

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009年度～2010年度

課題番号：21790975

研究課題名(和文) T細胞性白血病におけるLMO2過剰発現の機序と生物学的意義に対する検討

研究課題名(英文) Aberrant expression of LMO2 gene in T-ALL

研究代表者

廣瀬 衣子 (HIROSE KINUKO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・医学研究員

研究者番号：70436880

研究成果の概要(和文)：T細胞性急性リンパ性白血病(T-ALL)と同時に検討したB前駆細胞型ALLでもLMO2を過剰発現している細胞株を複数認めた。そこで正常B細胞におけるLMO2遺伝子の発現について解析したところ、幹細胞レベルではLMO2が高発現していたが、CD34+CD19+分画で急激に発現が低下し、分化とともに低いレベルで維持されていた。また、LMO2を過剰発現する細胞株にsiRNAを導入して発現を抑制すると、細胞死が誘導された。LMO2の過剰発現がB前駆細胞型白血病において白血病細胞の生存と未分化状態の維持に関与している可能性が初めて明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：The LMO2 gene was aberrantly expressed in some B-precursor ALL cell lines. So we analyzed the LMO2 gene expression level during B-cell development. The LMO2 gene expression was high in CD34+/CD19- population of cord blood MNCs, and it was markedly down-regulated in the CD34+/CD19+ population. Gene silencing of LMO2 by siRNA induced apoptotic cell death. Aberrant expression of LMO2 gene in B-precursor ALL promotes cell survival of immature lymphocytes and contributes to leukemogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：LMO2、T細胞性急性白血病、転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

造血は様々な転写因子によって系統的に制御されており、その破綻はしばしば白血病の発症につながる。LMO2は、小児T-ALLの11:14転座や7:11転座からクローニングされた転写因子で、ノックアウト・マウスは貧血のた

めに胎生致死であり、造血に必須である。また、トランスジェニック・マウスではT細胞分化が抑制されて、未分化T細胞が蓄積してT細胞性リンパ腫の発症へと至る。一方、先天性重症複合型免疫不全症(SCID)に対する遺伝子治療において、一部の患者でレトロ・ウイルスがLMO2遺伝子の上流域に挿入された

ために LM02 遺伝子の過剰発現が起こって T-ALL が発症するという事故が起こり、遺伝子治療が中断されるに至った。この事故によって、はからずもヒトにおいても LM02 遺伝子発現の破綻が T-ALL の発症に至ることが改めて証明された。

LM02 遺伝子の過剰発現が認められるのは小児 T-ALL 症例の約半数にのぼるが、11;14 転座や 7;11 転座によって LM02 遺伝子が過剰発現されている症例は約 10%にすぎず、大半の症例では過剰発現の機序が不明であるばかりでなく、過剰発現がどのようにして白血病発症につながるのかという極めて重要な課題が未解決のままである。

我々はいままでに、B 前駆細胞性 ALL の 17;19 転座において、転座に由来する E2A-HLF 融合転写因子が直接に LM02 遺伝子を過剰発現させることを明らかにしている。このなかで、レンチウイルス・ベクターを用いて siRNA を導入し LM02 遺伝子の発現レベルを 1000 分の 1 以下に抑制することに成功している。同時に細胞死の誘導と B 細胞への分化傾向を観察しており、この手法が LM02 過剰発現の白血化への機序を解析する有効な手段となることを確認している。従来の方法では白血病細胞への導入効率が著しく低くて解析が困難であったが、レンチウイルス・ベクターによる siRNA の導入技術は、LM02 遺伝子を過剰発現した T-ALL にも応用が可能であることを既に確認している。

## 2. 研究の目的

本研究では我々のこれまでの研究成果をふまえて依然として予後不良である T-ALL における LM02 過剰発現の機序と生物学的意義を明らかにすることを目指すとともに、新たな治療法の確立への手掛かりを探るものである。

## 3. 研究の方法

### (1) LM02 過剰発現の機序の解析

#### ① T-ALL 細胞株の LM02 発現レベルの解析

LM02 遺伝子は 6 つの exon からなり、exon1 の上流にある distal promoter と exon3 の上流にある proximal promoter で発現が制御され、同一の翻訳領域を持つ 2 種類の mRNA が形成される。当研究室で所有している小児 T-ALL 由来細胞株について、distal promoter 由来および proximal promoter 由来の LM02 発現について、real time PCR 法でどちらが優位なのかを解析し、解析③への足掛かりにする。

#### ② アレイ CGH 法によるゲノムの増幅と欠失領域の解析

新たな LM02 遺伝子の過剰発現の機序として LM02 遺伝子のプロモーター上に存在する転写抑制に必須な領域 (negative regulatory region) の欠失が近年報告された。そこで、LM02 の過剰発現を認める T-ALL 細胞株全ゲノムでのアレイ CGH 法によるゲノムの増幅と欠失領域の解析を行ない、LM02 過剰発現への LM02 遺伝子の negative regulatory region 領域欠失の関与を解析するとともに、LM02 過剰発現と協調して白血病発症に関与する遺伝子についてスクリーニングを行う。

#### ③ Ets 及び PAR 転写因子発現の解析

proximal promoter および distal promoter を介する転写制御に重要な Ets ファミリーおよび PAR ファミリーの転写因子のうち、それぞれ造血系で発現される PU.1 および TEF と DBP について発現レベルを real-time RT-PCR 法で解析し、蛋白発現と DNA 結合をゲルシフト・アッセイで解析する。これらの発現レベルと distal 及び proximal promoter 由来ごとの LM02 の発現レベルとの相関を検討して、LM02 過剰発現への関与を明らかにする。関与が示唆された転写因子は、それに対する siRNA を導入することで LM02 の発現が低下するかも確認する。

#### ④ LM02 の negative regulatory region のメチル化の解析

LM02 の negative regulatory region には CpG island が 2 ヶ所存在することを確認しており、この領域のメチル化状態についてメチル化 PCR 法で解析して、LM02 の発現レベルとの相関を検討する。さらに、脱メチル化剤 5-aza 2' deoxycytidine で細胞株を処理し、LM02 の発現レベルの変化を real time RT-PCR 法及び Western Blotting 法で解析する。

#### ⑤ 臨床検体での解析

①～④の解析で LM02 の過剰発現の機序が明らかになった時点で臨床検体を用いて確認する。

### (2) LM02 過剰発現の意義の解析

#### ① T 細胞性白血病細胞株への LM02 遺伝子 siRNA の導入

11;14 転座型 T-ALL 細胞株である KOPT-6 と、LM02 を発現していない KOPT-5 にコントロール・ベクターと LM02 の siRNA を含むレンチウイルス・ベクターをそれぞれ導入し、GFP をマーカーに flow cytometry でベクター感

染細胞をソーティングする。LMO2 の mRNA 発現レベルを real time RT-PCR 法で、蛋白発現レベルを Western Blotting 法で確認する。細胞死および細胞周期への影響については Annexin V 結合およびカスパーゼの活性化と PI 染色を指標に、細胞分化への影響は CD3/CD4/CD8 などの表面抗原発現を指標に flow cytometry で解析する。また、各種遺伝子の発現の変化については GeneChip を用いて micro-array 解析を行う。LMO2 の下流の標的遺伝子については、同様に特異的 siRNA を作製してレンチウイルス・ベクターで導入し、その生物学的意義を明らかにする。

### ②培養 T 細胞への LMO2 の遺伝子導入

LMO2 を発現していない KOPT-5 および IL-2 依存性 T 細胞株 CTL1 に、LMO2 遺伝子を遺伝子導入し、その増殖・生存・分化への影響を、上記と同様に解析して①の結果の整合性を確認する。また、①で得られた LMO2 の下流標的遺伝子も同様に遺伝子導入し、その生物学的意義を確認する。

### ③LMO2 過剰発現と関連して白血病発症に関与する遺伝子の同定

解析①(2)でアレイ CGH 法により複数の細胞株で共通して同定されたゲノムの増幅および欠失領域について、その領域内に存在する遺伝子群のうち特に細胞増殖および細胞生存・細胞死に関連する遺伝子について、real time RT-PCR 法によって定量解析を行なう。また増幅・欠失をきたす遺伝子については、しばしば点変異などによる遺伝子産物の活性化および不活化が起こることが知られており、PCR 産物の塩基配列を決定して変異の有無を確認する。細胞株で確認された変異があれば、臨床検体でも同様に解析を行う。

### (3) LMO2 過剰発現を標的にした治療法に関する基礎的研究

#### ① LMO2 に対する siRNA の導入効果の解析

解析(1)①で得られたノック・ダウン効果が細胞分化・細胞増殖・細胞生存のいずれに現れるかを確認し、その効果に関与する LMO2 の標的遺伝子が同定されたら、それら遺伝子の発現のノック・ダウンや遺伝子産物の機能抑制がもたらす影響を確認して、LMO2 過剰発現に対する分子標的療法の可能性を解析する。

#### ② HDAC inhibitor の効果の解析

代表的な HDAC inhibitor である Trichostatin A を用いて、LMO2 遺伝子を過剰発現する T-ALL 細胞株に対するヒストンのアセチル化修飾の変化による LMO2 遺伝子発現への影響を解析し、あわせて細胞分化・細胞増殖・細胞生存に対する影響を LMO2 発現のない T-ALL 細胞株への効果と対比させながら解析する。

細胞増殖・細胞生存に対する影響を LMO2 発現のない T-ALL 細胞株への効果と対比させながら解析する。

#### ③脱メチル化剤の効果の解析

解析(1)④による解析結果とも関連させて、上記②と同様に解析を行う。

## 4. 研究成果

### (1) T-ALL 細胞株の LMO2 発現レベルの解析

LMO2 遺伝子の発現について T-ALL8 株について real time PCR 法で解析したところ、11;14 転座型 ALL 株の KOPT-6 とほぼ同等の LMO2 発現を示す細胞株が 5 株、ほとんど発現を認めない細胞株が 2 株であった。発現が高い 5 株のうち、distal promoter 由来優位が 2 株で、proximal promoter 由来優位が 1 株であった。

同時に検討した B 前駆細胞性白血病細胞株 28 株で 11;14 転座型 ALL 株の KOPT-6 の LMO2 発現の 1/10 以上の発現を認めたのは 21 株であり、なかでも 11q23 転座型 ALL で高頻度に認められた。興味深いことに 17;19 転座型 ALL で distal 優位の発現は 4 株中 1 株のみで、他の B 前駆細胞性白血病細胞株では distal promoter 由来優位が 2 株であり、proximal promoter 由来優位が 7 株であった (図 1)。

このことから 17;19 転座型 ALL であっても、distal promoter のみならず proximal promoter 由来の遺伝子発現があることが示唆された。これは E2A-HLF が distal promoter にある PAR 認識配列を介して LMO2 の発現を直接誘導するだけでなく、間接的に proximal promoter にも作用して LMO2 の発現を誘導し、結果として 17;19 転座型 ALL では distal promoter のみならず proximal promoter 由来の LMO2 遺伝子が発現されていると考えられた。

DistalおよびProximal promoterの関与

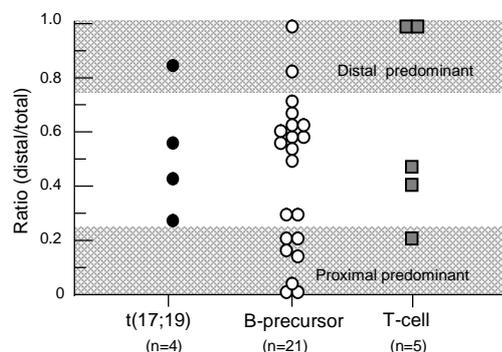


図 1

#### (2) LMO2 に対する siRNA の導入効果の解析

17;19 転座型白血病細胞株の UOC-B1 に

LMO2 の siRNA を導入したところ、その発現は 1000 分の 1 程度に抑制され、flow cytometry で active caspase3 陽性の細胞が増加して細胞死が誘導される (図 2) とともに、マイクロ・アレイ解析で B 細胞の初期分化に関連する遺伝子の誘導が観察された。

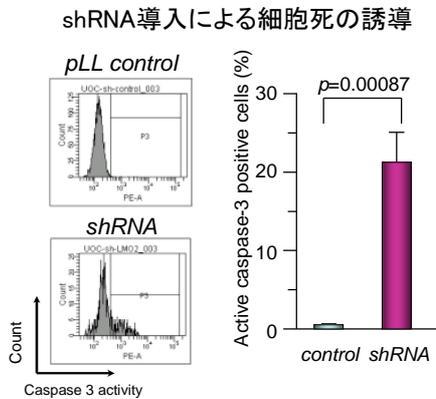


図 2

このことから 17;19 転座型 ALL では、LMO2 遺伝子の過剰発現が白血病細胞の生存と未分化状態の維持に関与している可能性が示唆された。これは B 前駆細胞型 ALL の発症に LMO2 が関わることをはじめて明らかにしたものである。

### (3) B 細胞分化における LMO2 遺伝子の発現

LMO2 の過剰発現が、白血病細胞の生存と未分化状態の維持に関与していると示唆されたことから、B 細胞の初期の分化過程における LMO2 遺伝子の発現について解析した。臍帯血の単核球から、マイクロビーズとフローサイトメトリーを用いて CD34 陽性 Lin 陰性で CD19 陰性および陽性の分画と、Lin 陰性 CD19 陽性で IgM 陰性および陽性の分画をソーティングし、さらに末梢血の単核球からマイクロビーズを用いて CD19 陽性細胞を精製した。これらの分画を用いて real-time PCR で LMO2 遺伝子の発現を解析した。臍帯血の CD34 陽性 CD19 陰性分画では、17;19 転座型 ALL 細胞株の UOC-B1 とほぼ同等の発現レベルをみとめるが、CD34 陽性 CD19 陽性分画では発現レベルが急激に低下し、分化とともに低いレベルで維持されていた (図 3)。この結果から LMO2 の発現低下が B 細胞の初期分化に関与している可能性が考えられた。

### B 細胞初期分化での LMO2 遺伝子発現

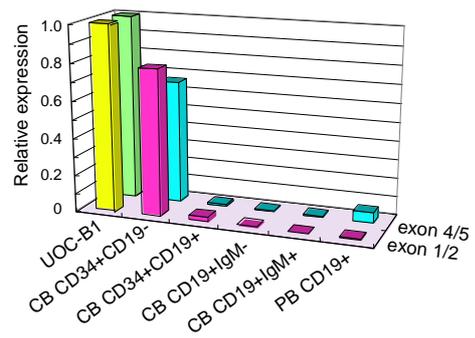


図 3

### 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)

① Hirose K, Inukai T, Kikuchi J et al. Aberrant induction of LMO2 by the E2A-HLF chimeric transcription factor and its implication in leukemogenesis of B-precursor ALL with t(17;19). Blood. 116 : 962-70, 2010 (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

① 廣瀬 衣子、犬飼 岳史 B 前駆細胞型 ALL における LMO2 の過剰発現 日本血液学会学術集会 平成 22 年 9 月 25 日 パシフィコ横浜

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/pediatr/fpe/fpe101110h.html>

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

廣瀬 衣子 (HIROSE KINUKO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・医学研究員

研究者番号 : 70436880

#### (2) 研究分担者

なし

#### (3) 連携研究者

なし