogenesis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mol Cell Biol	6. 最初と最後の頁 e00585-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MCB.00585-16.	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 Takeuchi, T, Yamaguchi M, Kobayashi K, Miyazaki K, Tawara I, Imai H, Ono R, Nosaka T, Tanaka K, Katayama N.	4. 巻 123
2. 論文標題 MYD88, CD79B, and CARD11 gene mutations in CD5-positive diffuse large B-cell lymphoma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer	6. 最初と最後の頁 1166-1173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cncr.30404.	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 Yamanaka K, Nakanishi T, Isono K, Hasegawa C, Inada Y, Mizutani K, Matsushima Y, Okada K, Mabuchi T, Kondo M, Yamagiwa A, Kakeda M, Habe K, Nosaka T, Gabazza EC, Yamazaki H, Mizutani H, Kawano M.	4. 巻 139
2. 論文標題 Restrictive interleukin-10 induction by an innocuous Parainfluenza virus vector ameliorates nasal allergy.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Allergy Clin Immunol	6. 最初と最後の頁 682-686.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2016.05.044.	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 Tsurudome M, Ohtsuka J, Ito M, Nishio M, Nosaka T.	4. 巻 9
2. 論文標題 The hemagglutinin-neuraminidase (HN) head domain and the fusion (F) protein stalk domain of the parainfluenza viruses affect the specificity of the HN-F interaction.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Microbiol	6. 最初と最後の頁 391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2018.00391.	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 Nagatake T, Suzuki H, Hirata S, Matsumoto N, Wada Y, Morimoto S, Nasu A, Shimojou M, Kawano M, Ogami K, Tsujimura Y, Kuroda E, Iijima N, Hosomi K, Ishii KJ, Nosaka T, Yasutomi Y, Kunisawa J.	4. 巻 30
2. 論文標題 Immunological association of inducible bronchus-associated lymphoid tissue organogenesis in Ag85B-rHPIV2 vaccine-induced anti-tuberculosis mucosal immune responses in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int Immunol	6. 最初と最後の頁 471-481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxy046.	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 Maharjan BD, Ono R, Nosaka T.	4. 巻 54
2. 論文標題 Eya2 is critical for E2A-HLF-mediated immortalization of mouse hematopoietic stem/progenitor cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Oncol	6. 最初と最後の頁 981-990
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2019.4673.	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 Ohtsuka J, Matsumoto Y, Ohta K, Fukumura M, Tsurudome M, Nosaka T, Nishio M.	4. 巻 528
2. 論文標題 Nucleocytoplasmic shuttling of the human parainfluenza virus type 2 phosphoprotein.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 54-63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virol.2018.12.005.	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 Ohtsuka J, Fukumura M, Furuyama W, Wang S, Hara K, Maeda M, Tsurudome M, Miyamoto H, Kaito A, Tsuda N, Kataoka Y, Mizoguchi A, Takada A, Nosaka T.	4. 巻 9
2. 論文標題 A versatile platform technology for recombinant vaccines using non-propagative human parainfluenza virus type 2 vector.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 12901
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-49579-y	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 D'Alessandro-Gabazza CN, Kobayashi T, . . . Nosaka T (27番目/35人), . . . , Cann I, Gabazza EC.	4. 巻 11
2. 論文標題 A Staphylococcus pro-apoptotic peptide induces acute exacerbation of pulmonary fibrosis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 1539
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-15344-3	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 該当する

1. 著者名 Sawaki A, Miyazaki K, Yamaguchi M, Takeuchi T, Kobayashi K, Imai H, Tawara I, Ono R, Nosaka T, Katayama N.	4. 巻 111
2. 論文標題 Genetic polymorphisms and vincristine-induced peripheral neuropathy in patients treated with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone therapy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Hematol	6. 最初と最後の頁 686-691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-020-02832-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 小埜良一、野阪哲哉。	4. 巻 -
2. 論文標題 血液腫瘍モデル動物の現状と展望。In: 金倉讓 編集。造血器腫瘍学-基礎と臨床の最新研究動向-。	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本臨床	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Ono R, Masuya M, Ishii S, Katayama N, Nosaka T.
2. 発表標題 Eya2 is critical for an aberrant self-renewal in PLZF-RARA-induced leukemogenesis.
3. 学会等名 第79回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tsurudome M, Ito M, Nishio M, Nosaka T.
2. 発表標題 Specified amino acids at the dimer interface of the parainfluenza virus HN head domain are required for the virus-specific HN-F interaction.
3. 学会等名 第65回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Fukumura M, Ohtsuka J, Tsurudome M, Mizoguchi A, Takada A, Tsuji M, Nosaka T.
2. 発表標題 A structure-based vaccine by a non-transmissible human parainfluenza virus vector.
3. 学会等名 2017 International Society for Vaccines (ISV) Annual Congress (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nagatake T, Suzuki H, Kawano M, Ogami K, Tsujimura Y, Kuroda E, Iijima N, Hosomi K, Ishii KJ, Yasutomi Y, Kunisawa J, (non-JSI member contributors: Hirata S, Nosaka T).
2. 発表標題 Immunological association of inducible bronchus-associated lymphoid tissue organogenesis in Ag85B-rHPIV2 vaccine-induced anti-tuberculosis mucosal immune responses in mice.
3. 学会等名 第47回 日本免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nagatake T, Suzuki H, Nasu A, Hirata S, Wada Y, Matsumoto N, Shimojou M, Morimoto S, Hosomi K, Ogami K, Tsujimura Y, Kawano M, Nosaka T, Yasutomi Y, Kunisawa J.
2. 発表標題 Organogenesis of inducible bronchus-associated lymphoid tissue plays an essential role in Ag85B-hPIV2-based anti-tuberculosis respiratory vaccine in mice.
3. 学会等名 第11回次世代アジュバント研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miyazaki K, Takeuchi T, Yamaguchi M, Asano N, Sawaki A, Imai H, Ono R, Nosaka T, Kobayashi K, Tanaka K, Katayama N.
2. 発表標題 Gene mutations and sites of involvement in duodenal-type follicular lymphoma.
3. 学会等名 15 ICML - International Conference on Malignant Lymphoma. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎 香奈, 竹内 俊文, 山口 素子, 浅野 直子, 澤木 昭彦, 今井 裕, 小埜 良一, 野阪 哲哉, 小林 一彦, 田中 匡介, 片山 直之
2. 発表標題 十二指腸濾胞性リンパ腫における遺伝子変異と浸潤部位.
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sawaki A, Miyazaki K, Takeuchi T, Kobayashi K, Imai H, Tawara I, Ono R, Nosaka T, Yamaguchi M, Katayama N.
2. 発表標題 Gene polymorphisms and vincristine-induced neuropathy in patients who received R-CHOP chemotherapy.
3. 学会等名 61th Annual Meeting & Exposition of the ASH (American Society of Hematology). (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

三重大学大学院医学系研究科 感染症制御医学・分子遺伝学分野 <a href="http://www.medic.mie-u.ac.jp/microbiol/">http://www.medic.mie-u.ac.jp/microbiol/</a>
--

## 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
連携研究者	小埜 良一  (Ono Ryoichi)  (40422414)	三重大学・大学院医学系研究科・准教授     (14101)	