

機関番号： 32202
 研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2008~2010
 課題番号： 20591114
 研究課題名 (和文) 白血病発症における RUNX1 遺伝子発現制御機構の解析

研究課題名 (英文) Analysis of the mechanisms of RUNX1 gene regulation in the pathogenesis of leukemia

研究代表者

迫江 公己 (SAKOE KUMI)

自治医科大学・医学部・ポストドクター

研究者番号： 10398505

研究成果の概要 (和文)：転写因子 RUNX1 は造血に必須のタンパクであり、高率に白血病を発症する家族性血小板機能異常症の責任遺伝子でもある。RUNX1 遺伝子の転写制御領域における1塩基多型は、転写に影響し、変異と同じ染色体上に存在することから、変異遺伝子の転写を増加させた。変異遺伝子産物は読み取り枠がずれることにより、C末領域に新たに4つのリジン残基が生じ、ユビキチン化と分解の標的になる。このことから RUNX1 発現量の不均衡と蛋白量の減少は白血病発症のリスクになることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：RUNX1 is a transcription factor that is essential for hematopoiesis and is the causative gene of the familial platelet disorder that developing leukemia in a high risk. SNP in the promoter region of RUNX1 gene effects on the RUNX1 transcription, and allelic imbalance causes the over-expression of mutation transcript in the same allele at SNP. New 4 lysine residues in the carboxyl terminal of mutant RUNX1 protein that differs from normal RUNX1 due to a frame shift mutation are target of ubiquitination and degradation. It was suggested that the allelic expression imbalance and a decrease of protein level cause the risk of leukemia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：RUNX1、家族性血小板減少症、白血球、遺伝子変異、発現調節

1. 研究開始当初の背景

(1)RUNX1 遺伝子は急性骨髄性白血病 (AML)において最も高頻度に見られる転座 t(8;21)で第21番染色体上の切断点に存在する遺伝子として同定された転写因子であり、成体の造血に必須であること、血小板造血系にも機能することが報告されている。さらに AML や骨髄異形成症候群 (MDS)で RUNX1 遺伝子の変異が高頻度で認められることか

ら、この遺伝子の変異は造血細胞の悪性化に関与すると考えられている。一方、生殖細胞系における RUNX1 遺伝子は優性遺伝形質をとる家族性血小板機能異常症 (FPDMM) の責任遺伝子である。FPDMM は臨床的には幼児期より血小板減少とその機能異常による出血傾向を特徴とし、高率 (30-67%) に AML や MDS を発症することから、RUNX1 遺伝子の機能や血液細胞の悪性化の機序を解明

する上で重要な手がかりが得られると考えられている疾患である。しかし、FPDMMは世界でも12例と報告が少なく、これまで本邦での報告はなかった。

(2)我々は本邦初の FPDMM 家系を経験し、発症者は RUNX1 の新規遺伝子変異である、エクソン8の1塩基欠失に加えて5' UTRにこれまで報告のない1塩基の置換を有することを見いだした(-102G→A)。Y家系は、既報の FPDMM 家系と比べて、白血病の発症率が高く、若年発症であったこと、変異の部位が既報の RUNT ドメイン内ではなく、転写活性化部位であり、さらにフレームシフトにより長い新規アミノ酸配列が生じることから、新規変異と RUNX1 遺伝子の5' UTRの SNP が RUNX1 のタンパク機能と isoform 発現制御に影響を与え、変異タンパクおよび isoform 発現パターンを変化させることにより AML 発症のリスクが高くなるのではないかと仮説をたてた。

2. 研究の目的

本研究では FPDMM 家系において見いだされた変異 RUNX1 タンパクの機能を解析し、さらに5' UTRの SNP が白血病の発症と悪性化に及ぼす影響とその機序を解明することを目的とした。

(1) -102G→A rSNP が RUNX1 遺伝子の発現量および isoform の発現パターンに影響するかどうかを明らかにし、AML および MDS 症例においても白血病のリスク因子になりうるかどうかを検証することを目的とした。

(2) Y 家系において見いだされたフレームシフト変異タンパクの発現と機能を解析する。さらに既報の変異タンパクと機能を比較することにより、変異の部位と白血病の悪性化との関連を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) FPDMM 家系(Y 家系)において、末梢血由来白血球より genomic DNA を抽出し、Affymetrix SNP genotyping arrays を用いてヘテロ接合性消失の有無を検討する。さらに白血病発症との関連が報告されている遺伝子 c-Kit および FLT3 遺伝子の変異についても、末梢血由来白血球より genomic DNA を抽出し PCR にて遺伝子を増幅し、direct sequence により解析する。

(2) RUNX1 の5'UTRに見いだされた-102G→Aの1塩基置換はSNPとして報告されていないが、正常人200アリルの解析によりG(96.5%)A(3.5%)の頻度を示すSNPと考え

られた。この-102G→A-SNPが下流のRUNX1遺伝子の発現量に影響するregulatory SNP(rSNP)かどうかを明らかにするために以下の実験を行なった。

①患者骨髓検体と骨髓細胞より樹立した細胞株からRNAを抽出し、RT-PCRにより全長AML1cおよびAML1bを増幅して発現ベクターに組み込んだ。組み込んだAML1cの配列を決定してエクソン8における1塩基欠失と-102G→A-SNPが同一アリルに存在するかどうかを検討した。さらに、制限酵素EcoNIの消化パターンにより正常と変異アリルの割合を検討した。

②AMLおよびMDS患者における-102G→A SNPの有無は、骨髓検体からDNAを抽出し、PCRにて5' UTRを増幅後、制限酵素Hpy188Iの消化パターンとPCR産物のdirect sequenceにより解析した。

③プロモーターassay;

患者末梢血由来白血球のDNAを用いたPCRにより、-102G→A-SNPを含む200bpを増幅し、最小プロモーターを有するルシフェラーゼレポーターベクターPGL4.23に組み込んだ。シークエンスによりSNPの型を確認した後、pRL-TK vectorと共にHEK293とUT-7細胞に共発現させ、24時間後にDual luciferase assayによりプロモーター活性を測定した。

(3) ①野生型および変異型AML1の発現と局在解析; AML1b,1cのWT(野生型)およびY家系mutant(MT)のコンストラクトは各cDNAをpcDNA3.1-V5tag vectorに組み込んで作製した。さらに既報のフレームシフト変異としてFPDMMと弧発例のAMLの変異をそれぞれmutagenesisにより作製した。(図1参照)。これらのコンストラクトをHEK293細胞に導入し、24~48時間後に抗RUNX1抗体と抗V5-tag抗体を用いた免疫染色とウエスタンブロットにより、タンパク発現量と細胞内局在を解析した。

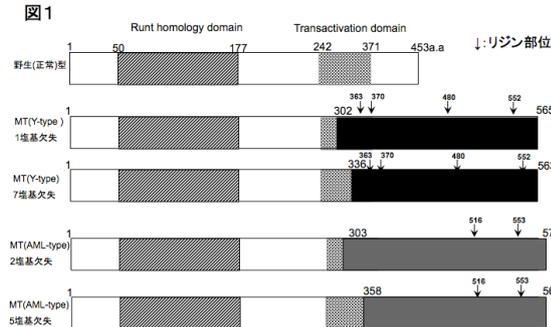
②内在RUNX1タンパクの局在とisoform発現解析

FPDMMのY家系患者より樹立した細胞株および骨髓由来細胞における内在RUNX1タンパクの局在は抗RUNX1抗体による免疫染色で、isoformの発現パターンはウエスタンブロットにより解析した。

免疫染色にはN末とRUNTドメインを認識する2種類の抗RUNX1抗体を、ウエスタンブロットは全てのisoformを認識するN末のRUNX1抗体を用いて解析した。

③Y家系におけるフレームシフト変異タンパクは302アミノ酸残基よりフレームシフトが起こり新たなアミノ酸配列が生じ、ユビキチン化の標的となるリジン残基が4カ所に生じることから(図1参照)、Mutagenesisに

より各々のリジンアラニンに置換したコンストラクトを作製し、タンパク分解に関するリジン残基を検討した。さらに、プロテアソーム阻害剤 MG132 により作製した野生型および変異 RUNX1 のタンパク分解が抑制されるかどうかを検討した。



4. 研究成果

(1) 血小板減少症(FPDMM) Y 家系において、SNP genotyping arrays による解析ではヘテロ接合性消失は認められなかった。さらに、AML1 発症に關与する2つの遺伝子 c-Kit および FLT3 遺伝子の変異も認められなかったことから、この家系における高頻度の白血病発症にはヘテロ接合性消失および c-Kit、FLT3 遺伝子変異は關与しないことが示された。

(2) ①RUNX1 遺伝子は遠位と近位の2つのプロモーターを持ち、主要な3つの isoform (AML1a,b,c) は、AML1c が遠位のプロモーターから、AML1a および AML1b が近位のプロモーターから転写される。

Y 家系患者ではエクソン 8 における1塩基欠失変異と 5'UTR の-102G→A SNP は同一アレルに存在することが示された。

②Y 家系で発現している AML1c は、主として変異をもつアレルから転写されることが示された。一方、AML1b では野生型と変異型の mRNA 発現量はほぼ 1:1 であり、アレル間の発現不均衡は認められなかった。-102G→A SNP は遠位プロモーターに存在することから AML1c 発現において、アレル間で不均衡が生じている原因として-102G→A SNP が regulatory SNP (rSNP) として RUNX1 の mRNA 発現量に影響している可能性が考えられた。このことから rSNP によるプロモーター活性への影響を検討した。

③-500~+20 領域では rSNP によりプロモーター活性に有意な差は認められなかったのに対し、-150~+20 領域では、rSNP(A-type)は G-type に比べて1.5倍のプロモーター活性を示した。このことから AML1c の-102G→A rSNP は下流の RUNX1/AML1c の発現を増

加させ、そのために変異を持つ AML1c のアレルからの転写が多くなり、結果として変異 AML1c の mRNA が野生型に比べて多く発現する発現不均衡が生じていることが示唆された。

② 弧発性の AML および MDS 患者骨髄由来検体における-102G→A rSNP は解析した12例中には存在せず、弧発の AML および MDS 患者における rSNP 頻度は、正常人(3.5%)に比べて高い頻度を示さなかった。しかし、AML および MDS 患者において rSNP がどのように影響しているかは、さらに解析の数を増やす必要があると考えられた。

3) ① Y 家系患者における内在 RUNX1 タンパクの発現解析では、野生型の AML1b, c の発現は認められたが、変異型タンパクは AML1b, c とともに発現が認められなかった。AML1c では、変異型の mRNA 発現量が野生型よりも多いにもかかわらず、変異型タンパクの発現が認められなかった理由として、発現タンパクが不安定なために、分解されていることが考えられた。

② FPDMM はこれまでに20家系が報告されているが、C 末の長いフレームシフト変異はそのうち3家系に認められており、この変異は全て Y 家系と同じ読み取り枠からなる変異である。一方異なる読み取り枠からなる C 末の長いフレームシフト変異(AML-type)は弧発例の AML、MDS および FPDMM 家系の 2nd 変異として報告されており、新たに生じる C 末のアミノ酸配列は Y-type と異なる。

V5-tag を付加した Y-type 変異の強制発現系では、変異型は野生型に比べ発現量が低下しており、核タンパクの不溶分画に多く認められた。一方 AML-type の変異タンパクは WT と同様の発現量を示した。また、細胞内局在解析では、強制発現させた野生型と Y-type 変異タンパクは核に局在したが、AML-type の変異タンパクはドミナント・ネガティブな機能が報告されている変異タンパクと同様に核以外に細胞質にも局在した。さらに、プロテアソーム阻害剤である MG132 を添加することによって Y-type 変異ではタンパクの発現が増加することが認められた。Y-type の変異タンパクは、正常型および AML-type の C 末には無いリジン残基が4カ所(363,370,480,552 アミノ酸残基)存在することから、Y 家系の変異 RUNX1 遺伝子産物はユビキチン化によるタンパク分解を受けると考えられた。4カ所のリジン残基全てがユビキチン化に關与しており、とくに3と4番目のリジンが Y-type の分解に關与していることが示唆された。

当初 Y-type の変異は AML-type と同様に DNA 結合領域である Runt ドメインではな

く C 末の活性化ドメイン上にあり、フレームシフト変異であることから、変異タンパクはドミナントネガティブな機能を持つと考えられた。しかし、Y-type の変異タンパクはユビキチン化による分解システムにより発現量が減少することが示され、フレームシフトによる C 末のアミノ酸配列が変異タンパクの機能を決定することが示唆された。

以上のことから Y 家系では 5'UTR の rSNP は cis に転写を亢進させ、AML1c の変異をもつアリルからの転写が優位になり、野生型の AML1c 発現量が低下する。これに加えて、変異タンパクは分解されるため、結果として野生型タンパクの発現は 50%以下になると考えられた。このような RUNX1 タンパクの減少と isoform 特異的な発現不均衡は白血病発症のリスク因子になると考えられた。

しかし、強制発現系において Y-type の変異タンパクは核内の不溶分画に多く発現しており、細胞内局在の解析においては、核内で凝集体を形成する細胞が認められたことから Y-type の変異タンパクが分解されずに過剰に発現される機序が働くとドミナントネガティブなタンパクとして RUNX1/AML1 の転写機能に影響を与える可能性が考えられた。また、これまでの報告では isoform の中でも発現量の多い AML1b における知見が多いが、Y 家系では AML1c の mRNA 発現においてアリル間の不均衡が認められることから、今後は Y-type 変異タンパクの機能に加えて、AML1c isoform の機能にも焦点をあてた解析が必要であると考えられた。

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 7 件)

- ① Qiao Q, Nozaki Y, Sakoe K, Komatsu N, Kirito K. NF- κ B mediates aberrant activation of HIF-1 in malignant lymphoma, *Exp Hematol*, 査読有り, 38, 2010, 1199-1208
- ② Sakoe Y, Sakoe K, Kirito K, Ozawa K, Komatsu N. FOXO3A as a key molecule for all-trans retinoic acid-induced granulocytic differentiation and apoptosis in acute promyelocytic leukemia, *Blood*, 査読有り, 2010, 115, 3787-95.
- ③ ongzhen Hu, Kirito K, Yoshida K, Mitsumori T, Nakajima K, Nozaki Y, Hamanaka S, Nagashima T, Kunitama M, Sakoe K, and Komatsu N. Inhibition of HIF-1 function enhances the sensitivity of multiple myeloma cells to melphalan, *Molecular cancer*

therapeutics, 査読有り, 8, 2009, 2329-2338.

- ④ Mori M, Nakamoto S, Akifuji Y, Tanaka T, Komatsu N, Hatake K, Ozawa K. Familial sideroblastic anemia associated with cardiac atrial septal defect. *Am J Hematol*, 査読有り, 2009, 7, 451-452.
- ⑤ Kirito K, Hu Y, Komatsu N. HIF-1 prevents the overproduction of mitochondrial ROS after cytokine stimulation through induction of PDK-1. *Cell cycle*, 査読有り, 2009, 8, 2844-2849.
- ⑥ Yoshida K, Kirito K, Yongzhen H, Ozawa K, Kaushansky K, Komatsu N. Thrombopoietin (TPO) regulates HIF-1 α levels through generation of mitochondrial reactive oxygen species. *Int J Hematol*. 査読有り, 2008, 88, 43-51.
- ⑦ Kirito K, Sakoe K, Shinoda D, Takiyama Y, Kaushansky K, Komatsu N. A novel RUNX1 mutation in familial platelet disorder with propensity to develop myeloid malignancies. *Haematologica*, 査読有り, 93, 2008, 155-156

[学会発表] (計 2 件)

- ① 迫江公己, 他、Impact of Protein Phosphatase PP2A on ATRA-Induced Activation of FoxO3a In Acute Promyelocytic Leukemia Cells、ASH Annual Meeting and Exposition、2010/12/5、ORLAND, FL
- ② 桐戸敬太, 迫江公己他、RUNX1 の発現調節異常による白血病発症のメカニズムの解析、2008/10/11、日本臨床血液学会総会、京都

[図書] (計 1 件)

Kumi Sakoe, Yoshihisa Takiyama, Heat Shock Proteins: New Research, Nova Science Publishers, 513, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

迫江 公己 (SAKOE KUMI)
自治医科大学・医学部・ポストドクター
研究者番号：10398505

(2) 研究分担者

小松 則夫 (KOMATU NORIO)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号：50186798

(3) 連携研究者

桐戸 敬太 (KIRITO KEITA)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・
教授
研究者番号：90306150