

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591550

研究課題名(和文) NUP98-HOX融合遺伝子と協調する遺伝子変異との白血病発症メカニズムの解析

研究課題名(英文) Leukemogenesis between NUP98-HOX fusion genes and concomitant mutations

研究代表者

竹谷 健 (TAKETANI, Takeshi)

島根大学・医学部・講師

研究者番号：30359880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：NUP98-HOXA9融合遺伝子(NHA9)を有した急性骨髄性白血病の白血球化の機序を明らかにするために、IL3依存32D細胞株に、NHA9および同時に認められるFLT3-ITD、NRAS遺伝子変異(NRAS)、WT1遺伝子変異(WT1)を導入して機能解析を行った。IL3未添加でNHA9/FLT3-ITD、NHA9/NRAS、NHA9/WT1は高い増殖能を示した。G-CSF添加後、NHA9/FLT3-ITDのみ分化能が抑制された。アポトーシスおよびオートファジーの細胞死はそれぞれの細胞間で差はなかったが、NHA9/FLT3-ITDおよびNHA9/NRASはコロニー形成能が非常に高かった。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the pathogenesis of acute myeloid Leukemia with NUP98-HOX fusions, we examined the function of NUP98-HOXA9 fusion gene (NHA9) and the concomitant mutations, FLT3 internal tandem duplication (FLT3-ITD), NRAS G13V mutation (NRASMT), and WT1 R250W mutation (WT1MT). IL3-independent 32D cellular growth was significantly increased in the cells co-transfected with NHA9/FLT3-ITD, NHA9/RASMT and NHA9/WT1MT. Only cells transfected with NHA9/FLT3-ITD decreased differentiated markers, CD11b and Gr1. In all transfected cells, annexin V positive/propidium iodide negative apoptotic cells did not declined, and monodansylcadaverine used to reveal autophagic vacuoles after tamoxifen was not incorporated. Transfection of NHA9/FLT3-ITD and NHA9/NRASMT significantly increased the number of colony forming unit. These suggested that NHA9 with the simultaneous gene mutations obtained growth advantage because of augmentation of self-renewality, resulted in contribution to leukemogenesis.

研究分野：血液学、腫瘍学、再生医療学

キーワード：NUP98 HOX FLT3 RAS WT1

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病 (AML) は、臨床像、予後および遺伝的背景も非常に heterogenous な疾患である。この AML の白血病化を理解するためにこれまで試みられてきた研究の中での最も大きな進歩の 1 つは細胞遺伝学異常、特に AML の 50% にみられる染色体転座に関する解析である。さらに最近、染色体異常に加えて、さまざまな遺伝子変異が AML の発症に寄与することが明らかとなっている。我々は、11p15 転座を有する AML において *NUP98* 遺伝子が関与して、それらが正常造血に必須の転写因子である *HOX* 遺伝子と融合することを見出した。また、小児 AML において、白血病化に寄与する遺伝子変異の解析を行ってきた結果、*NUP98-HOX* 融合遺伝子を有した AML に高頻度に認められる遺伝子異常 (*FLT3*, *RAS*, *WT1* 遺伝子) を同定し、予後との関連を明らかにした。これまでのさまざまな研究で AML の発症に寄与する遺伝子異常が同定されてきたが、それぞれが AML にどのように関与しているか明らかになっていないものは少ない。また、AML の発症には機能的に異なる最低 2 つの遺伝子異常が同時に存在する必要があると考えられているが、同時に発症する遺伝子異常がどのように白血病に関与しているかは明らかではない。

2. 研究の目的

NUP98-HOX 融合遺伝子および *FLT3*, *RAS*, もしくは *WT1* 遺伝子の異常が同時に発症する AML の白血病化の機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 使用した細胞株および細胞培養方法

IL3 依存性マウス骨髄前駆細胞である 32Dcl3 cell line を用いた。培養方法は、RPMI1640 液体培地に 10% 胎児ウシ血清と抗生剤 (ペニシリン) を添加して、培養した (37°C、5%CO₂)。

(2) プラスミドの作成

4 つの cDNA の全長 (*NUP98-HOXA9* (NHA9), *FLT3-ITD* (51 bp-duplication), *NRAS* (G13V), *WT1* (Arg250trp)) を哺乳動物複製開始領域 (IR) と核マトリックス結合領域 (MAR) を持つ長期間遺伝子増幅が可能なプラスミドに挿入した。その後、それぞれの 4 つのプラスミドおよび 2 つずつのプラスミド (*NHA9/FLT3-ITD*, *NHA9/NRAS*, *NHA9/WT1*) を、リポフェクタミンを用いて、32Dcl3 cell line に遺伝子導入した。

(3) 機能解析

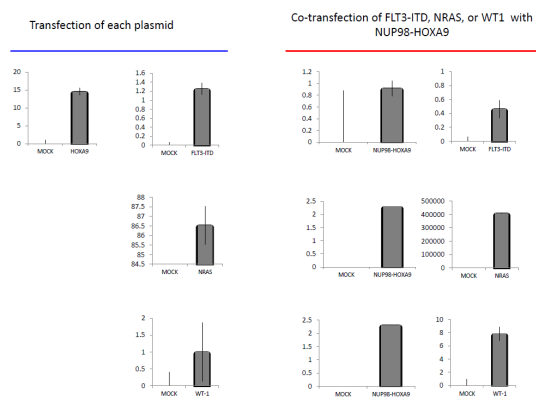
増殖能は、IL3 を添加せずに 5 日間培養し

た。分化能は、G-CSF を添加した培地で 21 日間培養し、May-Giemsa 染色および fluorescence-activated cell sorting (FACS) を用いた表面抗原解析で評価した。アポトーシスは、分化能と同じ培養条件下で FACS を用いて検討した。自己増殖能は、IL3 と stem cell factor を添加したメチルセルロース培地で 12 日間培養して、コロニー数をカウントした。さらに、オートファジーはタモキシフェンを 24 時間暴露して評価した。

4. 研究成果

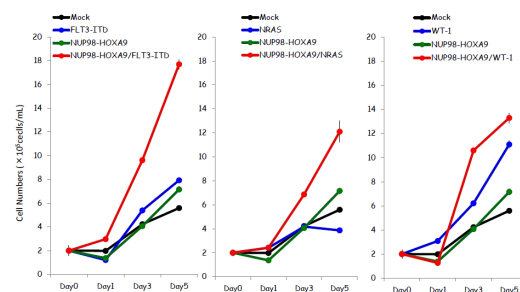
(1) 遺伝子を持続的に高発現するプラスミドの作成および細胞株への挿入

IR/MAR 配列を有するプラスミドに *NHA9*, *FLT3-ITD*, *NRAS*, *WT1* を挿入することに成功した。また、32Dcl3 cell line に 4 つのプラスミド (*NHA9*, *FLT3-ITD*, *NRAS*, *WT1*) および 2 つずつのプラスミド (*NHA9/FLT3-ITD*, *NHA9/NRAS*, *NHA9/WT1*) を遺伝子導入することができ、RT-PCR 法でそれぞれの遺伝子が導入されていることを確認した。



(2) 増殖能

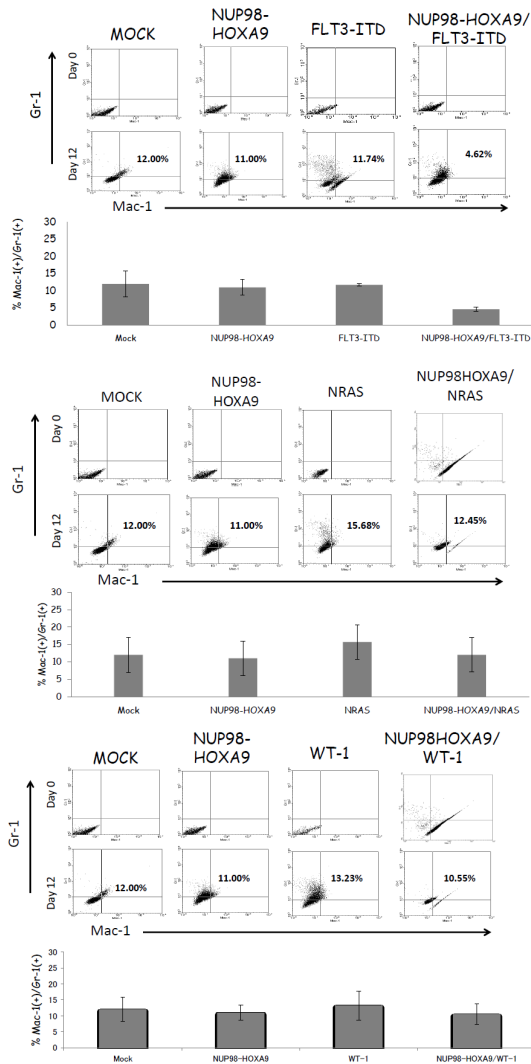
コトランスフェクト (*NHA9/FLT3-ITD*, *NHA9/NRAS*, *NHA9/WT1*) した 32Dcl3 cell line は Mock よりも IL3 非依存的に優位に細胞が増殖した ($p < 0.05$)。それぞれ 4 つの遺伝子を単独に挿入した細胞株は、*NRAS* を除いて Mock よりも細胞の増殖が上昇していたが、優位差はなかった。



(3) 分化能

May-Giemsa 染色では遺伝子導入したすべての細胞で未分化な細胞だけでなく分葉した核を有する細胞が認められた。FACS でマウス骨髄系細胞の分化マーカーである

Gr-1 および Mac1 の発現を検討したところ、NHA9 と FLT3-ITD を同時に遺伝子導入した細胞だけが分化マーカーの発現が低下していた。

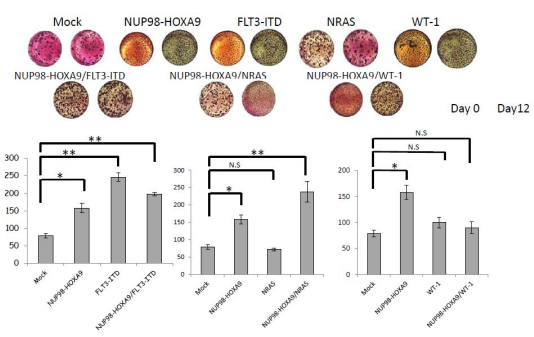


(4) アポトーシス

FACS 解析で AnnexinV 陽性かつ Propidium iodide 陰性の early apoptosis 領域を検討したところ、遺伝子導入したすべての細胞が同様の程度でアポトーシスを起こしていたため、細胞の増殖にアポトーシスは関与しないことが示唆された。

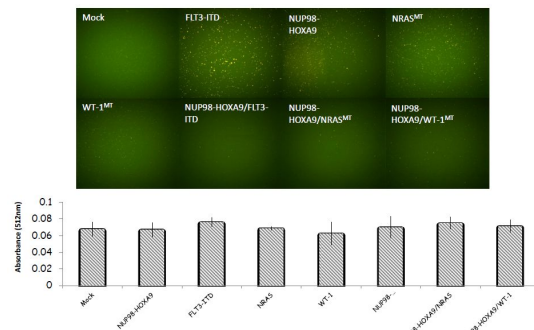
(5) 自己増殖能

細胞増殖に自己複製能が寄与しているかどうか明らかにするために、コロニー形成能を検討した。NHA9 は Mock よりも優位にコロニー形成能が増加していた ($p < 0.05$)。また、FLT3-ITD、NHA9/FLT3-ITD および NHA9/NRAS は Mock よりも非常に優位にコロニー数が多かった ($p < 0.01$)。しかし、NRAS、WT1 および NHA9/WT1 は Mock と変わらなかった。



(6) オートファジー

アポトーシス以外の細胞死のメカニズムであるオートファジーが関与しているかどうかオートファジー誘導物質である Tamoxifen を用いて検討した。オートファジーを起こした細胞を Monodansylcadaverine (MDC) の取り込みで検出したところ、すべての遺伝子を導入した細胞において MDC の取り込みに有意差はなかった。



5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 6 件)

Taketani T, Takita J, Ueyama J, Kanai R, Kumori K, Maruyama R, Hayashi K, Ogawa S, Fukuda S, Yamaguchi S. Ectopic Neuroblastoma in Monozygotic Twins With Different Ages of Onset: Possible Twin-to-Twin Metastasis In Utero With Distinct Genetic Alterations After Birth. *J Pediatr Hematol Oncol.* 36:166-168, 2014 査読有

Moriwaki K, Manabe A, Taketani T, Kikuchi A, Nakahata T, Hayashi Y. Cytogenetics and clinical features of pediatric myelodysplastic syndrome in Japan. *Int J Hematol.* 100:478-484, 2014 査読有

溝田陽子、久守孝司、仲田惣一、田島義証、竹谷健、金井理恵、山口清次、東本和紀、松下隆、滝田順子。家族性発生が疑われる卵巣原発未分化胚細胞性腫瘍の 5 歳女児例。日本小児血液がん学会雑誌 51:540-544, 2014 査読有

Saito A, Taketani T, Kanai R, Kanagawa T, Kumori K, Yamamoto N, Ishikawa N, Takita J, Yamaguchi S. A Case With Sacroccygeal Primitive Myxoid Mesenchymal Tumor of Infancy: A Case Report and Review of the Literature. J Pediatr Hematol Oncol. 35; e280-282, 2013 査読有

齋藤敦郎、竹谷健、金井理恵、金子栄、澄川靖之、三原綾、森田栄伸、山口清次. 皮膚限局型未分化大細胞型リンパ腫の小児例. 日本小児血液がん学会雑誌 50:237-242, 2013 査読有

Ishihara T, Mishima S, Kodama R, Yoshino I, Adachi E, Suyama T, Shibata H, Taketani T, Nagai A. Low-density lipoprotein as a biomarker for the mobilization of hematopoietic stem cells in peripheral blood. Transfus Apher Sci. 49:539-541, 2013 査読有

〔学会発表〕(計 4件)

Takeshi Taketani, Miho Hattori, Mariko Abe, Tomohiro Hirade, Seiji Fukuda, Seiji Yamaguchi. Myeloid Cells having NUP98-HOX Fusion Genes with Simultaneous FLT3, NRAS, or WT1 Mutations Confer Growth Advantage, Inhibits Differentiation/Apoptosis, and Augment Self-Renewal. 56rd American Society of Hematology Annual Meeting, San Francisco (USA), December 6-9, 2014

Seiji Fukuda, Chie Onishi, Tomohiro Hirade, Mariko Abe, Takeshi Taketani, Seiji Yamaguchi. Flt3/ITD Enhances Hematopoietic Cell Migration towards Chemokine CCL2 Independent of Blocking the Negative Feedback Mechanism on Rho-Associated Kinase. 56rd American Society of Hematology Annual Meeting, San Francisco (USA), December 6-9, 2014

竹谷健、服部美保、安部真理子、平出智裕、福田誠司、山口清次. NUP98-HOX 融合遺伝子と協調する遺伝子変異との白血病発症メカニズムの解析. 第 56 回日本小児血液がん学会、岡山コンベンションセンター(岡山市) 2014 年 11 月 28-30 日

福田誠司、平出智裕、安部真理子、竹谷健、山口清次. Flt3/ITD 変異はケモカイン CCL2 に対する造血細胞遊走を亢進する. 第 56 回日本小児血液がん学会、岡山コンベンションセンター(岡山市) 2014 年 11 月 28-30 日

〔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

竹谷 健 (TAKETANI Takeshi)
島根大学・医学部・講師
研究者番号: 30359880

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし