

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591367

研究課題名(和文) MLL 遺伝子変異体による骨髓異形成症候群モデルマウスの作製と分子基盤の理解

研究課題名(英文) Molecular mechanism of MLL mutant-induced MDS

研究代表者

指田 吾郎 (Sashida, Goro)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70349447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000 円、(間接経費) 1,170,000 円

研究成果の概要(和文)：申請者は、MLL部分重複変異体(MLL-PTD)が転写因子RUNX1点突然変異体の発現を制御するという研究成果を得ていた。MLL-PTDノックインマウス/Runx1ヘテロマウスによって、MDSからAMLへと病態が進展する疾患モデルマウスを作製した、またMLL変異体とRUNX1点突然変異体がMDSからAMLへの病態進展にどのように協調的に関与するのかその分子基盤を解析した。

研究成果の概要(英文)：Given that MLL-PTD regulates the expression of RUNX1 mutants at protein level, we generated a novel MDS/AML mouse model by utilizing MLL-PTD knock-in mouse and Runx1 heterozygous mouse or RUNX1 mutants. We also demonstrated how MLL-PTD and RUNX1 mutants collaborated to induce the development of MDS and promote AML following MDS.

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：MLL-PTD RUNX1 骨髓異形成症候群 急性骨髓性白血病 国際情報交換

1. 研究開始当初の背景

近年、造血幹細胞の自己複製や細胞分化などの造血機能が、クロマチン構造変換を伴うエピジェネティックな転写制御により規定されており、その制御異常が正常造血の老化現象や白血病化をもたらすことが示唆されている。トライソックス群蛋白は、ヒストンの化学的修飾を介して標的遺伝子の発現を正に制御し、BMI1などのポリコーム群蛋白に拮抗する機能を有する (Hanson RD et al. PNAS 1999)。トライソックス群蛋白の一つである MLL (Mixed lineage leukemia) 蛋白はその SET domain によるヒストン H3K4 のトリメチル化を介して、造血細胞において転写因子であるホメオボックス遺伝子群の発現を正に制御する (Milne TA et al. Mol Cell 2002)。染色体転座を介した MLL-AF9 など MLL 融合蛋白は乳幼児の急性白血病に多くみられ、それら MLL 融合蛋白による急性白血病の分子病態は詳細な解析が進められている (Krivtsov AV, Armstrong SA. Nat Rev Cancer 2007)。一方で、MLL は染色体転座以外にも遺伝子異常が知られている。MLL partial tandem duplication (MLL-PTD) は AT Hook から Repressive Domain までが部分的に重複した遺伝子変異であり、融合するエクソンの部位によって3つの亜型がある (Caligiuri MA et al. PNAS 1997)

MLL-PTD は成人 AML 全体の約 10% を占め、正常染色体核型に限れば最大 25% に認められる (Baseche J et al. Br J Haematol 2006)。興味深いことに、MLL-PTD 陽性 AML では、MLL 融合蛋白によって活性化される HOXA9 などのホメオボックス遺伝子群の発現の強い亢進は認められず、MLL-AF9 陽性 AML とは異なった遺伝子発現様式が認められる。さらに、MLL-PTD 陽性 AML 自体でも症例ごとに遺伝子発現様式が異なり、特徴的な遺伝子発現が認められない (Ross ME et al. Blood 2004)。さらに MLL-PTD 自体が非常に大きいため、

レトロウイルスによる遺伝子導入はほぼ不可能であるなど技術的困難も重なり、その分子病態は不明のまま残されている。このような中、昨年来、MDS から AML に移行した症例 (MDS/AML) において、MLL-PTD が RUNX1 の点突然変異と正の相関にあることが、複数の研究室から報告された (Tang JL et al. Blood 2009, Dicker F et al. Leukemia 2010)。RUNX1 は細胞分化を制御するほか、造血幹細胞の機能を負に制御する重要な転写因子の一つであり、その点突然変異は MDS/AML の約 10% に認められる (Harada H et al. Blood 2004)。

2. 研究の目的

こうした知見をもとにして、申請者らは、野生型 MLL が野生型 RUNX1 と蛋白結合し、その蛋白を安定化し発現レベルを増強することを報告した (Huang G et al. ASH meeting 2009)。しかしながら、複数の MLL-PTD 陽性ヒト AML 細胞株 (EOL など) において野生型 RUNX1 の蛋白レベルが、正常 CD34 陽性細胞に比較して有意に減少していた。そこで、293T 細胞に MLL-PTD vector を transient transfection したところ、野生型 RUNX1 の蛋白レベルが減少するのは対照的に、変異型 RUNX1 (D171N, S291fs) 蛋白のレベルが増強された (Sashida G et al. International RUNX workshop 2010)。これらの発見は、ヒトの MDS/AML で報告された双方の変異体に正の相関を認めた報告の知見と合致したものであり、MLL-PTD が MDS から AML に移行した MDS/AML の過程において、野生型 RUNX1 蛋白を不安定化する一方で、変異型 RUNX1 蛋白を安定化し、変異型 RUNX1 蛋白と協調して機能することが考えられた。このような基礎的な研究成果をもとに、本研究では、MLL-PTD ノックインマウス (オハイオ州立大学 Caligiuri 博士より供与) と Runx1 ヘテロマウスと交配することにより、MDS/AML の疾患モ

デルマウスを作製し、その解析を通して、MLL-PTD と RUNX1 点突然変異体による病態形成における協調作用の意義を解明した。

3 . 研究の方法

本研究において、MII-PTD ノックインマウス /Runx1 ヘテロマウスから採取した造血細胞を致死量放射線照射したレシピエントマウスに移植することによって、MDS から AML へと病態が進展する疾患モデルマウスを作製した。またヒト MDS に認める RUNX1 点突然変態を造血幹 / 前駆細胞に導入することによって MDS の発症を確認した。MDS 幹細胞機能の解析およびその分化障害の表現型解析を行い、MDS 発症の分子基盤の解明を標的遺伝子の発現解析と、その責任遺伝子の同定を介して目指した。

4 . 研究成果

MLL-PTD ノックインマウスの解析では、造血幹細胞機能が亢進していること、また骨髓球系細胞へ分化が偏っていることを明らかに報告した (Zhang Y, Yan X, Sashida G et al. Blood. 2012)。さらに MII-PTD KI/Runx1KO また RUNX1 変異体マウスによる解析では三血球系統の異形成と白血球現象、血小板減少を呈する MDS の発症を認めた (Yan X, Zhang Y, Sashida G, et al. 2012 年アメリカ血液学会 Zhang Y, Yan X, Chen A, Sashida G, et al. 2013 年アメリカ血液学会)。これらの研究成果は MDS の臨床知見と合致しており、この MDS モデルマウスの有用性を支持していた。今後は MDS 発症における分子基盤の詳細な仕組みの解明とともに、MLL-PTD による MDS モデルマウスを用いて、治療効果判定に有用なバイオマーカー等の探索を行う。

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)

Zhang Y[#], Yan X[#], Sashida G[#], Zhao X, Rao Y, Goyama S, Whitman SP, Zorko N, Bernot K, Conway RM, Witte D, Wang QF, Tenen DG, Xiao Z, Marcucci G, Mulloy JC, Grimes HL, Caligiuri MA, and Huang G.

Stress hematopoiesis reveals abnormal control of self-renewal, lineage bias, and myeloid differentiation in MII partial tandem duplication (MLL-PTD) hematopoietic stem/progenitor cells. Blood 2012; 120(5): 1118-29 doi: 10.1182/blood-2012-02-412379 [#]equal contribution (査読あり)

[学会発表](計4件)

1 Yue Zhang, Xiaomei Yan, Aili Chen, Goro Sashida, Zhijian Xiao, and Gang Huang Modeling and Targeting MLL-PTD/RUNX1 Related MDS/AML In Mouse Blood 2013 122:2746 (2013年12月6日、アメリカ血液学会、ニューオーリンズ、米国)

2 Xiaomei Yan, Yue Zhang, Goro Sashida, Aili Chen, Xinghui Zhao, Susan Whitman, Qianfei Wang, Michael A. Caligiuri, Zhijian Xiao, and Gang Huang Modeling MLL-PTD Related Myelodysplastic Syndromes in Mouse. Blood 2012; 120: 2811. (2012年12月8日アメリカ血液学会、アトランタ、米国)

3 Yue Zhang, Xiaomei Yan, Goro Sashida, Xinghui Zhao, Yalan Rao, Susumu Goyama, Susan Whitman, Nicholas Zorko, Kelsie M. Bernot, Rajeeana M. Conway, David Witte, Qianfei Wang, Daniel G Tenen, Zhijian Xiao,

Guido Marcucci, James C. Mulloy, H. Leighton Grimes, Michael A. Caligiuri, and Gang Huang

Stress Hematopoiesis Reveals Abnormal Control of Self-Renewal, Lineage-Bias and Myeloid Differentiation in MLL Partial Tandem Duplication (MLL-PTD) Hematopoietic Stem/Progenitor Cells

Blood 2012; 120: 3501

(2012年12月8日アメリカ血液学会、アトランタ、米国)

4 Yue Zhang, Xiaomei Yan, Goro Sashida, Xinghui Zhao, Yalan Rao, Susumu Goyama, Susan P. Whitman, Nicholas Zorko, Kelsie M. Bernot, David Witte, Qian-fei Wang, Daniel G. Tenen, Zhijian Xiao, Guido Marcucci, James C. Mulloy, Michael A Caligiuri, and Gang Huang

MLL-PTD Causes Hypomorph Condition of CBF Complex (RUNX1/CBF) and Predisposes the Abnormal Hematopoietic Stem and Progenitor Cells (HSPCs) to Clonal Expansion

Blood 2011; 118: 2801.

(2011年12月10日アメリカ血液学会、サンディエゴ、米国)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

指田 吾郎 (Sashida Goro)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：70349447

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

岩間 厚志(Iwama Atsushi)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：70244126