

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007-2008

課題番号：19591142

研究課題名（和文） MLL/AF4 遺伝子導入白血病モデルマウスの分子病態解析と
新規分子標的薬の開発研究課題名（英文） Characterization of leukemia model mouse transduced with
MLL/AF4 cDNA and a novel molecular-targeting medicine

研究代表者

猪口 孝一（INOKUCHI KOUICHI）

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号：10203267

研究成果の概要：

我々は MLL 転座型白血病の 15%前後 Flt3 遺伝子 tyrosine kinase domain(TKD)変異が認められることに注目し、in vitro にて両者の腫瘍化能に関する相乗効果を検討した。

IL3 依存性マウス細胞株である 32Dc にレンチウイルスを用いて MLL-AF4 と Flt3 の変異を発現させた。32Dc^{Flt3 TKD} と 32Dc^{MLL-AF4} は、semisolid media だけでなく液体培地においても IL3 非依存性の自律増殖能を獲得できなかったのに対して、32Dc^{Flt3 TKD+MLL-AF4} はいずれの培地においてもアポトーシスを抑制し IL3 非依存性の自律増殖能を獲得することができた。また 32Dc^{Flt3 TKD} と 32Dc^{MLL-AF4} は、G-CSF 添加により Granocyte への分化が認められたが、32Dc^{Flt3 TKD+MLL-AF4} では認められなかった。次に Gene Chip による遺伝子発現 profiling を行うと、MLL-AF4 の導入によって MLL 転座型白血病の主な腫瘍化の機序のひとつとして考えられていた Hox 遺伝子群の発現亢進は認められなかった。しかしその代わりとして S100ACalcium binding protein family の一つで細胞増殖に関与する S100A6 が、MLL-AF4 と Flt3 TKD の両者の導入によって相乗的に発現を亢進していることがわかった。以上のことから MLL-AF4 に Flt3 TKD が加わることによって、相乗的な腫瘍化能や分化抑制能を獲得することを証明できた。また MLL-AF4 の腫瘍化の機序として Hox 遺伝子群とは異なる S100A6 といった新たな候補を示すことができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：MLL/AF4, 白血病、FLT3、S100A6

1. 研究開始当初の背景

MLL/AF4 融合遺伝子の詳細な白血病機構は解明されていない。我々はこの MLL/AF4 遺伝子を有する白血病細胞株の樹立に成功し、MLL/AF4 融合遺伝子 (MLL/AF4cDNA) のクローニングに初めて成功した。

2. 研究の目的

MLL/AF4 融合遺伝子の癌化機構の解明を主たる目的である。MLL/AF4 cDNA 発現および MLL/AF4+/FLT3-D835I+ダブル発現 32D 細胞を用いたシグナルカスケードの *in vitro* 解析と、MLL/AF4 トランスジェニック (Tg) マウスに癌関連遺伝子 (FLT3-D835I 異常) Tg マウスとの交配により癌化機構を解明することを目的とし、MLL/AF4 融合遺伝子が白血病発症にいかに関わっているのか証明する。MLL 転座型白血病の 15%前後 Flt3 遺伝子 tyrosine kinase domain(TKD)変異が認められることに注目し、*in vitro* にて両者の腫瘍化能に関する相乗効果を検討した。

3. 研究の方法 MLL 転座型白血病の 15%前後 Flt3 遺伝子 tyrosine kinase domain(TKD)変異が認められることに注目し、*in vitro* にて両者の腫瘍化能に関する相乗効果を検討した。

1. MLL/AF4 cDNA 発現および MLL/AF4+/FLT3-D835I+ダブル発現

32D 細胞を用いたシグナルカスケードの解析

2. MLL/AF4 cDNA 発現 Tg マウスの作成とシグナルカスケードの解析

4. 研究成果

我々は MLL 転座型白血病の 15%前後 Flt3 遺伝子 tyrosine kinase

domain(TKD)変異が認められることに注目し、*in vitro* にて両者の腫瘍化能に関する相乗効果を検討した。

IL3 依存性マウス細胞株である 32Dc にレンチウイルスを用いて MLL-AF4 と Flt3 の変異を発現させた。32Dc^{Flt3 TKD} と

32Dc^{MLL-AF4} は、*semisolid media* だけでなく液体培地においても IL3 非依存性の自律増殖能を獲得できなかったのに対して、

32Dc^{Flt3 TKD+MLL-AF4} はいずれの培地においてもアポトーシスを抑制し IL3 非依存性の自律増殖能を獲得することができた。また 32Dc^{Flt3 TKD} と 32Dc^{MLL-AF4} は、G-CSF

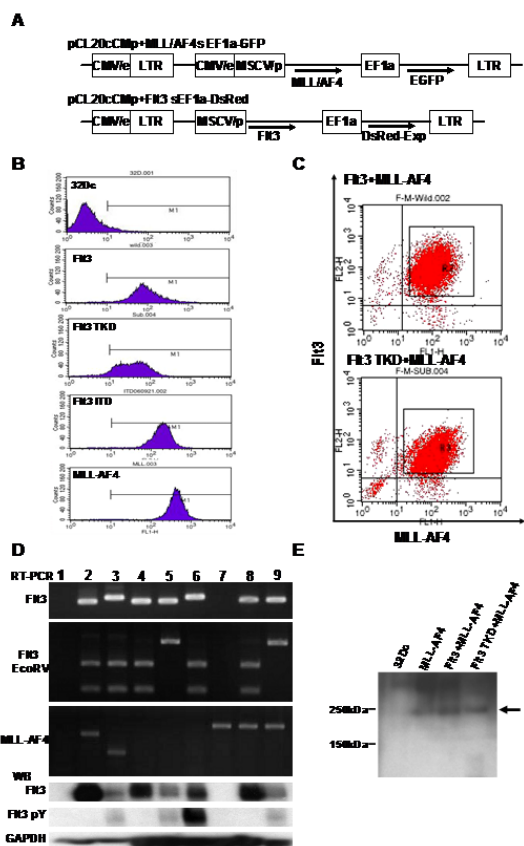
添加により Granocyte への分化が認められたが、32Dc^{Flt3 TKD+MLL-AF4} では認められなかった。次に Gene Chip による遺伝子発現

profiling を行うと、MLL-AF4 の導入によって MLL 転座型白血病の主な腫瘍化の機序のひとつとして考えられていた Hox

遺伝子群の発現亢進は認められなかった。しかしその代わりとして S100ACalcium binding protein family の一つで細胞増殖

に関する S100A6 が、MLL-AF4 と Flt3 TKD の両者の導入によって相乗的に発現

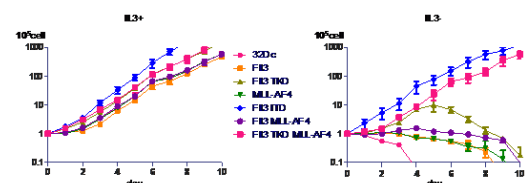
を亢進していることがわかった。以上のことから MLL-AF4 に Flt3 TKD が加わることで、相乗的な腫瘍化能や分化抑制能を獲得することを証明できた。また MLL-AF4 の腫瘍化の機序として Hox 遺伝子群とは異なる S100A6 といった新たな候補を示すことが出来た。



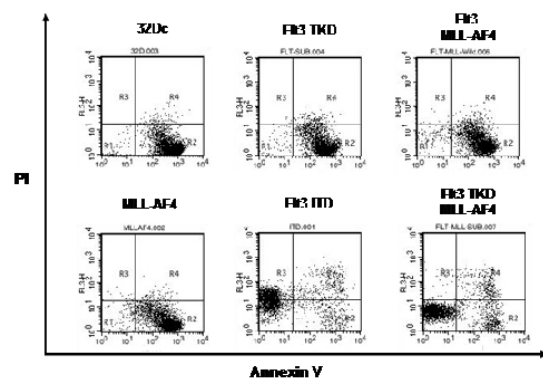
A: lentiviral vector construction を示す。lentiviral vector は Retroviral vector に比べ癌遺伝子の転写開始点付近に挿入変異が少ないことも今回の実験に選択したひとつの理由である。**B:** 導入遺伝子の発現を Flow cytometry (FACSCalibur cytometer)にて解析した。MLL-AF4 は EGFP の発現を、Flt3 は DsRed の発現にて確認した。**C:** double transduce を Flow

cytometry (FACSVantageSE)にて確認した。**D:** 1: 32Dc, 2: RS411, 3: MV411, 4: Flt3, 5: Flt3 TKD, 6: Flt3 ITD, 7: MLL-AF4, 8: Flt3 MLL-AF4, 9: Flt3 TKD MLL-AF4。Flt3 RT-PCR analysis では ITD は挿入 30bp の分だけ PCR 産物が大きくなる。また Flt3 TKD 変異により wild type がもつ EcoRV の enzyme cut site が消失する。RS411、MV411、我々のクローニングした MLL-AF4 は切断点が異なり、RS411 は MLL exon10 と AF4 exon4 にあり PCR 産物は 543bp、MV411 は MLL exon9 と AF4 exon5 にあり PCR 産物は 366bp、我々のクローニングした MLL-AF4 は MLL exon11 と AF4 exon4 にあり PCR 産物は 657bp となる。Flt3 の蛋白発現において、Flt3 ITD と比較して Flt3 TKD は蛋白発現に比例してリン酸化活性が弱かった。

E: MLL-AF4 キメラ蛋白(240kDa)を示す。

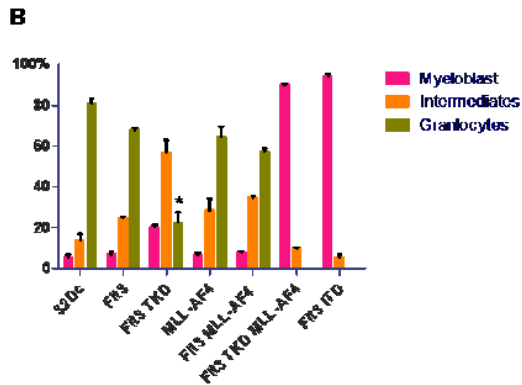
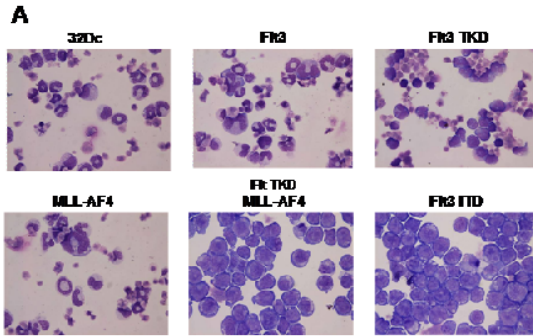


IL3 存在下、非存在下にて 1×10^5 の各細胞を培養し細胞増殖を検討した。培養 10 日目まで trypan blue assay を用いて死細胞を除外して生細胞の細胞数にて細胞増殖曲線を描いた。

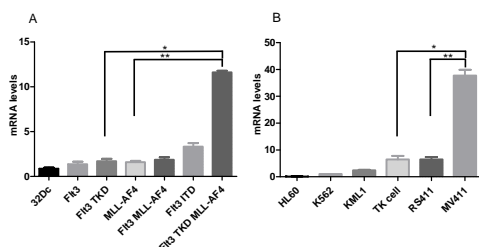


IL3 非存在下において細胞培養を行い、

32Dc は 3 日目に、それ以外の細胞は 7 日目に APC Annexin V と propidium iodide(PI)にて染色し flow cytometry にて apoptosis 誘導を解析した。



各細胞を洗浄後、IL3 を含まず G-CSF(10ng/mL)含む培養液に置換して 9 日間観察した。A: サイトスピン標本を 32Dc は day3 に、その他の細胞は day5 に作成し 100 倍の倍率にて検鏡を行い、写真を作成した。B: Granulocyte への分化を Blast, Intermediate, Granulocyte と 3 段階にわけ細胞数を計測した。Intermediate には promyelocyte、myelocyte、metamyelocyte を含んだ。* vs 32Dc p=0.009、 vs 32Dc^{FIt3} p=0.012、 vs 32Dc^{MLL-AF4} p=0.009、 vs 32Dc^{FIt3} MLL-AF4 p=0.021。



A: 各種遺伝子を発現した 32Dc における mouseS100A6 の発現。*: p<0.0001、 **:p<0.0001。B: ヒト造血器腫瘍細胞株における humanS100A6 の発現。*: p=0.006、 **:p=0.001。

表 1 GeneChip 解析における各 32D 細胞内発現亢進遺伝子の検討

Seq ID	Gene Symbol	32Dc vs MLL-AF4 (log ratio)	32Dc vs FIt3TKD MLL-AF4 (log ratio)	32Dc ^{MLL-AF4} vs FIt3TKD MLL-AF4 (log ratio)
XM 904631	LOC630963	0.7	5.6	5.2
NM_011347	Selp	0.8	4.9	4.3
NM_026018	Pdzk1ip1	0.9	4.3	3.4
NM_011578	Tgfb3	1.1	3.9	2.9
NM_015734	Col5a1	0.6	3.9	2.5
NM_008357	Il15	0.7	3.5	2.6
NM_011578	Tgfb3	0.9	3.4	2.7
NM_013516	Ms4a2	1.1	3.1	1.9
NM_008572	Mcp1b	0.6	2.9	2.4
NM_145581	Siglec1	1.9	2.8	1
NM_030691	Igsf6	1.9	2.7	1.4
NM_054041	Antxr1	0.6	2.4	1.9
NM_013516	Ms4a2	0.6	2.1	1.7
NM_023605	Fbxo9	0.6	2.1	1.5
NM_011313	S100a6	1.2	2	0.8
NM_011346	Sell	0.7	2	1.3
NM_009099	Trim30	1.4	1.9	0.6
NM_023628	Anxa9	0.7	1.9	1.4
NM_022881	Rgs18	0.6	1.9	1.3
NM_007972	F10	0.6	1.9	1.1
NM_009099	Gcet2	0.5	1.8	1.1
NM_008771	P2rx1	1	1.7	0.9
NM_016872	Vamp5	0.5	1.7	1.2
NM_011609	Tnfrsf1a	0.9	1.6	0.6
XM 905537	LOC632191	0.5	1.6	1.8
NM_011932	Dapp1	0.8	1.5	0.8
NM_030684	Trim34	0.7	1.5	0.8
NM_011488	Stat3a	0.5	1.4	1.1
NM_031198	Tcfec	0.7	1.3	0.5
NM_010739	Muc13	0.6	1.3	0.7
NM_133948	Pisp1	0.6	1.3	0.7
NM_021389	Sh3kbp1	0.6	1.3	0.7
NM_001040080	Ctse	0.5	1.3	0.7
NM_009023	Rapsn	0.7	1.2	0.6
NM_010785	Mdm1	0.5	1.2	0.5
NM_009764	Brcal	0.5	1.2	0.7
XM 484752	Zip236	0.5	1.2	0.6
NM_053272	Dhcr24	0.6	1.1	0.5
NM_011284	Rpa2	0.6	1.1	0.5
NM_007791	Csrp1	0.5	1.1	0.6
NM_172756	Ankrd41	0.5	1.1	0.6

細胞増殖に関連したシグナル分子候補として発現の亢進している S100A6 遺伝子を解析した。

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 1 件)

Multistep pathogenesis of leukemia via the MLL-AF4 chimeric gene/FIt3 gene tyrosine kinase domain (TKD) mutation-related enhancement of S100A6 expression.

Yamaguchi H, Hanawa H, Uchida N,
Inamai M, Sawaguchi K, Mitamura Y,
Shimada T, Dan K, Inokuchi K.

Experimental Hematol. 2009 Jun;37(6):701-14.

〔学会発表〕（計 1 件）

遺伝子発現profilingによるMLL/AF4 キメラ
遺伝子とF1t3 D835V遺伝子異常による白血病
発症機序の検討。山口博樹、猪口孝一、ほか
7名。日本血液学会総会 2007年9月

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

出願番号：2008-319606

出願日：2008年12月16日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

猪口 孝一 (INOKUTI KOUITI)

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号：10203267

(2) 研究分担者

特になし

(3) 連携研究者

特になし