

## 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24年 6月 4日現在

機関番号：12601  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2010～2011  
 課題番号：22790902  
 研究課題名（和文） ウィルムス腫瘍関連癌抑制遺伝子WTXによる造血制御・白血病発症の機序解明  
 研究課題名（英文） Effect of WTX, a tumor suppressor gene associated with Wilms' tumor, on hematopoiesis and leukemogenesis.  
 研究代表者  
 中村 文彦 (NAKAMURA FUMIHIKO)  
 東京大学・医学部附属病院・助教  
 研究者番号：50326930

## 研究成果の概要（和文）：

癌抑制遺伝子 WTX は、造血幹細胞に最も強く発現しており、その自己複製と維持に重要な役割を果たすと考えられる。急性骨髄性白血病の一部症例に WTX 遺伝子の点突然変異を認めたが、変異株と野生株の分子学的機能に差異はみられなかった。一方、T 細胞性急性リンパ性白血病では全般的に WTX 発現が抑制されていた。その機序として、DNA メチル化の関与が示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

Tumor suppressor gene, WTX, is most strongly expressed in hematopoietic stem cells (HSCs), and is likely to regulate self-renewal and maintenance of HSCs. Although we identified point mutations of WTX gene a portion of acute myeloid leukemia, mutant WTX was not functionally different from wild-type WTX. Rather, WTX was markedly down-regulated in T-cell acute lymphoblastic leukemia, where DNA methylation seems to play pivotal roles.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

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：血液内科学

## 1. 研究開始当初の背景

白血病の治療は従来 化学療法が主体であったが、造血幹細胞移植の技術が進歩した結果、若年患者の治療の可能性が高まった。一方で、移植不可能な高齢者は依然として予後不良であり、有効な治療法の開発が急務である。近年、一部の白血病の発症機構が解明され、原因遺伝子産物を標的とした「分子標的療法」が臨床応用されるようになった。その代表例は慢性骨髄性白血病の BCR/ABL に対

するチロシンキナーゼ阻害薬(イマチニブ)、急性前骨髄球性白血病の PML/RARA に対するレチノイン酸であり、いずれの疾患も分子標的療法により高率に治癒が期待できるようになった。今後 白血病治療を発展させるためには、白血病発症の分子学的機構のさらなる解明が必要である。

多くの白血病では、本来自己複製能を有し長い寿命を持つ造血幹細胞(LT-HSC)が白血病化の標的となるものと考えられている。白

血病が発症する過程においては、発癌に関連する複数の遺伝子異常が LT-HSC に蓄積することが必要であると推測されている。造血幹細胞は Bmi1, Wnt- $\beta$  カテニン経路, Notch 経路, JAK-STAT 経路, PTEN などを通じて自己複製することが知られており、これらのシグナル伝達経路は正常造血の制御のみならず、白血病細胞の自己複製においても重要な役割を果たすことが示唆されている。

WTX はウィルムス腫瘍(小児に発症する腎腫瘍)の原因遺伝子として 2007 年にクローニングされた癌抑制遺伝子である。WTX は  $\beta$  カテニンに直接結合して、Wnt- $\beta$  カテニン経路を負に制御する。本研究では、癌抑制遺伝子 WTX による正常造血及び白血病発症の制御機構を解析した。

## 2. 研究の目的

癌抑制遺伝子 WTX が造血幹細胞の複製・分化に及ぼす影響を解析する。また、WTX の不活性化と白血病発症の関連を明らかにする。将来的には、WTX, Wnt- $\beta$  カテニン経路を対象とした、白血病に対する分子標的療法の実現を目指す。

## 3. 研究の方法

① 白血病における WTX 遺伝子変異の頻度  
骨髄異形成症候群, 急性白血病, 慢性白血病の患者骨髄検体から、腫瘍細胞のゲノム DNA を抽出した。各疾患における WTX 遺伝子の点突然変異, 欠失の出現頻度を調べ。また、プロモーター領域の DNA メチル化を検討した。臨床検体を用いた研究については、全例で文書による同意を取得し、臨床検体に連結可能匿名化を施した。遺伝子解析研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、倫理委員会の承認を経て実施した。

② WTX の造血制御機構

マウス骨髄から造血細胞を採取し、どの分画で WTX が発現しているかを調べた。また、細胞株に WTX 野生株あるいは WTX 変異株を導入し、細胞増殖能, 分化能, 細胞周期や細胞死に及ぼす影響を観察した。

③ WTX 条件的ノックアウトマウスの作成

WTX 遺伝子は 2 つのエクソンで構成されているが、coding region はエクソン 2 の前半部分にのみ存在しており、この領域を含む 4.5kb を Cre-loxP によりノックアウトする条件的ノックアウトマウスの樹立を試みた。

## 4. 研究成果

造血細胞の各分化段階における WTX の発現を解析したところ、マウス骨髄の幹細胞分画 (KSL 分画) で最も発現が多く、分化とともに発現が急激に低下することが判明した。このことは、WTX が造血幹細胞の複製や維持に重要な役割を担うことを示唆した。

WTX 遺伝子の造血細胞における分子学的作用機序を解析した。レトロウイルスを用いて WTX を過剰発現させたところ、コロニー形成能は抑制された。また、急性骨髄性白血病 (AML) の症例で認められた WTX 点突然変異株を同様に過剰発現させたところ、コロニー形成能は同様に抑制された。その他の解析を行ったが、WTX 野生株と変異株の機能に差異を認めなかった。このことから、① WTX が癌抑制遺伝子であること、② AML で稀に報告される WTX 点突然変異が白血病発生に及ぼす影響は少ない、と結論した。

急性白血病全般で WTX 遺伝子の発現を検討し、T 細胞性急性リンパ性白血病 (T-ALL) で WTX の発現が低下していることを見出した。ただし、T-ALL における WTX の点突然変異や欠失は報告されておらず、プロモーター領域の DNA メチル化が WTX 発現抑制の原因と推定して、現在解析を進めている。

当初、WTX 遺伝子の条件的ノックアウトマウスを樹立するために、WTX 遺伝子の open reading frame 全長を含むエクソン 2 を Cre-loxP システムでノックアウトするターゲティングベクターを作成した。相同的組み換えにより、本ベクターを胚性幹 (ES) 細胞に導入した。これを用いてキメラマウスの樹立を試みたが、キメラ率の高い個体が全て早期死亡をきたした。この現象は、WTX が個体発生に必須の因子であることを意味した。すなわち、WTX 遺伝子が X 染色体上に位置するために、相同組み換えによって野生型 WTX の発現が高度に抑制されることが原因と考えられた。したがって、WTX 遺伝子のプロモーター領域を標的とした条件的ノックアウトマウス作成に変更し、現在樹立を進めている。

## 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 12 件)

- ① Hangai S, Nakamura F, Yamada A, Watabe H, Ichikawa M, Koike K, Kurokawa M. Usefulness of double-balloon enteroscopy for evaluation of duodenal follicular lymphoma. Ann Hematol 2012. DOI 10.1007/s00277-012-1471-9 (査読有)
- ② Morita K, Nakamura F, Kamikubo Y, Mizuno N, Miyauchi M, Yamamoto G, Nannya Y, Ichikawa M, Kurokawa M. Pituitary lymphoma developing within pituitary adenoma. Int J Hematol 2012. DOI 10.1007/s12185-012-1075-0 (査読有)
- ③ Morita K, Nakamura F, Nannya Y, Nomiyama A, Arai S, Maeda D, Ichikawa M, Homma

- Y, Kurokawa M. Primary MALT lymphoma of the urinary bladder in the background of interstitial cystitis. Ann Hematol 2012. DOI 10.1007/s00277-012-1419-0 (査読有)
- ④ Morita K, Nakamura F, Nannya Y, Kamikubo Y, Ichikawa M, Kurokawa M. Lymphoma with specific affinity to endocrine organs. Ann Hematol 2011. DOI 10.1007/s00277-011-1372-3 (査読有)
- ⑤ 中村文彦, 黒川峰夫. 造血器腫瘍学 基礎と臨床の最新研究動向 白血病関連遺伝子と染色体異常, 日本臨牀 2012 年、70 巻増刊号、103-7. (査読無)
- ⑥ Koya J, Iwata A, Nakamura F, Nagashima Y, Ichikawa M, Tsuji S, Kurokawa M. Fludarabine may overcome resistance to rituximab in IgM-related neuropathy. J Neurol Sci 2012;315:150-2. (査読有)
- ⑦ Taoka K, Kumano K, Nakamura F, Hosoi M, Goyama S, Imai Y, Hangaishi A, Kurokawa M. The effect of iron overload and chelation on erythroid differentiation. Int J Hematol 2012;95:149-59. (査読有)
- ⑧ Toya T, Nishimoto N, Koya J, Nakagawa M, Nakamura F, Kandabashi K, Yamamoto G, Nannya Y, Ichikawa M, Kurokawa M. The first case of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm with MLL-ENL rearrangement. Leukemia Res 2012;36:117-8. (査読有)
- ⑨ Yamazaki S, Fujioka Y, Nakamura F, Ota S, Shinozaki A, Yamamoto G, Kamikubo Y, Nannya Y, Ichikawa M, Fukayama M, Kurokawa M. Composite diffuse large B-cell lymphoma and CD20-positive peripheral T-cell lymphoma. Pathol Int 2011;61:662-6. (査読有)
- ⑩ Ogura M, Todo T, Tanaka M, Nannya Y, Ichikawa M, Nakamura F, Kurokawa M. Temozolomide may induce therapy-related acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol 2011;154(5):663-5. (査読有)
- ⑪ Yamazaki S, Nakamura F, Nasu R, Nannya Y, Ichikawa M, Kurokawa M. Haemophagocytic lymphohistiocytosis is a recurrent and specific complication of acute erythroid leukaemia. Br J Haematol 2011;153:669-72. (査読有)
- ⑫ Yoshizato T, Nannya Y, Yoshiki Y, Nakamura F, Imai Y, Ichikawa M, Kurokawa M. Nilotinib-induced hypothyroidism in a patient with chronic myeloid leukemia. Int J Hematol

2011;93:400-2. (査読有)

[学会発表] (計1件)

- ① 中村文彦, 南谷泰仁, 市川幹, 黒川峰夫. Fludarabine may be associated with secondary myelodysplasia in chronic lymphocytic leukemia. 日本血液学会総会 (京都), 2010 年 10 月 14 日.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.u-tokyo-hemat.com/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村文彦 (NAKAMURA FUMIHIKO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50326930

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：