

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591246
 研究課題名 (和文) 線虫 *ces-1* 相同転写因子である *Slug* の白血病細胞の細胞死制御における意義
 研究課題名 (英文) Involvement of *Slug* transcription factor, a human homolog of *ces-1* of *C. elegans*, in the regulation of apoptotic cell death of leukemia cells

研究代表者 犬飼 岳史 (INUKAI TAKESHI)
 山梨大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：30293450

研究成果の概要：

白血病細胞の発症に、アポトーシス (プログラムされた細胞死) の抑制が関与している可能性について検討を進めてきた。その結果、白血病細胞で認められる染色体異常のうち 17 番染色体と 19 番染色体の相互転座 (それぞれの染色体が途中で切断されて、入れ替わって再結合する変化) によって形成される異常遺伝子が、放射線照射によって誘導されるアポトーシスをコントロールする遺伝子に影響してアポトーシスを抑制する可能性を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：小児血液・腫瘍学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：白血病、細胞死、転写因子、17;19 転座、*Slug* 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞死の制御・執行機構は様々な生物種間で共通し、特に線虫の細胞死に関与する遺伝子群がヒトの遺伝子群と構造的・機能的に相同性を持つという発見は、ヒトの細胞死の研究発展にも大きく寄与し、線虫の細胞死研究に成果をあげた Horvitz らは 2002 年にノーベル賞を受賞した。またヒトのリンパ腫で過剰発現している *Bcl-2* が、線虫の細胞死制御因子である *ced-9* と構造的・機能的に相同性があるという知見は、これらの遺伝子群

が造血系腫瘍の発症に深く関与することを示唆するものであった。

(2) *Bcl-2* を含む細胞死の執行に関与する遺伝子群の上位には、それらを制御する転写因子群が位置付けられており、線虫では *ces-1* と *ces-2* が同定されている。このうち *ces-2* 遺伝子は小児急性リンパ性白血病 (ALL) の 17;19 転座から単離された *HLF* 遺伝子を含む *PAR bZIP* 転写因子群と構造的・機能的に相同性が高く、われわれは 17;19 転座に由来

する E2A-HLF 融合転写因子が細胞死を抑制することを報告した。さらに、E2A-HLF の下流遺伝子の1つとして Slug を同定し、線虫の *ces-1* と構造的・機能的に相同性を持つ Zn-finger 型転写因子であることを明らかにした。

(3) その後に *slug* ノックアウト・マウスが作製され、放射線照射後の造血系へのダメージが強いことから、*slug* が造血前駆細胞で放射線照射によって発現誘導され、p53 と拮抗して細胞死執行に関与する *puma* の発現を抑制することが報告された。

(4) 我々はこれまでに E2A-HLF の機能解析をその細胞死抑制能を中心に進めてきた。さらに E2A-HLF の標的遺伝子の解析を進めて、Slug 以外に SURPL、Annexin VIII、Groucho、Annevin II、survivin を同定し報告した。さらに CD33、LMO2、TRAIL 受容体、PTHrP を同定して現在解析を進めている。加えて、PAR bZIP 転写因子群の1つである TEF や、同一の塩基配列を認識する E4BP4 の造血細胞における細胞死制御に関して解析を進めて成果を報告した。17;19 転座型 ALL の予後は極めて不良とされているが、我々は 17;19 転座型 ALL で高 Ca 血症の合併が多いことに着目し、国内で高 Ca 血症の合併が報告された小児 ALL 22 例について共同研究を行い、5 例が E2A-HLF 陽性の 17;19 転座型 ALL で全例が 6 ヶ月以内に再発していることを新たに確認した。以上のように、我々はこの領域の研究に継続的に取り組み、本研究に必要な実験系の多くを確立している。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、これまでの研究成果から導かれる『17;19 転座型 ALL 細胞では E2A-HLF が放射線照射に際して Slug の誘導を介して Puma の発現抑制に働き細胞死を抑制する』という作業仮説を生物学的に認証することを第一の目的に置く。

(2) E2A-HLF が *ces-2* と相同性を持ち、Slug が *ces-1* と相同性を持つことが判明して以来、その機能的な関連性を明らかにすると同時に、この経路が制御している下流経路が注目されてきた。まず、E2A-HLF と Slug の機能的な関連性については、Slug 遺伝子のプロモーター領域に HLF 結合配列があって、それを介して E2A-HLF が Slug の発現制御を行なっていることを明らかにする必要がある。一方、今年の Cell 誌の論文は、少なくともマウスの造血前駆細胞では *puma* が *slug* の標的遺伝子としての役割を担っていることを示しているが、

Puma と同様な BH-3 only 型の細胞死誘導因子としては Bim や Noxa もあり、ヒトでの多様な細胞死におけるそれぞれの役目を明らかにすることが必要である。さらに、ヒトでの下流の標的因子が明らかになった時点で、この標的遺伝子のプロモーター領域に Slug 結合配列が存在して Slug が実際に結合して転写を誘導することの確認も必要である。これら、E2A-HLF による Slug を介した細胞死の制御機構の詳細を明らかにすることで、TEF や E4BP4 などの *ces-2* に対応するヒト bZIP 転写因子が、正常造血の細胞死制御において Slug およびその下流経路の制御にどう関与しているのかを明らかにする糸口が得られると期待される。

(3) 17;19 転座型 ALL は極めて難治であり、細胞死制御機構の破綻が白血病の発症のみならず難治性の要因となっていることが推測される。これまでの我々の解析で、E2A-HLF の細胞死抑制機構は、17;19 転座型 ALL と同様に難治性として知られる Philadelphia 染色体陽性 ALL の BCR-ABL による細胞死抑制機構とも一部がオーバーラップしている可能性が示唆されており、本研究は 17;19 転座型 ALL 以外の難治性白血病の病態解明にも繋がる可能性がある。一方、非造血組織では Slug は肝臓や脳を除いて広く発現されていることから、本研究の成果が進行期神経芽腫などの難治性小児がんの病態生理の解明にも手掛かりを提供するものと期待される。

3. 研究の方法

(1) 解析には、17;19 転座型 ALL から樹立された細胞株 4 株を用いた。

(2) E2A-HLF の機能を明らかにするために、E2A-HLF に対してドミナント・ネガティブに作用する変異型 E2A-HLF を、Zn-inducible vector を用いて 17;19 転座型 ALL 細胞株の UOC-B1 に導入した。

(3) 上記の細胞に、放射線を照射して培養を行い、経時的に細胞を harvest して RNA を抽出し random primer によって cDNA を作製した。

(4) Slug、Puma の遺伝子発現の半定量は real time RT-PCR で行った。

(5) ルシフェラーゼ・アッセイはリポフェクタミンを用いて一過性に遺伝子導入して行った。

(6) 遺伝子のメチル化状態は、メチル化特異的なプローブを作製し bisulfite 処理した DNA に対して PCR を行った。

4. 研究成果

(1) 17;19 転座型 ALL 細胞での放射線照射による Slug 誘導の解析

17;19転座型 ALL 細胞株 4 株に対して放射線照射を行ない、Slug とともに BH-3 only 型の細胞死誘導因子として Puma、Noxa、Bim の発現レベルの経時的な変化を real time RT-PCR で解析したところ、放射線照射から 14-16 時間後に一過性に Slug 遺伝子が強く誘導され、同時に Puma の発現が低下することを確認した。

一方、E2A-HLF に対するドミナント・ネガティブ変異体を細胞に遺伝子導入すると、放射線照射による Slug 遺伝子発現が抑制されるとともに、Puma の発現が誘導される事を確認した。

さらに 17;19 転座以外の転座を有する株についても、放射線照射による Slug と Puma の遺伝子発現を検討したが、17;19 転座型 ALL 細胞株のような変化は検出できなかった。

これらの結果は、17;19 転座型 ALL では E2A-HLF によって Slug の発現が維持されており、さらに放射線によって一過性に強く発現が誘導され Puma の発現が抑制されることによって、細胞死が回避される可能性を示している。

(2) ヒト Slug 遺伝子のプロモーター解析

これまでの 5'RACE 解析で、Slug 遺伝子における 3 つの splicing form の存在と転写開始点を確認し、major な転写開始点の上流約 1kb にマウス slug 遺伝子と相同性の高い領域を認めた。興味深いことに、線虫 ces-1 遺伝子のプロモーター領域にある ces-2 結合配列と同様に HLF 結合配列が 2 つ連続して存在し、この配列への E2A-HLF の特異的な結合をゲル・シフト解析で確認している。そこで HLF の結合配列を含む領域を中心に約 4kb をクローニングして、様々な断片を含むルシフェラーゼ・レポーター・プラスミドの作製を終えた。

続いて、レポーター・アッセイの最適化を行ない、17;19 転座型 ALL 細胞株のうち 1 株で高い導入効率を得た。現在、本株を用いてプロモーター解析が進行中である。また、E2A-HLF の一過性発現の実験系での解析も平行して進行している。

(3) ヒト Slug 遺伝子のクロマチン免疫沈降解析

E2A-HLF の Slug 遺伝子プロモーターへの結合の直接的な証明として、ChIP 解析を行なうために、tag を標識した E2A-HLF を組み込んだ発現ベクターを Zn-inducible vector にサブ・クローニングして遺伝子導入

細胞の樹立をはかったが、細胞系が樹立できなかった。このため、一過性発現の実験系での評価を行っている。

(4) ヒト Slug 遺伝子のメチル化状態の解析

ヒト Slug 遺伝子のプロモーター領域には CpG island が散在しており、特に 17;19 転座型 ALL 以外の白血病細胞では Slug の発現が RT-PCR で検出感度以下であることから、Slug 遺伝子がメチル化によるエピジェネティックな修飾による発現制御も受けている可能性が示唆される。そこで、同領域に対する bisulfite 処理によるメチル化状態の評価のための実験系を樹立した。現在は 17;19 転座型 ALL 細胞株を含む各種 ALL 細胞株において、Slug 遺伝子の発現レベルとメチル化状態の相関に関する解析が進行中である。

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 4 件)

① Inukai T, Goi K, Tezuka T, Uno K, Nemoto A, Takahashi K, Sato H, Akahane K, Hirose K, Honna H, Kuroda I, Kagami K, Nakamoto K, Taniguchi K, Nakazawa S, Sugita K. Little impact of donor/recipient major mismatch for neutrophil-specific antigen NA2 on neutrophil recovery after allogeneic SCT. Bone Marrow Transplant. 2009;43:229-35 査読有

② Furuichi Y, Goi K, Inukai T, Sato H, Nemoto A, Takahashi K, Akahane K, Hirose K, Honna H, Kuroda I, Zhang X, Kagami K, Hayashi Y, Harigaya K, Nakazawa S, Sugita K. Fms-like tyrosine kinase 3 ligand stimulation induces MLL-rearranged leukemia cells into quiescence resistant to antileukemic agents. Cancer Res 2007;67(29). 査読有

③ Inukai T, Uno K, Taniguchi K, Goi K, Tezuka T, Nemoto A, Takahashi K, Sato H, Akahane K, Hirose K, Honna H, Kagami K, Hiraoka A, Tanihiro M, Nakazawa S, Sugita K. Monitoring neutrophil engraftment in allogeneic stem cell transplantation by flow cytometric analysis of neutrophil-specific antigens NA1 and NA2. Br J Haematol. 2007;139:280-3 査読有

④ Inukai T, Akahane K, Nemoto A, Kuroda I, Noguchi S, Hirose K, Honna H, Goi K, Kondo T, Iwasa S, Murata S, Kato R, Nakazawa S, Sugita K. Revision of the cytological diagnosis of CNS relapse into aseptic meningitis in a patient with TEL-AML1-positive acute lymphoblastic

leukaemia by FISH analysis of mononuclear cells
in cerebrospinal fluid. Histopathology.
2007;50(7):947-9 査読有

〔学会発表〕(計 0件)
該当なし

〔図書〕(計 0件)
該当なし

〔産業財産権〕
○出願状況(計 0件)
該当なし

○取得状況(計 0件)
該当なし

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

犬飼 岳史 (INUKAI TAKESHI)
山梨大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：30293450

(2) 研究分担者

合井 久美子 (GOI KUMIKO)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教
研究者番号：70324192
黒田 格 (KURODA ITARU)
山梨大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：30402051
廣瀬 衣子 (HIROSE KINUKO)
山梨大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：70436880

(3) 連携研究者

なし