

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月25日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591040

研究課題名（和文） 白血病予後を司る NPM1 と ETS 遺伝子 MEF の相互作用の解明

研究課題名（英文） Interaction between NPM1 which is deeply related with the prognosis of leukemia and the ETS family of transcription factor, MEF.

研究代表者

宮崎 泰司 (MIYAZAKI YASUSHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40304943

研究成果の概要（和文）：白血病細胞において NPM1 蛋白は ETS 転写因子である MEF 蛋白と結合し MEF の転写活性能を抑制した。急性骨髄性白血病にみられる変異型 NPM1 は逆に MEF 転写活性能および細胞形質転換能を増強した。MEF 蛋白は HDM1 遺伝子プロモーターを活性化し、患者検体において NPM1 変異の有無、HDM1 発現は MEF 発現と有意に関連していた。NPM1 変異は MEF を通じて P53 経路で白血病化に係わる可能性がある。(J Biol Chem 2013;288(13):9457-67.)

研究成果の概要（英文）：Myeloid ELF1-like factor (MEF), a member of the ETS transcription factors, can function as an oncogene. We found that MEF directly forms a complex with NPM1. Functional analyses showed that wild-type NPM1 inhibited the DNA-binding and transcriptional activity of MEF on the HDM2 promoter whereas NPM1 mutant protein (Mt-NPM1) enhanced these activities of MEF. It also related to the transformation of NIH3T3 cells by MEF. In addition, clinical leukemia samples with NPM1 mutations had higher HDM2 mRNA expression. Our data suggest that enhanced HDM2 expression induced by mutant NPM1 may have a role in MEF/ELF4-dependent leukemogenesis. (J Biol Chem 2013;288(13):9457-67.)

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

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：血液腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病 (AML) の 55% には何らかの染色体異常がみられ、約半数を占める正常核型 AML においても種々の遺伝子異常が示されることより遺伝子変異は AML 発症

に深く関与すると考えられる。AML においては NPM1 変異が最も高率である。NPM1 蛋白は①リボソーム RNA 細胞内移動、②中心体分裂の制御、③p53 との相互作用など多機能を持ち、ハプロ欠損マウスに造血障害が

認められるなど血球分化・増殖にも関与しており、AML において極めて重要な遺伝子と思われる。臨床的にも NPM 変異の有無は正常核型 AML の予後と関連する。

MEF は研究代表者によってクローニングされた ETS 転写因子で、これまでにサイトカインやパーフォリン遺伝子の活性化、転写因子 RUNX1 との相互作用、NKT 細胞の分化増殖制御などの機能が、細胞株、遺伝子破壊マウスモデルを用いて報告されてきた。また、臨床検体を用いて、FAB 病型により MEF の mRNA 発現量に差があること、さらに NPM 蛋白と転写因子 MEF が蛋白複合体を形成し、両者が直接結合して MEF 機能が変化する可能性を *in vivo*, *in vitro* において報告してきた [平成 20 年がん研究助成金朝長班報告]。最近、造血幹細胞の細胞回転制御、MDM2 の転写を通じた p53 蛋白の調整が新たな MEF の機能として報告され、さらに AML における染色転座の標的遺伝子として MEF が同定された。以上より、AML において野生型あるいは変異 NPM1 と MEF 蛋白の物理的・機能的な相互作用が、p53 機能調節や細胞分裂・細胞周期に影響し、造血細胞の白血病化とその維持に関与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

NPM1 と MEF 蛋白の造血細胞における機能的相互作用と、その結果導かれる白血病化の機構を解明するため、以下のことを明らかにする。

- 1) 細胞内局在による、野生型・変異 NPM と MEF 蛋白複合体形成の変化。
- 2) 野生型・変異 NPM との相互作用による MEF 転写活性の変化。
- 3) NPM による MEF の転写活性調整の機序。
- 4) 両蛋白の AML 発症、維持における機能。

3. 研究の方法

野生型 NPM1、変異 NPM1 (NPM-mut, NPM の C 末端遺伝子異常)、および MEF 遺伝子の発現プラスミドを組み合わせて造血細胞に導入することで、以下①～③の検討を行う。その結果を踏まえ臨床検体を用いた解析④を行う。

- ① NPM1 と MEF の結合及び結合部位の同定・・・免疫沈降法
- ② MEF の転写活性に対する野生型・変異 NPM の影響・・・MEF レポーターによるルシフェラーゼアッセイ・・・線維芽細胞を用いた形質転換
- ③ NPM1 の MEF 転写活性調節の機序
・・・ゲルシフトアッセイ
・・・ウエスタンブロット法
・・・共焦点レーザー顕微鏡による蛋白

局在の同定

- ④ 臨床 AML 検体における、NPM 変異の有無による MEF 標的遺伝子発現の変化
・・・AML 細胞における HDM 発現の RQ-PCR

4. 研究成果

①NPM1 と MEF との結合部位の解析

上記手法で解析した結果、NPM1 は NPM1 分子の N 端に存在する HomoD ドメインを有する領域を介して MEF と結合していることが示された。

また、動物細胞内での過剰発現系を用いた検討によって両蛋白質はそれぞれに免疫沈降されることより、細胞内での結合が再現された。

②MEF の転写活性に対する野生型・変異 NPM の影響

ルシフェラーゼを用いたレポーター解析の結果、野生型 NPM1 蛋白質の発現は MEF の転写活性化能を抑制することが明らかとなった。一方、患者検体に見られる変異を導入した変異型 NPM1 は MEF の転写活性化能を増強した。これは白血病細胞を用いた実験においても同様の結果が得られた。siRNA を用いて NPM1 発現を抑制する実験では、NPM1 発現抑制によって MEF 転写活性化能の上昇が見られ、他の実験結果と一致するものであった。以上より、AML において NPM1 変異は MEF の転写活性化能に影響を与えている可能性が考えられた。

線維芽細胞の MEF 導入による形質転換能は、MEF の転写活性化能と関連し、野生型 NPM1 の過剰発現では形質転換能が低下、変異型 NPM1 の導入では上昇した。

③NPM1 の MEF 転写活性調節の機序

共焦点レーザーを用いた蛋白質局在の解析では、NPM1 蛋白質は既報の通り核内に存在し、変異型 NPM1 は細胞質へと移動した。MEF は細胞内では核内に存在したが、変異型 NPM1 の導入によってもその局在は変化しなかった。これは細胞分画ごとのウエスタンブロット法による解析でも同様の結果であった。

ゲルシフトアッセイでは野生型 NPM1 は MEF の DNA への結合を阻害した。これらの結果より、NPM1 は野生型では MEF の DNA への結合を阻害するが、変異型 NPM1 が導入されると野生型 NPM1 の細胞内局在が核内から細胞質へと移動し、その結果 MEF が DNA に結合しやすくなるために MEF の転写活性化能が上昇すると考えられた。HDM2 プロモーターをもちいた解析で、MEF は HDM2 プロモーターに結合しその転写を活性化した。ChiP 解析では変異型 NPM1 によって MEF の HDM2 プロモーターへの結合が低下し、この仮説を支持する結果であった。

④臨床 AML 検体における、NPM 変異の有無による MEF 標的遺伝子発現の変化

臨床検体を使った解析では AML 細胞における NPM1 変異の有無、MEF 発現の程度、HDM2 発現の程度の関連を解析した。

その結果、変異型 NPM1 を有する検体では、野生型の検体と比較して有意に HDM2 の遺伝子発現が亢進しており、また、MEF 高発現と低発現の例を比較すると MEF 高発現例において HDM2 発現が有意に上昇していた。

以上を合わせると、AML 細胞において NPM1 変異は MEF の転写活性化能を亢進されること、MEF の活性化は HDM2 発現を亢進させること、少なくとも一部はこの機構を通じて MEF による細胞の形質転換能が上昇する可能性があることが示された。

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 15 件)

1. Yanada M, Miyazaki Y (17 名中 13 番目) : Phase 2 study of arsenic trioxide followed by autologous hematopoietic cell transplantation for relapsed acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 2013 Feb 14. [Epub ahead of print] 査読あり
2. Hsu WL, Miyazaki Y (17 名中 12 番目) : The Incidence of Leukemia, Lymphoma and Multiple Myeloma among Atomic Bomb Survivors: 1950-2001. *Radiat Res*. 2013 Feb 11. [Epub ahead of print] 査読あり
3. Ando K, Miyazaki Y. (18 名中 1 番目、18 番目) : Mutations in the nucleolar phosphoprotein, nucleophosmin, promote the expression of the oncogenic transcription factor MEF/ELF4 in leukemia cells and potentiates transformation. *J Biol Chem*. 2013; 288(13): 9457-67. 査読あり
4. Itonaga H, Ando K, Miyazaki Y. (17 名中 6 番目、17 番目) : Distinct Clinical Features of Infectious Complications in Adult T Cell Leukemia/Lymphoma Patients after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Retrospective Analysis in the Nagasaki Transplant Group. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19(4): 607-15. 査読あり
5. Ueda Y, Miyazaki Y, (40 名中 30 番目) : Clinical evaluation of WT1 mRNA expression levels in peripheral blood and bone marrow in patients with

myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma*. 2012 Nov; 26. [Epub ahead of print] 査読あり

6. Matsuda A, Germing U, Miyazaki Y : Correlation between the low marrow blast cutpoint and WHO classification for myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol*. 2013; 90(1): 79-80. 査読あり
7. Itonaga H, Ando K, Miyazaki Y (18 名中 7 番目、18 番目) : Treatment of relapsed adult T-cell leukemia/lymphoma after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: the Nagasaki Transplant Group experience. *Blood*. 2013;121(1): 219-225. 査読あり
8. Oki Y, Miyazaki Y (17 名中 13 番目) : Phase I/II study of decitabine in patients with myelodysplastic syndrome: A multi-center study in Japan. *Cancer Sci*. 2012;103(10): 1839-1847. 査読あり
9. Greenberg PL, Miyazaki Y. (34 名中 24 番目) : Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012; 120(12): 2454-65. 査読あり
10. Ishida T, Miyazaki Y (19 名中 7 番目) : Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for adult T-cell leukemia-lymphoma with special emphasis on preconditioning regimen: a nationwide retrospective study. *Blood*. 2012; 120(8): 1734-41. 査読あり
11. Wakita A, Miyazaki Y (18 名中 6 番目) : Randomized comparison of fixed-schedule versus response-oriented individualized induction therapy and use of ubenimex during and after consolidation therapy for elderly patients with acute myeloid leukemia: the JALSG GML200 Study. *Int J Hematol*. 2012; 96(1): 84-93. 査読あり
12. Norimura D, Miyazaki Y (13 名中 11 番目) : Duodenal involvement of mantle cell lymphoma observed by magnified endoscopy with narrow-band imaging. *Gastrointest Endosc*. 2012; 76(1): 188-9. 査読あり
13. Ohnishi K, Miyazaki Y (17 名中 13 番目) : Long-term outcome of imatinib therapy, with assessment of its dosage and blood levels, for chronic myelogenous leukemia. *Cancer Sci*. 103(6), 2012, 1071-1078.
14. Usuki K, Miyazaki Y (19 名中 11 番目) : Efficacy and safety of nilotinib in Japanese patients with imatinib-resistant or -intolerant Ph+ CML or relapsed/refractory Ph+ ALL: a 36-month analysis of a phase I

and II study. *Int J Hematol.* 2012; 95(4): 409-19. 査読あり

〔学会発表〕 (計 14 件)

1. Tomohiko Taki, Hee-Je Kim, Shigeki Ohtake, Byung-Sik Cho, Hitoshi Kiyoi, Woo-Sung Min, Norio Asou, So-Young Choi, Yasushi Miyazaki, Yeon-Kyeong Kim, Hisashi Sakamaki, June-Won Cheong, Sumihisa Honda, Shuichi Miyawaki, Masafumi Taniwaki, Hyeoung-Joon Kim, Tomoki Naoe, and Yoo-Hong Min : Incidence and Clinical Features of Core Binding Factor Acute Myeloid Leukemia: A Collaborative Study of the Japan Adult Leukemia Study Group and the Korean Society of Hematology. : 54th ASH Annual Meeting and Exposition, December 8-11, 2012, Atlanta, USA.

2. Katsuji Shinagawa, Shigeki Ohtake, Toru Sakura, Yasunori Ueda, Masashi Sawa, Jun-ichi Miyatake, Noriko Usui, Makoto Onitsuka, Yoshihiro Hatta, Nobuhiko Emi, Shigehisa Tamaki, Yoshikazu Ito, Toru Murayama, Hiroyuki Fujita, Katsumichi Fujimaki, Norio Asou, Akihiro Takeshita, Yasushi Miyazaki, Shuichi Miyawaki, Kazunori Ohnishi, Tomoki Naoe, and Ryuzo Ohno : A Phase III Study of New Synthetic Retinoid Tamibarotene (Am80) Compared with ATRA in Maintenance Therapy for Newly Diagnosed Acute Promyelocytic Leukemia (APL): Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) APL204 Study. 54th ASH Annual Meeting and Exposition, December 8-11, 2012, Atlanta, USA.

3. Kazunari Aoki, Ken Ishiyama, Hidehiro Itonaga, Takahiro Fukuda, Shuichi Taniguchi, Yasunori Ueda, Noriko Doki, Yasuhiro Sugio, Yasuo Morishima, Tokiko Nagamura, Junji Tanaka, Yoshiko Atsuta, Takayuki Ishikawa, and Yasushi Miyazaki : Unfavorable Outcome of Single-Unit Umbilical Cord Blood Transplantation for Elderly Patients with Myelodysplastic Syndromes. : 54th ASH Annual Meeting and Exposition : December 8-11, 2012, Atlanta, USA.

4. Noriyoshi Iriyama, Yoshihiro Hatta, Jin Takeuchi, Yoshiaki Ogawa, Shigeki Ohtake, Toru Sakura, Kinuko Mitani, Fumihiko Ishida, Masatomo Takahashi, Tomoya Maeda, Tohru Izumi, Hisashi Sakamaki, Shuichi Miyawaki, Sumihisa Honda, Yasushi Miyazaki, Tomohiko Taki, Masafumi Taniwaki, and Tomoki Naoe :

Expression of CD56 Is an Independent Prognostic Factor to Predict Relapse in Acute Myeloid Leukemia with t(8;21): Results of Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) AML97 Protocol. : 54th ASH Annual Meeting and Exposition : December 8-11, 2012, Atlanta, USA.

5. Toru Sakura, Fumihiko Hayakawa, Toshiaki Yujiri, Yasutaka Aoyama, Eisei Kondo, Katsumichi Fujimaki, Yasunori Ueda, Shigeki Ohtake, Yasushi Miyazaki, Shuichi Miyawaki, Kazunori Ohnishi, and Tomoki Naoe : Outcome of Pediatric-Type Therapy for Philadelphia Chromosome-Negative Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) in Adolescents and Young Adults (AYA): A Study by the Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG ALL202-U study) : 54th ASH Annual Meeting and Exposition : December 8-11, 2012, Atlanta, USA.

6. Rika Kihara, Hitoshi Kiyoi, Takahiro Kato, Erina Yamamoto, Shigeki Ohtake, Shuichi Miyawaki, Yasushi Miyazaki, Norio Asou, Toru Sakura, Yukiyasu Ozawa, Noriko Usui, Heiwa Kanamori, Toru Kiguchi, Kiyotoshi Imai, Naokuni Uike, Fumihiko Kimura, Kunio Kitamura, Chiaki Nakaseko, Kosuke Tsuboi, Akihiko Takeshita, Fumihiko Ishida, Hitoshi Suzumura, Yuichi Kato, Hiroshi Miwa, Tomoki Naoe : Evaluation of the ELN genetic risk classification in AML patients registered to JALSG AML201 study. : 第 74 回日本血液学会学術集会 : 平成 24 年 10 月 21 日 (日) : 京都

7. Sumiko Kobayashi, Jin Takeuchi, Yasunori Ueda, Mineo Kurokawa, Hidetomo Tamura, Kiyoyuki Ogata, Kazuo Dan, Hirohiko Shibayama, Rika Kihara, Nobuhiko Emi, Toshiko Motoji, Koh Sasaki, Kensuke Usuki, Hiroyasu Ogawa, Toru Sakura, Kazuma Ohyashiki, Keiya Ozawa, Kiyotoshi Imai, Yasushi Miyazaki, Yasuyoshi Morita, Akira Matsuda, Kaoru Tohyama, Keiji Kumamoto, Daisuke Koga, Hiroya Tamaki, Kinuko Mitani, Tomoki Naoe, Haruo Sugiyama, Fumimaro Takaku : The usefulness of WT1 mRNA expression levels as a monitoring marker of MDS progression. : 第 74 回日本血液学会学術集会 : 平成 24 年 10 月 21 日 (日) : 京都

8. 宮崎泰司 : IPSS-R の改訂 : 第 74 回日本血液学会学術集会 : 平成 24 年 10 月 21 日 (日) : 京都

9. Masataka Taguchi, Jun Taguchi, Daisuke Sasaki, Takeharu Kato, Makiko

Hourai, Hidehiro Itonaga, Yoshitaka Imaizumi, Daisuke Imanishi, Hideki Tsushima, Tomoko Hata, Takuya Fukushima, Kunihiro Tsuakasaki, Shimeru Kamihira, Yasushi Miyazaki : Proliferation of donor-derived HTLV-1 infected cells in an ATL patient after allogeneic PBSCT. : 第 74 回日本血液学会学術集会 : 平成 24 年 10 月 19 日 (金) : 京都

10. Koji Kato, Ilseung Cho, Atsushi Wake, Naokuni Uike, Shuichi Taniguchi, Yukiyoichi Moriuchi, Yasushi Miyazaki, Masayuki Hino, Koichi Akashi, Hisashi Sakamaki, Koji Kato, Ritsuko Suzuki, Takeharu Yamanaka, Atae Utsunomiya : Cord blood transplantation for adult T-cell leukemia/lymphoma : The JSHCT WG study. : 第 74 回日本血液学会学術集会 : 平成 24 年 10 月 19 日 (金) : 京都

11. Yasushi Miyazaki, Koji Ando, Hideki Tsushima : Interaction of ELF-4 and NPM1 in AML. : 第 10 回日本臨床腫瘍学会学術集会 : 平成 24 年 7 月 27 日 (金) : 大阪

12. Tomohiko Taki, Shigeki Ohtake, Hitoshi Kiyoi, Norio Asou, Shuichi Miyawaki, Yasushi Miyazaki, Masafumi Taniwaki, Tomoki Naoe : Clinical Feature of Core Binding Factor Acute Myeloid Leukemia in Japan. : The 3rd JSH International Symposium 2012 in Kawagoe : 平成 24 年 5 月 26 日 (土) : 川越市 (埼玉)

13. Hidehiro Itonaga, Tomoko Hata, Hideki Tsushima, Hiroaki Taniguchi, Junya Makiyama, Shinya Sato, Emi Matsuo, Reishi Yamasaki, Daisuke Ogawa, Yumi Takasaki, Daisuke Imanishi, Yoshitaka Imaizumi, Yasuhisa Kawaguchi, Tatsuro Joh, Shinichiro Yoshida, Masaomi Yamamura, Hisashi Soda, Yukiyoichi Moriuchi, Masao Tomonaga, Yasushi Miyazaki : The 3rd JSH International Symposium 2012 in Kawagoe : Very Long-term Follow-up Results of Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy in Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia : Nagasaki CML Study Group Experience. : The 3rd JSH International Symposium 2012 in Kawagoe : 平成 24 年 5 月 26 日 (土) : 川越市 (埼玉)

14. Rika Kihara, Hitoshi Kiyoi, Shigeaki Ohtake, Shuichi Miyawaki, Yasushi Miyazaki, Norio Asou, Toru Sakura, Yukiyasu Ozawa, Noriko Usui, Heiwa Kanamori, Toru Kiguchi, Kiyotoshi Imai, Naokuni Uike, Fumihiro Kimura, Tomoki Naoe : Allogeneic StemCell Transplantation

at the Primary Induction Failure or after the 1st Relapse Dose not Conquer Poor Prognosis of AML with FLT3-ITD. : The 3rd JSH International Symposium 2012 in Kawagoe : 平成 24 年 5 月 26 日 (土) : 川越市 (埼玉)

[図書] (計 0 件)

[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]

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 泰司 (MIYAZAKI YASUSHI)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号 : 40304943

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

安東 恒史 (ANDO KOJI)
長崎大学・大学病院・医員
研究者番号 : 90571357