

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23240125

研究課題名(和文) 骨髄性白血病の発症と悪性を規定する分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular basis of myeloid leukemogenesis

研究代表者

中村 卓郎 (Nakamura, Takuro)

公益財団法人がん研究会・がん研究所発がん研究部・部長

研究者番号：00180373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,900,000円、(間接経費) 9,270,000円

研究成果の概要(和文)：急性骨髄性白血病(AML)の発症において重要な転写因子であるHoxa9とMeis1を中心とした分子間ネットワークの解析を行った。Meis1は白血病細胞の骨髄ニッチへの定着に不可欠な機能を有し、網羅的なChIP解析と遺伝子発現解析からこの機能を担う標的遺伝子としてSytl1を同定した。Sytl1は膜受容体の細胞内移動を促進することによって白血病細胞と骨髄ニッチとの相互作用を修飾している可能性が考えられた。Trib1はC/EBPaの制御を介して骨髄顆粒球の分化を調節していた。ヒト白血病においてTrib1の変異を同定した。Trib1のAML発症における新たな協調遺伝子としてBcl11aを同定した。

研究成果の概要(英文)：We have analyzed the molecular network around Hoxa9 and Meis1 that play a important role as transcription factors in development of acute myeloid leukemia (AML). Meis1 is required for engraftment of leukemic cells in bone marrow niche. ChIP-Seq analysis and gene expression profiling identified the Meis1 target gene Sytl1 that is responsible for Meis1's function. Sytl1 facilitates intracellular trafficking of membrane-bound receptors to modulate cell-cell interaction between leukemic cells and bone marrow stroma. Trib1 downregulates the C/EBPa protein and regulates granulocytic differentiation. Trib1 somatic mutation was identified in a case of human AML. Retroviral tagging experiments identified Bcl11a as a novel cooperative gene for Trib1 in leukemogenesis.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：骨髄性白血病 実験動物モデル 遺伝子経路 転写制御 シグナリング

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病 (AML) 発症の原因として、数多くの分子異常が報告された。特に、RAS-MAPK 経路に代表されるシグナル伝達異常と、RUNX1 や MLL を初めとする転写制御系の異常は重要であり、両者ともに異常の見られない白血病症例は事実上皆無と考えると差し支えない。しかしながら、前白血病状態を経て overt な白血病、さらに治療反応性から治療抵抗性へと悪性化が進展して行く過程は、分子レベルでの変化も複雑で、先進的ゲノム解析を用いても容易に全貌が明らかにするのは困難であった。事実、non-coding RNA や RNA 結合蛋白、プロスタグランジン代謝経路等、従来予想されなかった分子異常が AML において数多く発見されていた。新しい分子異常を同定し、分子ネットワークにおける役割を解明することで、分子標的治療の新たな対象につながることを期待出来た。

申請者は、ヒト白血病症例における NUP98 キメラ遺伝子を同定するとともに、動物モデルを用いてヒト白血病をよく反映する病態を作り出し、その分子機構を明らかにして来た。それらの中には、NUP98-HOXA9、Hoxa9/Meis1、BCL11A、TRIB1 が含まれる。特に Hoxa9/Meis1 の研究から同定した TRIB1 は、MAPK 経路と C/EBP α を結ぶ重要な分子であることを明らかにした。また、Hox/Meis1 機能は NUP98 キメラの対象となるだけではなく、MLL キメラや PML-RAR α の異常に必須であり、AML におけるメジャープレイヤーと考えられた。

これらの研究から、1) 白血病やがんにおける分子異常は、分子間ネットワークの異常というコンテキストで評価されるべきであり、2) そのために個体を用いた研究が重要であること、3) これにより新たな分子異常とそれを基盤としたパラダイムが期待出来ること、が浮かび上がった。

2. 研究の目的

白血病発症と進展過程の分子基盤について新たな体系化を行なう目的で以下の点を明らかにする。特に、RAS/MAPK シグナルや Hox/Meis1 系については、それ自身の異常 (リン酸化異常・発現亢進・遺伝子融合など) はよくわかっているものの、その先の効果については依然曖昧なままである。そこで、本研究ではこれらの経路の標的分子の解明に焦点を当てるとともに、協調因子を同定し、RAS/MAPK 系と Hox/Meis1 系の経路の新たな分子機構を探る。具体的には以下の点を解析する。

1. 白血病細胞における Meis1/Hoxa9/Pbx による転写制御機構の解明

ChIP-seq 及び遺伝子発現解析を用いた工

ピゲノム解析によりキープレイヤーとなる標的遺伝子を同定する。

2. MLL キメラ白血病における Meis1 の役割の解析:

MLL キメラによる白血病発症にはその標的遺伝子である Hox と Meis1 の活性化が重要であるとされているが、特に Meis1 の役割について Meis1 KO マウスを用いて明らかにする。

3. Trib1 の解析:

Trib1 は AML 原因遺伝子であり、MEK1 との結合を介して MAPK 経路を活性化するとともに、C/EBP α を不活性化する。Trib1 KO マウスの系に FLT3 や BCR-ABL のシグナルを導入して白血病発症に対する修飾作用を検討する。

4. ヒト AML 症例の解析

最近、我々のグループはヒト AML 症例において Trib1 の機能獲得型変異を同定した。さらに、症例数を増やして Trib1/Trib2 の変異を解析するとともに、その意義についてマウスモデルを用いた解析により調べる。

5. 遺伝学的解析

我々の AML モデルはレトロウイルスによる遺伝子導入系であるので、ゲノム内挿入部位を解析することで、原因遺伝子の特異的協調遺伝子を同定することが出来る。この利点を生かして、Trib1 に引き続いて新たな協調遺伝子を同定する。

3. 研究の方法

1. Hoxa9/Meis1/Pbx による白血病細胞における転写制御機構の解明と標的遺伝子の同定

Hoxa9 を正常骨髄幹・前駆細胞に導入すると、細胞の不死化を経て白血病を誘導する。この際、Meis1 は co-factor として Hoxa9 の白血病誘導能を著しく促進する。Meis1 と Hoxa9 の相互作用には同じくホメオドメイン転写因子の Pbx の介在があり、複雑な制御機構の存在が示唆されている。そこで、Meis1 の存在及び非存在下で、Hoxa9、Meis1、Pbx の ChIP シークエンス解析を行いこれらの転写因子の全ゲノムレベルでの DNA 結合部位を明らかにする。同時に遺伝子発現プロファイルの解析を行い、Meis1 及び Hoxa9 の標的遺伝子を同定して、その中から白血病発症の鍵を握る遺伝子を明らかにする。

次に、ChIP シークエンス解析によって同定された標的遺伝子の機能解析を行う。Meis1 の標的遺伝子については、Meis1 コンディショナル KO マウス骨髄に導入し、Meis1 機能を代償する機能を確認する。遺伝子によっては、細胞生物学的・生化学的方法も加えて白血病発症における意義を解析する。

2. Meis1 及びその標的遺伝子 Syt1 の in vivo における白血病促進機構の解析

Meis1 及びその標的遺伝子 Syt1 が白血病細胞の骨髄ニッチへの定着や in vivo での拡大における役割を解析するために、白血病細胞の定着能・遊走能や間質細胞との相互作用を in vitro/in vivo の実験系で解析する。

3. Trib1 の RAS/MAPK と C/EBP α 経路に対する役割の解析

Trib1 及び Trib2 は何れも AML の原因遺伝子として同定され、両者とも Hoxa9/Meis1 と協調することを初めとして、その機能と構造は酷似している。発現組織も互いにオーバーラップしていることから、単独に遺伝子をノックアウトしてもマウスに顕著な異常は認められない。Trib1 は、MEK1 と結合し ERK のリン酸化を亢進させるとともに C/EBP α の分解を促進する。すなわち、Trib1 は RAS/MAPK 系と C/EBP α のアダプターとして作用することで AML 発症と造血細胞機能を制御している可能性が高い。新たに作製した Trib1 conditional KO 及び Trib1/Trib2 double KO マウスを用いて、Trib1/Trib2 の造血における機能を調べる。

4. ヒト AML 臨床検体における解析

連携研究者の伊藤悦朗、林泰秀両博士の協力を得て、ヒト AML における Trib1/Trib2 の変異を解析する。

5. 遺伝学的解析

我々のマウスモデルでは、白血病の誘導実験にレトロウィルスベクターを用いた原因遺伝子の導入を行っている。この実験系では、retroviral tagging が適用できるので、導入した原因遺伝子に対する協調遺伝子の特異的に同定することが出来る。本研究では、Trib1 の Hox/Meis 以外の新たな協調遺伝子を同定することによって、RAS/MAPK 系に協調する遺伝子ネットワークを体系的に明らかにする。同定した遺伝子の中で特にヒト AML で Trib1/Trib2 と協調作用が示唆される遺伝子に焦点を絞って以後の解析を進める。

4. 研究成果

1. Hoxa9/Meis1/Pbx による白血病細胞における転写制御機構の解明と標的遺伝子の同定

Hoxa9/Meis1 を発現する AML 細胞株 H9M1 において、Hoxa9, Meis1, Pbx の全ゲノムレベルにおける DNA 結合部位を明らかにした。Meis1 と Hoxa9, total Pbx の結合部位はそれぞれ、6,324、770、2,892 カ所であった。6,324 の Meis1 結合部位のうち、1,966 は Pbx と、564 は Hoxa9 とそれぞれ共結合を示した。また、Meis1 のノックアウトにより Hoxa9 と Pbx の結合部位は増加した。この結果から、

Meis1/Hoxa9/Pbx の in vivo における緊密な DNA 結合ネットワークの存在が示唆された。

H9M1 細胞において Meis1 発現の有無における遺伝子発現を網羅的に解析し、この結果と ChIP Seq のデータとを照合することにより Meis1 の標的遺伝子を探索した。この中で、Syt1 と Smad7 を Hoxa9 と in vivo で協調する責任遺伝子として同定した。

2. Meis1 及びその標的遺伝子 Syt1 の in vivo における白血病促進機構の解析

Meis1 は、それ自身では骨髄細胞に対する transforming 能を持たないが、Hoxa9 の協調因子として in vivo における白血病発症促進に必須であることが知られている。本研究では、Meis1 の発現が白血病細胞の骨髄ニッチへの定着に不可欠であることを明らかにした。さらに、この機能は OP9 細胞との相互作用と関連し、サイトカインやケモカインによる遊走能とも関係することが明らかになった。さらに標的遺伝子 Syt1 はこれら全てにおいて Meis1 の機能を代替することが示された。Syt1 は、Rab27 蛋白と結合して細胞質から膜への物質移動を促進することが知られていたが、今回その機能が膜受容体の機能に関与していることが示された。

3. Trib1 の RAS/MAPK と C/EBP α 経路に対する役割の解析

Trib1 KO マウスを用いた解析から、Trib1 は骨髄内で C/EBP α を蛋白レベルで制御し、Trib1 のノックアウトは C/EBP α 蛋白の増加を介して顆粒球分化を促進することが明らかになった。これに対して、Trib2 ノックアウトによる変化は軽微であり、このことは正常骨髄における Trib1 と Trib2 の発現レベルの差による可能性が考えられた。

4. ヒト AML 臨床検体における解析

小児白血病症例の解析から、ダウン症候群における急性巨核球性白血病の症例において Trib1 の体細胞変異（点突然変異）を同定した。マウスモデルを利用した解析から、この変異は Trib1 の機能獲得性変異であることが示された。Trib1 変異は GATA1 変異に先だって骨髄幹細胞で生じていることが明らかになった。

一方、成人の AML 症例の遺伝子発現プロファイルから、SYTL1 は HOXA9 及び MEIS1 と発現の挙動がよく相関していることが示された。

5. 遺伝学的解析

Trib1 誘発マウス AML の系で協調遺伝子の同定を行った結果、Hox 遺伝子の次に頻度の高いレトロウィルス挿入部位から Bcl11a を同定した。遺伝子発現プロファイル解析から、Bcl11a を発現している AML では、Notch 経路や Bcl6 の発現に変化が生じていることが示唆された。

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 11 件)

1. Okada Y, Kamata S, Akashi T, Kurata M, Nakamura T, Kihara K. Primitive neuroectodermal tumor/Ewing's sarcoma of the urinary bladder: a case report and its molecular diagnosis. *Int J Clin Oncol*, 16: 435-438, 2011.
2. Tsuruyama T, Hiratsuka T, Jin G, Imai Y, Takeuchi H, Maruyama Y, Kanaya K, Ozeki M, Takakuwa T, Haga H, Tamaki K, Nakamura T. MLV integration induces the formation of transcription factor complexes on palindromic sequences in the Stat5a gene during the development of pre-B lymphomagenesis. *Am J Pathol*, 178: 1374-1386, 2011.
3. Kurata M, Yamazaki Y, Kanno Y, Ishibashi S, Takahara T, Kitagawa M, Nakamura T. Anti-apoptotic function of Xbp1 as an Il-3 signaling molecule in hematopoietic cells. *Cell Death Dis*, 2, e118, 2011.
4. Yokoyama T, Nakamura T. Tribbles in disease: signaling pathways important for cellular function and neoplastic transformation. *Cancer Sci*, 102: 1115-1122, 2011.
5. Funasaka T, Nakano H, Wu Y, Hashizume C, Gu L, Nakamura T, Wang W, Zhou P, Moore MAS, Sato H, Wong RW. RNA export factor RAE1 contributes to NUP98-HOXA9-mediated leukemogenesis. *Cell Cycle*, 10: 1456-1467, 2011.
6. Yokoyama T, Toki T, Aoki Y, Kanezaki R, Park M, Kanno Y, Takahara T, Yamazaki Y, Ito E, Hayashi Y, Nakamura T. Identification of TRIB1 R107L gain-of-function mutation in human acute megakaryocytic leukemia. *Blood*, 199:

2608-2611, 2012.

7. Kon S, Minegishi N, Tanabe K, Watanabe T, Funaki T, Wong WF, Sakamoto D, Higuchi Y, Kiyonari H, Asano K, Iwakura Y, Fukumoto M, Osato M, Sanada M, Ogawa S, Nakamura T, Satake M. Smad1 deficiency perturbs receptor trafficking and predisposes mice to myelodysplasia. *J Clin Invest*, 123: 1123-1137, 2013.
8. Nagamachi A, Matsui H, Asou H, Ozaki Y, Aki D, Kanai A, Takubo K, Suda T, Nakamura T, Wolff L, Honda H, Inaba T. Haploinsufficiency of SAMD9L, an endosome fusion facilitator, causes myeloid malignancies in mice mimicking human diseases with monosomy 7. **Cancer Cell**, 24: 305-317, 2013.
9. Arika R, Morikawa S, Mabuchi Y, Suzuki S, Nakatake M, Yoshioka K, Hidano S, Nakauchi H, Matsuzaki Y, Nakamura T, Goitsuka R. Homeodomain transcription factor Meis1 is a critical regulator of adult bone marrow hematopoiesis. *PLOS One*, 9: e87646, 2014.
10. Hirayama T, Asano Y, Iida H, Watanabe T, Nakamura T, Goitsuka R. Meis1 is required for the maintenance of postnatal thymic epithelial cells. *PLOS One*, 9:e89885, 2014.
11. Tanaka M, Yamazaki Y, Kanno Y, Igarashi K, Aisaki K, Kanno J, Nakamura T. Ewing's sarcoma precursors are highly enriched in embryonic osteochondrogenic progenitors. *J Clin Invest*, in press, 2014.

〔学会発表〕(計 54 件)

以下招聘講演のみ記載

1. がん研究を推進するためのマウスモデル
中村卓郎 平成 23 年度がん若手研究者
ワークショップ 2011 年 9 月 3 日 蓼科
2. Animal models for sarcoma development:
Relationship between genetic abnormalities
and cellular context. Takuro Nakamura 日仏

- がんワークショップ 2011年11月24日
モンペリエ
3. Sarcoma models using mesenchymal progenitor and chimeric transcription factor. Takuro Nakamura 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月14日 横浜
 4. Leukemia disease gene network: crosslink between transcription and signaling. Takuro Nakamura 第9回日中がんワークショップ 2011年12月22日 上海
 5. Ewing肉腫モデル：ジーンターゲットングからセルターゲットングへ 中村卓郎 平成23年度個体レベルでのがん研究支援活動ワークショップ 2012年1月18日 大津
 6. 白血病と骨軟部腫瘍の発生機構：遺伝子変異とそのネットワーク、発生起源の理解に向けて 中村卓郎 第101回日本病理学会総会宿題報告 2012年4月27日 東京
 7. Gene pathways around Hoxa9/Meis1 in myeloid leukemogenesis. Takuro Nakamura Ninth International Workshop on Molecular Aspects of Myeloid Stem Cell Development and Leukemia 2012年5月8日 シンシナティ
 8. 骨髄性白血病モデル：マウスモデルからわかること 中村卓郎 第8回北関東小児がんセミナー 2012年5月19日 高崎
 9. 発がん刺激と腫瘍の起源 中村卓郎 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月20日 札幌
 10. キメラ遺伝子を有する肉腫の発症と進展機構：動物モデルを用いた解析 田中美和、中村卓郎 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月21日 札幌
 11. The role of Meis1 in AML expansion in vivo. Takuro Nakamura 43rd International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund 2012年11月14日 東京
 12. The role of Meis1 in AML expansion in vivo. Takuro Nakamura 第2回日仏がんワークショップ 2012年11月30日 鳴門
 13. Ewing肉腫の新しい動物モデル：起源の解明と治療への応用を目指して 中村卓郎 第208回関東骨軟部腫瘍研究会 2012年12月11日 東京
 14. 骨軟部腫瘍の動物モデル：起源の解明と治療応用へのアプローチ 中村卓郎 第2回京都小児固形腫瘍フォーラム 2013年5月10日 京都
 15. 骨軟部腫瘍における融合遺伝子：診断と治療応用を目指して 中村卓郎、田中美和、元井紀子、町並陸生、松本誠一 第102回日本病理学会総会 2013年6月7日 札幌
 16. Trib1 AMLを利用したBcl11aによる白血病関連遺伝子制御の解析 横山隆志，山

- 崎ゆかり，菅野陽平，高原智子，中村卓郎 第102回日本病理学会総会 2013年6月6日 札幌
17. A novel mouse model for Ewing's sarcoma using EWS-ETS and embryonic progenitor cells 中村卓郎 第46回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会 2013年7月11日 東京
 18. 白血病細胞の骨髄内定着と進展に対するMeis1の役割 第72回日本癌学会学術総会 2013年10月3日 横浜
 19. Ewing肉腫の動物モデル 田中美和、中村卓郎 第72回日本癌学会学術総会 2013年10月4日 横浜
 20. がん研究におけるマウスモデルの有用性 中村卓郎 第72回日本癌学会学術総会 2013年10月4日 横浜
 21. Leukemic gene network: from genetic interaction to in vivo function. Takuro Nakamura 3rd GDR1 French Japanese Cancer Meeting 2013年11月23日 トゥールーズ
 22. Mouse models for bone and soft tissue sarcoma: from cell-of-origin to pre-clinical platform. Takuro Nakamura. The 18th Korea-Japan Cancer Research Workshop 2013年11月30日 岐阜

〔図書〕(計 1件)

中村卓郎 編著 疾患モデルの作製と利用がん ライフサイエンスインフォメーションセンター 2012年10月30日発行

〔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
公益財団法人がん研究会がん研究所発がん研究部のホームページ

<http://www.jfcr.or.jp/laboratory/department/carcinogenesis/index.html>

日本病理学会ホームページの研究紹介

<http://pathology.or.jp/ippan/pdf/nakamura.pdf>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 卓郎 (NAKAMURA, Takuro)
公益財団法人がん研究会・がん研究所
副所長
研究者番号：00180373

(2) 研究分担者

横山 隆志 (YOKOYAMA, Takashi)
公益財団法人がん研究会・がん研究所
発がん研究部・研究員
研究者番号：00535833

(3) 連携研究者

後飯塚 僚 (GOITSUKA, Ryo)
東京理科大学・生命科学研究所・教授
研究者番号：50301552

伊藤 悦朗 (ITO, Etsuro)
弘前大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20168339

林 泰秀 (HAYASHI, Yasuhide)
群馬県小児医療センター・センター長
研究者番号：30238133