

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2009

課題番号：18591085

研究課題名（和文）白血病関連転写因子 TEL の ES 細胞を用いた機能解析と新規結合蛋白の同定

研究課題名（英文） The role of TEL in embryonic stem cell differentiation, and identification of a new interacting protein.

研究代表者

江口 真理子 (EGUCHI MARIKO)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40420781

研究成果の概要（和文）：

TEL 遺伝子異常による腫瘍化機構を解明するために、正常 TEL および白血病、固形腫瘍より同定された TEL-TRKC 融合遺伝子を発現するマウス ES 細胞を作製し、その分化能、増殖能に関して検討した。正常 TEL を発現するマウス ES 細胞を血液細胞へ分化させると TEL は細胞を未分化な状態に維持する働きがあったが、固形腫瘍より同定された TEL-TRKC を発現するマウス ES 細胞からは血液細胞や血管細胞は産生されず、より未熟な中胚葉系の段階の細胞が増加していた。TEL-TRKC は、血液細胞への分化を抑制し、より未熟な細胞群を増加させることで腫瘍化に働く可能性が明らかとなった。新たな TEL 結合蛋白を同定し、腫瘍化との関わりを検討している。

研究成果の概要（英文）：

Murine embryonic stem (ES) cells expressing wild type TEL and TEL-TRKC fusion gene, identified as an oncogenic factor in both leukemia and infantile fibrosarcoma, were established. The ES cells were differentiated into hematopoietic cells and analyzed in detail to clarify its function necessary for tumorigenesis. ES cells expressing wild type TEL had the tendency to remain in immature hematopoietic cells, whereas TEL-TRKC expressing ES cells could not differentiate into hemangioblast, a common precursor of endothelial and blood cells, and their capacity to produce hematopoietic stem cells were severely impaired. Mesoderm derived, immature cells increased instead of blood cells, which might be the cancer stem cells for TEL-TRKC harboring fibrosarcoma. Interacting protein to TEL is now being investigated for its association with tumorigenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,700,000	660,000	4,360,000

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：TEL/ETV6, TEL-TRKC, 転写因子, 造血細胞分化, ES細胞

1. 研究開始当初の背景

TEL 遺伝子は造血細胞を含む多くの細胞に発現しており、ETS ファミリーに属する転写抑制因子を蛋白質としてコードしている。TEL 遺伝子を欠失したノックアウトマウス等の解析から TEL は成体での骨髓造血および血管の発生に必須であることが知られている。また TEL 遺伝子は白血病などの造血器腫瘍で高頻度に異常が認められ、造血細胞の分化・増殖における重要性が認識されていたが、TEL が造血細胞分化を含む細胞分化に果たす具体的な役割は解明されていなかった。本申請者は、白血病症例より新たな TEL 関連転座、TEL-TRKC 融合遺伝子を単離し報告した。この TEL-TRKC 融合遺伝子は白血病のみならず、congenital fibrosarcoma (先天性線維肉腫)等の肉腫、腎癌、乳癌と様々な腫瘍で見いだされ、同じ融合遺伝子が多系統の細胞を癌化させることが証明された貴重な例である。固形腫瘍で見られる TEL-TRKC には TEL exon 5 が含まれるが、白血病での TEL-TRKC には含まれない。本申請者は両タイプの TEL-TRKC 融合遺伝子を同じ幹細胞に発現するトランスジェニックマウスを作製し、TEL exon 5 の有無により腫瘍化する細胞系列に違いが生じうることを明らかにした。

TEL が血管・血液細胞の分化を調節する機能に関して、本申請者らは TEL-TRKC トランスジェニックマウスの解析結果から TEL exon 5 が重要な役割を担っていると考えている。TEL exon 5 のコードする TEL central region に結合する蛋白は HDAC3, SMRT などいくつか報告されており、実際この部位での HDAC repressor complex (転写抑制因子複合体)との結合が TEL の転写抑制機能を規定していると考えられている。しかしこれらの従来同定されている TEL 結合蛋白との相互作用では TEL ノックアウトマウスの表現型を説明することはできず、ノックアウトマウスまたはキメラマウスにおいて認められる血管・血液細胞の異常の分子基盤を解明するためにも TEL (特に exon 5 によりコードされる領域) が相互作用する蛋白の同定・機能解析が重要と考えられる。

2. 研究の目的

正常な細胞の発生・分化に関わる転写因子の変異は、様々な病的状態や癌化を引き起こす。したがってそれら転写因子の正常な機能

およびその変異体が腫瘍化に果たす役割を理解することは、癌の予防や新しい治療法の開発のために重要である。TEL 遺伝子は血液および血管の分化に必須であり、また様々な造血器腫瘍や固形腫瘍で融合遺伝子を形成することが知られているが、その機能についてはまだ不明な点が多い。本研究では正常 TEL の機能および転座型 TEL による腫瘍化のメカニズムの解明を目的として、(1) マウス ES 細胞を用いて血液細胞の発生・分化・増殖における TEL の役割を発生工学的手法から明らかにする、(2) TEL の新規結合蛋白を同定し、TEL による血液細胞の分化制御機構を解明する、(3) TEL キメラ遺伝子産物の機能解析を行い、TEL 関連転座による血液細胞分化障害および増殖能獲得のメカニズムを解明することを試みた。

3. 研究の方法

(1) 発生工学的手法による TEL の血液細胞の発生・分化における役割の検討

Chicken β -actin (CAG)プロモーター下に EGFP-TEL 融合蛋白を発現するベクターを作成、マウス ES 細胞に遺伝子導入し、恒常的に TEL を高発現するマウス ES 細胞を作製した。この ES 細胞を *in vitro* で embryoid body (胚様体)、ヘマンジオブラストおよび各血液細胞系列の細胞に分化させ、各分化段階で、FACS や RT-PCR 法で解析することにより、TEL が血液細胞分化に与える影響を検討した。ヘマンジオブラストおよび血液の分化は主にコロニーアッセイを用いた。

(2) TEL の新規結合蛋白の同定と機能解析

① 新規結合蛋白の同定

TEL exon 5 を bait として yeast two hybrid 解析を行い、TEL と結合する新規蛋白を検索した。同定した結合蛋白と TEL との *in vivo* での結合を免疫染色、免疫沈降法にて確認した。またこの新規蛋白との結合部位をマッピングするために TEL の様々な欠変異体を作製し、GST プルダウンアッセイ解析を行った。

② TEL-新規蛋白複合体の生物学的機能の解析

この蛋白と TEL との結合体が有する生物学的機能を明らかにするために、レポーターアッセイ、ゲルシフトアッセイを行い TEL-新規蛋白複合体の標的遺伝子の同定を試みた。さらに TEL-結合蛋白複合体の細胞内局在を検討し、細胞周期や細胞分化に伴い両者

の結合が変化するかどうかを免疫染色等で解析した。野生型 *TEL* および欠失変異体を MEL、UT7/GM、32Dcl3 等の分化傾向を有する白血病細胞株に導入し、これらの細胞の分化能に及ぼす *TEL*-結合蛋白複合体の影響を検討するとともに、結合部位をつぶした変異体が血液細胞の分化能に及ぼす影響を検討した。

(3) ES 細胞を用いた白血病・固形腫瘍関連融合遺伝子 *TEL-TRKC* の機能解析

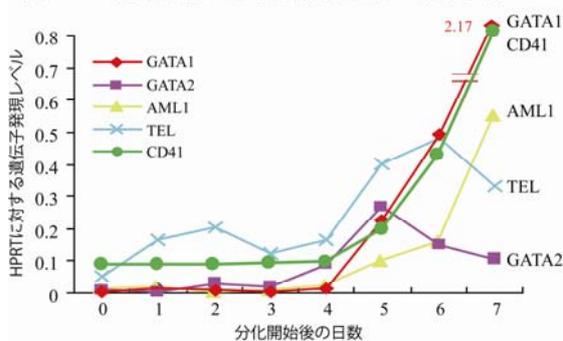
SCL promoter/enhancer 影響下で *TEL-TRKC* 融合遺伝子を中胚葉系幹細胞から発現するマウス ES 細胞株を樹立した。この ES 細胞を用いて *TEL-TRKC* キメラ蛋白の腫瘍化能および細胞分化阻害能を検討した。野生型 ES 細胞と白血病症型 *TEL-TRKC* (*TEL* exon5 を含まない) および固形腫瘍型 *TEL-TRKC* (*TEL* exon5 を含む) をそれぞれ発現する ES 細胞から embryoid body、ヘマンジオブラスト、造血細胞コロニーを作製し、*TEL-TRKC* による腫瘍化と血液・血管系細胞の分化阻害がどのレベルで起こるのかを解析し、遺伝子発現の変化を RT-PCR 法等で解析することにより、*TEL-TRKC* 融合遺伝子が白血病および固形腫瘍を発症させる機序を検討した。

4. 研究成果

(1) 発生工学的手法による *TEL* の血液細胞の発生・分化における役割の検討

① 転写因子 *TEL* が造血細胞の分化・増殖に与える影響について、マウス ES 細胞の系を用いて検討を行った。野生型 ES 細胞から LIF (Leukemia inhibitory factor) を除去し血液細胞に分化させると、*AML1*、*GATA1*、*GATA2*、*CD41* などの血液細胞特異的な遺伝子は分化開始 5 日後頃から発現が認められた。*TEL* はそれらに先駆けて分化開始 1~2 日後から発現し、5~6 日後に発現が増強するが、さらに分化した CD71 あるいは CD41 陽性細胞では *TEL* の発現は急速に低下していた(図 1)。

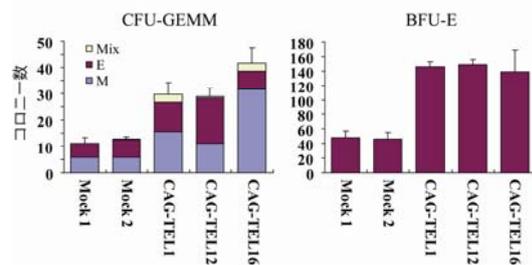
図 1 ES 細胞分化における各転写因子の発現パターン



② Chicken β -actin (CAG)プロモーター下に EGFP-*TEL* 融合蛋白を発現するベクターを

作成、ES 細胞に遺伝子導入して恒常的に EGFP-*TEL* を発現する ES 細胞株 (CAG-*TEL*) を樹立し、*TEL* の血液分化に与える影響を詳細に検討した。CAG プロモーター下に *TEL* を発現させた ES 細胞では *TEL* の発現量は野生型 ES 細胞の約 5-10 倍に増加しており、*TEL* は核内に複数の焦点を形成して局在していた。*TEL* 遺伝子を高発現するマウス ES 細胞を用いて、分化開始 7 日後にコロニーアッセイを行うと、*TEL* を高発現した ES 細胞では野生型 ES 細胞と比較して CFU-GEMM および BFU-E の有意な増加が認められた(図 2)。

図 2 *TEL* 高発現 ES 細胞のコロニーアッセイ



③ 赤芽球分化における *TEL* の役割を検討するため、血液細胞特異的な *GATA1* の遺伝子発現制御領域下に *TEL* を発現する ES 細胞を作製した(*GATA1-TEL* ES)。この ES 細胞は、分化開始後 5 日頃より *GATA1* の発現上昇とともに *TEL* の発現も誘導され、以降は野生型 ES 細胞と比較して有意に *TEL* の発現が増加していた。*TEL* の発現増加に関わらず *GATA1-TEL* ES 細胞の赤芽球への分化能は野生型の ES 細胞と同様であり、CD71 陽性細胞群の割合も対照群と比較して明らかな差は認めなかったが、コロニーアッセイを行うと *GATA1-TEL* ES 細胞では対照群と比較して BFU-E が有意に高値であった。また分化開始 7 日後の細胞を EPO 存在下で培養すると対照群に比較して、赤芽球系前駆細胞である CD71+TER119+ 分画が有意に増加していた。

以上よりマウス ES 細胞の血液分化系において、*TEL* は細胞の未分化性を維持するとともに、血液前駆細胞を増加させる働きを有する可能性が示唆された。

(2) *TEL* の新規結合蛋白の同定と機能解析

TEL による血液細胞の分化制御機構を解明することを目的に、*TEL* に結合する蛋白を同定するため Two Hybrid Analysis を行った。その結果これまで報告されていない新たな蛋白が *TEL* と結合する可能性が示唆された。*GST* プルダウンアッセイを行い、両者の *in vitro* での結合を確認するとともに、両者の結合部位をマッピングした。現在 *TEL* および *TEL* 結合蛋白を同時に発現する ES 細胞を作製し、血液分化における両者の細胞内局在の変化および分化に与える影響を検討中であ

る。

(3) ES 細胞を用いた白血病・固形腫瘍関連融合遺伝子 *TEL-TRKC* の機能解析

SCL promoter/enhancer 影響下で白血病型 (AML 型) あるいは固形腫瘍型 (CFS 型) の *TEL-TRKC* 融合遺伝子を発現するマウス ES 細胞を作製した。*SCL* は血液細胞への分化開始 4-5 日より発現が上昇し、*TEL-TRKC* 融合遺伝子も未分化 ES 細胞の段階では発現を認めず、造血細胞分化に伴って発現の上昇を認めた。この ES 細胞をへマンジオプラストに分化させると、CFS 型の *TEL-TRKC* を発現する ES 細胞ではへマンジオプラストへの分化が障害されていた(図 3)。また、分化開始 7 日後に行ったコロニーアッセイでは、CFS 型の *TEL-TRKC* を発現する ES 細胞は造血コロニーを産生しなかった(図 4)。以上の結果から、固形腫瘍で認められる CFS 型の *TEL-TRKC* は血液・血管系への分化を阻害する能力を有していることが示された。

図3 *TEL-TRKC*発現ES細胞のへマンジオプラスト(Blast colony)形成能

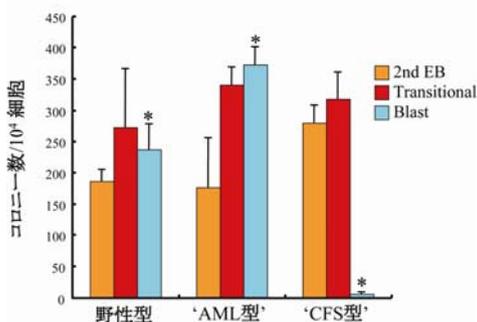
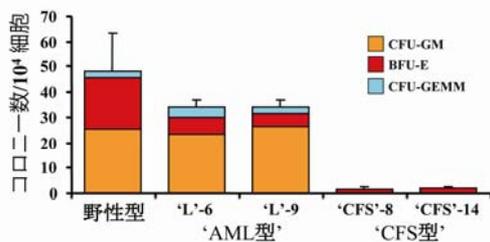


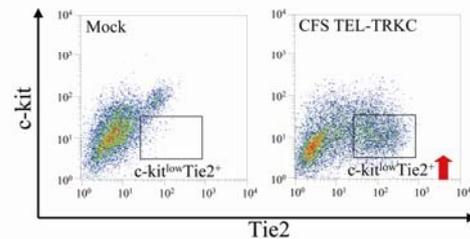
図4 *TEL-TRKC*発現ES細胞のコロニーアッセイ



TEL-TRKC を発現する ES 細胞の造血細胞への分化過程の FACS 解析により、CFS 型 *TEL-TRKC* は、 $c\text{-kit}^{\text{low}}\text{Tie}2^+$ の細胞群が著明に増加し、この細胞群が分化して生じると考えられる $c\text{-kit}^{\text{high}}\text{Tie}2^+$ の細胞群が減少していた(図 5)。CFS 型 *TEL-TRKC* は造血細胞への分化に必要な *c-kit* の発現上昇を抑制し、造血細胞への分化障害を生じるとともに、この $c\text{-kit}^{\text{low}}\text{Tie}2^+$ の細胞群が *TEL-TRKC* 融合遺伝子を有する congenital fibrosarcoma 等の発生母体となる可能性が考えられた。AML 型と CFS 型 *TEL-TRKC* の違いは *TEL* exon 5 部分の有無のみであり、この領域が細胞分

化や増殖に与える影響を検討している。

図5 CFS型*TEL-TRKC*はTie2陽性細胞群を増加させる



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 10 件)

- ① 江口真理子、石前(江口)峰斎、石井榮一、
「特集 小児疾患における臨床遺伝学の進歩 各論Ⅲ. 話題の疾患遺伝子 乳児白血病」、小児科、査読なし、50 巻 7 号、1093-1099 頁、2009 年
- ② M. Eguchi-Ishimae, M. Eguchi, K. Maki, C. Porcher, R. Shimizu, M. Yamamoto, K. Mitani、
"Leukemia-related transcription factor TEL/ETV6 expands erythroid precursors and stimulates hemoglobin synthesis.", *Cancer Sci*、査読あり、100 巻 4 号、689-697 頁、2009 年
- ③ M. Eguchi-Ishimae, M. Eguchi, K. Ohyashiki, T. Yamagata, K. Mitani、
"Enhanced expression of the EVI1 gene in NUP98/HOXA-expressing leukemia cells.", *Int J Hematol*、査読あり、89 巻 2 号、253-256 頁、2009 年
- ④ H. Tauchi, D. Tomizawa, M. Eguchi, M. Eguchi-Ishimae, K. Koh, M. Hirayama, N. Miyamura, N. Kinukawa, Y. Hayashi, K. Horibe, E. Ishii、
"Clinical features and outcome of MLL gene rearranged acute lymphoblastic leukemia in infants with additional chromosomal abnormalities other than 11q23 translocation.", *Leuk Res*、査読あり、32 巻 10 号、1523-1529 頁、2008 年
- ⑤ M. Eguchi-Ishimae, M. Eguchi, H. Kempski, M. Greaves、
"NOTCH1 mutation can be an early, prenatal genetic event in T-ALL.", *Blood*、査読あり、111 巻 1 号、376-378 頁、2008 年
- ⑥ D. Tomizawa, K. Koh, T. Sato, N. Kinukawa, A. Morimoto, K. Isoyama, Y. Kosaka, T. Oda, M. Oda, Y. Hayashi, M. Eguchi, K. Horibe, T. Nakahata, S. Mizutani, E. Ishii、
"Outcome of

- risk-based therapy for infant acute lymphoblastic leukemia with or without an MLL gene rearrangement, with emphasis on late effects: a final report of two consecutive studies, MLL96 and MLL98, of the Japan Infant Leukemia Study Group."、Leukemia、査読あり、21 巻 11 号、2258-2263 頁、2007 年
- ⑦ 江口真理子、「染色体・遺伝子異常からみる造血器腫瘍」、人類遺伝学会第 14 回臨床細胞遺伝セミナーテキスト、査読なし、45-57 頁、2007 年
- ⑧ K. Tokita, K. Maki, J. Tadokoro, Y. Nakamura, Y. Arai, K. Sasaki, M. Eguchi-Ishimae, M. Eguchi, K. Mitani, "Chronic idiopathic myelofibrosis expressing a novel type of TEL-PDGFRB chimaera responded to imatinib mesylate therapy."、Leukemia、査読あり、21 巻 1 号、190-192 頁、2007 年
- ⑨ M. Eguchi, M. Eguchi-Ishimae, D. Knight, L. Kearney, R. Slany, M. Greaves, "MLL chimeric protein activation renders cells vulnerable to chromosomal damage: an explanation for the very short latency of infant leukemia."、Genes Chromosomes Cancer、45 巻 8 号、754-760 頁、2006 年
- ⑩ 江口真理子、石前(江口)峰斎、「特集・慢性骨髄増殖疾患と後天性遺伝子異常～真性赤血球増加症とJak2 を中心に～ 4. 慢性骨髄増殖疾患とTEL-チロシンキナーゼ異常」、血液フロンティア、査読なし、16 巻、397-407 頁、2006 年

[学会発表] (計 6 件)

- ① 江口真理子、石前(江口)峰斎、岩露秀彦、太田雅明、村尾紀久子、竹本幸司、石井榮一、「HDR症候群に認められたGATA3 遺伝子の新規変異とその機能解析」、第 54 回日本人類遺伝学会総会、2009 年 9 月 24 日、東京
- ② 江口真理子、石前(江口)峰斎、牧 和宏、清水律子、山本雅之、三谷絹子、「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、2007 年 10 月 11 日、横浜
- ③ 石前(江口)峰斎、江口真理子、大屋敷純子、

大屋敷一馬、三谷絹子、「7;11 転座におけるHoxA遺伝子とそのcofactorの発現」、第 69 回日本血液学会総会・第 49 回臨床血液学会総会、2007 年 10 月 11 日、横浜

- ④ Minenori Eguchi-Ishimae, Mariko Eguchi, Kazuhiro Maki, Ritsuko Shimizu, Masayuki Yamamoto, Kinuko Mitani. Leukemia-related transcription factor TEL expands erythroid precursors. 第 66 回日本癌学会総会、2007 年 10 月 4 日、横浜
- ③ 江口真理子、石前(江口)峰斎、三谷絹子、Robert Slany, Mel Greaves、「MLL融合遺伝子によりDNA damageが蓄積する」、第 68 回日本血液学会総会、2006 年 10 月 8 日、福岡
- ⑥ 石前(江口)峰斎、江口真理子、三谷絹子、Helena Kempinski, Mel Greaves、「T-ALLにおけるNotch1 遺伝子変異は胎生期に形成される。第 68 回日本血液学会総会・第 48 回臨床血液学会総会、2006 年 10 月 7 日、福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江口 真理子 (EGUCHI MARIKO)
愛媛大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：40420781

(2) 研究分担者

江口 峰斎 (EGUCHI MINENORI)
愛媛大学・医学系研究科・講師
研究者番号：50420782
(H20→H21：連携研究者)
山形 哲也 (YAMAGATA TETSUYA)
獨協医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30424047
(H19 まで研究分担者)
牧 和宏 (MAKI KAZUHIRO)
獨協医科大学・医学部・講師
研究者番号：50337391
(H19 まで研究分担者)
佐々木 光 (SASAKI KO)
獨協医科大学・医学部・講師
研究者番号：50337391
(H19 まで研究分担者)

(3) 連携研究者

()
研究者番号：