

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790957

研究課題名(和文) ヒト染色体逆位モデルマウスを用いたEVI1高発現による白血病幹細胞維持機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of EVI1-expressing leukemia using inv(3)(q21;q26) model mice

研究代表者

鈴木 未来子(SUZUKI, Mikiko)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80508309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：3q26と3q21との間の染色体転座および逆位は、3q26側に存在するEVI1遺伝子の高発現を誘導し、予後不良の白血病の原因となる。本研究では、二つの大腸菌人工染色体クローンを連結することによって、3q21と3q26との間の染色体逆位を再現する新規の白血病モデルマウス(3q21q26マウス)を樹立した。この3q21q26マウスは24週令以降に白血病を発症した。このマウスでは白血病発症前から骨髄内に異常なCD34強陽性の細胞の蓄積がみられたことから、この細胞が白血病発症に関連するものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Chromosomal translocation and inversion between 3q21 and 3q26 result in misexpression of EVI1 gene on 3q26, which induces leukemogenesis with poor diagnosis. To examine the underlying mechanism of leukemogenesis, we generated a novel mouse model of EVI1-expressing leukemia (3q21q26 mice) harboring a transgene recapitulating the inverted allele by linking two bacterial artificial chromosome (BAC) clones. The 3q21q26 mice suffer from myeloid and lymphoid leukemia after 24 weeks of age. We discovered an abnormal CD34-high cell fraction specifically in the bone marrow of 3q21q26 mice, suggesting that these cells are associated with leukemia.

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：白血病 EVI1 染色体転座 染色体逆位 エンハンサー GATA2 大腸菌人工染色体 トランスジェニックマウス

## 1. 研究開始当初の背景

近年の研究から、白血病細胞はヘテロな集団であり、増殖能の高い通常の白血病細胞のほかに、幹細胞性を有する白血病幹細胞が存在することが分かっている。白血病幹細胞は、正常の造血幹細胞と同様に自己複製能をもち、幹細胞性を保ったまま増幅するとともに、分化して白血病細胞を無限に供給する。そのため、増殖能の高い白血病細胞を標的とした通常の抗がん剤治療では、治療から逃れた白血病幹細胞がわずかにでも残存する限り、再発してしまう。従って、**白血病を根治するためには、白血病幹細胞を排除する方法の開発が望まれる。**

*EVI1* 遺伝子の高発現は、急性骨髄性白血病 (AML) の約 10% にみられ、**化学治療に抵抗性を示す予後不良因子**として注目を浴びている。*EVI1* 遺伝子はジンクフィンガー型の転写因子 *EVI1* をコードしており、造血幹細胞に発現している。*EVI1* 遺伝子欠損マウスではその造血幹細胞が正しく維持できない (Goyama et al., 2008) ことから、***EVI1* は白血病幹細胞の維持にも関与していると予想される。**さらに、*EVI1* 過剰発現実験から、*EVI1* が JNK シグナルを阻害することによってアポトーシスを抑制すること (Kurokawa et al., 2000)、TGF- $\beta$  シグナルの阻害 (Kurokawa et al., 1998; Izutsu et al., 2001) や PTEN の発現抑制 (Yoshimi et al., 2011) によって細胞増殖を活性化することが次第に明らかにされ、*EVI1* のがん遺伝子としての性質がクローズアップされてきた。しかしながら、造血幹細胞や白血病幹細胞は骨髄内の支持環境 (ニッチ) に依存して幹細胞性を保っているため、従来行われてきた培養細胞を用いた試験管内実験や、ウイルスで *EVI1* を過剰発現させた造血幹細胞/前駆細胞を用いたこれらの解析系では、幹細胞の性質を解析することは困難である。そのため、前述のような *EVI1* のがん遺伝子としての機能および *EVI1* を高発現する白血病幹細胞の性質は不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、新規のヒト *EVI1* 高発現白血病モデルマウスを樹立すること、またこのモデルマウスを用いて、***EVI1* を高発現する白血病幹細胞の性質を明らかにする**ことを目的とした。

## 3. 研究の方法

*EVI1* 高発現の原因となる DNA 変異の中で、

唯一同定されているのが、*EVI1* 遺伝子が存在する 3 番染色体長腕 26 領域 (3q26) と、3 番染色体長腕 21 領域 (3q21) との間の転座または逆位であり、*EVI1* 高発現 AML の約 20% にみられる (Morishita et al., 1992)。この転座/逆位では、3q21 側に存在するエンハンサーが 3q26 側の *EVI1* 遺伝子の転写を活性化していると考えられている。しかしながら、そのエンハンサーは同定されていない。

そこで、ヒト 3q26 領域 132 kb および 3q21 領域 64 kb をそれぞれ含むふたつの大腸菌人工染色体 (BAC) クローンを Cre-LoxP システムを用いて結合させることによって、全長 196 kb の逆位アレルを再現する BAC クローンを作製した (図 1)。次に、この BAC クローンを用いて、トランスジェニックマウス (3q21q26 マウス) を樹立した。この 3q21q26 マウスを用いて、白血病のコホート解析、白血病発症前後における血液学的解析および遺伝子発現解析を行った。

また 3q21 領域には、造血幹細胞および前駆細胞で発現している *GATA2* 遺伝子のエンハンサー (*GATA2* 遺伝子遠位造血エンハンサー; G2DHE) が存在する。このことから、申請者は G2DHE が *EVI1* 遺伝子の高発現に関与しているのではないかと考え、3q21q26 マウスと同様の構築から G2DHE のみを欠失したトランスジーンをもつマウス (3q21q26  $\Delta$  G2DHE マウス) を作製した。このマウスにおいても、3q21q26 マウスと同様の解析を行った。

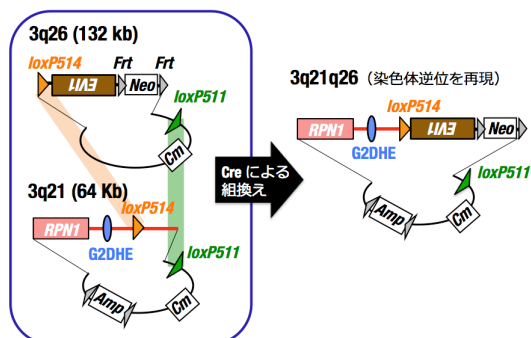


図 1. 3q21q26 マウス構築。3q21 領域と 3q26 領域をそれぞれ含む BAC クローンを Cre-LoxP システムを用いて結合させることによって、染色体逆位アレルを再現する BAC クローンを作製した。

## 4. 研究成果

(1) 3q21q26 マウスでは造血幹細胞および前駆細胞特異的にヒト *EVI1* の発現がみられる

3q21q26 マウスは全身に逆位を再現するトランスジーンをもつにも関わらず、トランスジーン由来のヒト *EVI1* 遺伝子の発現は、造血幹細胞および前駆細胞特異的にみられた。このことから、3q21q26 マウスはヒト白血病

患者に近い *EVII* 遺伝子の発現パターンを示しているといえる。また、3q21 領域には、造血幹細胞および前駆細胞において *EVII* 遺伝子の発現を活性化させるエンハンサーが存在することが示唆された。

## (2) 3q21q26 マウスは白血病を発症する

3q21q26 マウスを長期観察すると、24 週令以降に白血病を発症して死亡することがわかった。白血病細胞をフローサイトメトリーで解析したところ、3q21q26 マウスは 2 種類の白血病を発症していた。ひとつは B リンパ球性白血病であり、3q21q26 マウスのなかでも *EVII* 遺伝子発現量の低い系統がリンパ球性白血病を発症していた。もうひとつは、骨髄性白血病であり、*EVII* 遺伝子発現量の高い系統が発症していた。このことから、*EVII* 遺伝子の発現量と白血病の種類に相関があることが示唆された。また、この 3q21q26 マウスから採取した白血病細胞をヌードマウスに移植すると、そのヌードマウスは 40 日程度でドナーである 3q21q26 マウスと同じ白血病を発症した。このことから、3q21q26 マウスから得られる白血病細胞は、ヌードマウスにおいても自律的に増殖し、白血病の病態を再構築できることが明らかとなった。以上より、3q21q26 マウス (特に *EVII* 遺伝子の発現量が高い系統) はヒト *EVII* 高発現白血病を再現するモデルであることが示された。

## (3) 3q21q26 マウスでは白血病発症前から異常な細胞が蓄積する

3q21q26 マウスにおける白血病の発症機構を明らかにするため、白血病発症前のマウスの骨髄を解析した。3q21q26 マウスでは白血病発症前の 12 週令から骨髄の LSK (Lineage マーカー陰性 c-Kit 陽性 Scal 陽性) 画分内に野生型マウスではみられない CD34 強陽性の細胞が蓄積していた。骨髄性白血病を呈する *EVII* 高発現の 3q21q26 マウス系統においては、週令を追うごとに LSK CD34 強陽性の細胞の蓄積が増加した。さらにこの細胞は、白血病を発症した後も観察された。このことから、この LSK CD34 強陽性細胞が白血病発症に関与しているのではないかと考えられた。

## (4) 3q21q26 マウスにおける白血病発症は G2DHE に依存する

3q21q26 マウスでみられた表現型が、G2DHE に依存しているかを解析するために、3q21q26 マウスと同様の構築から G2DHE のみを欠失させたトランスジーンをもつ 3q21q26 ΔG2DHE マウスでも同様の解析を行った。3q21q26 マウスは 24 週令以降に白血病を発症して死亡するのに対し、3q21q26 ΔG2DHE マウスでは白血病の発症が抑制された。この細胞の骨髄では、3q21q26 マウスでみられた LSK

CD34 強陽性細胞の蓄積が軽減されていた。また、3q21q26 ΔG2DHE マウスでは、3q21q26 マウスと比較して造血幹細胞および前駆細胞における *EVII* 遺伝子の発現が減少していた。このことから、3q21 領域に存在する G2DHE が 3q26 領域に存在する *EVII* 遺伝子の発現を活性化することによって、白血病発症を誘導していることが示された (図 2)。

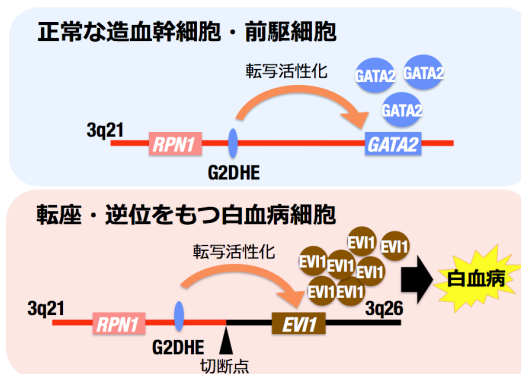


図 2. 転座・逆位を伴う白血病細胞における *EVII* 遺伝子活性化機構。3q21 領域と 3q26 領域との間の転座・逆位によって G2DHE が *EVII* 遺伝子に近接し、その発現を活性化させる。

## 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 7 件)

1. Yamazaki H\*, Suzuki M\*, Otsuki A, Shimizu R, Bresnick EH, Engel JD, and Yamamoto M. A remote *GATA2* hematopoietic enhancer drives leukemogenesis in inv(3)(q21;q26) by activating *EVII* expression. *Cancer Cell* **25**, 415-427 (2014) 査読有 \*co-first authors  
DOI: 10.1016/j.ccr.2014.02.008.
2. Takai J, Moriguchi T, Suzuki M, Yu L, Ohneda K, and Yamamoto M. The Gata1 5' region harbors distinct cis-regulatory modules that direct gene activation in erythroid cells and gene inactivation in HSCs. *Blood* **122**, 3450-3460 (2013) 査読有  
DOI: 10.1182/blood-2013-01-476911.
3. Suzuki M, Kobayashi-Osaki M, Tsutsumi S, Pan X, Ohmori S, Takai J, Moriguchi T, Ohneda O, Ohneda K, Shimizu R, Kanki Y, Kodama T, Aburatani H, and Yamamoto M. GATA factor switching from *GATA2* to *GATA1* contributes to erythroid differentiation. *Genes Cells* **18**, 921-933 (2013) 査読有  
DOI: 10.1111/gtc.12086.

4. Mukai HY, **Suzuki M**, Nagano M, Ohmori S, Otsuki A, Tsuchida K, Moriguchi T, Ohneda K, Shimizu R, Ohneda O, and Yamamoto M. Establishment of erythroleukemic GAK14 cells and characterization of GATA1 N-terminal domain. *Genes Cells* **18**, 886-898 (2013) 査読有  
DOI: 10.1111/gtc.12084.
5. Toki T, Kanazaki R, Kobayashi E, Kaneko H, **Suzuki M**, Wang R, Terui K, Kanegane H, Maeda M, Endo M, Mizuochi T, Adachi S, Hayashi Y, Yamamoto M, Shimizu R, and Ito E. Naturally occurring oncogenic GATA1 mutants with internal deletions in transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome. *Blood* **121**, 3181-3184 (2013) 査読有  
DOI: 10.1182/blood-2012-01-405746.
6. **Suzuki M**, Yamazaki H, Mukai HY, Motohashi H, Shi L, Tanabe O, Engel JD, and Yamamoto M. Hereditary persistence of fetal hemoglobin is associated with disruption of the *HBS1L-MYB* locus. *Mol Cell Biol* **33**, 1687-1695 (2013) 査読有  
DOI: 10.1128/MCB.01617-12.
7. Ohmori S, Takai J, Ishijima Y, **Suzuki M**, Moriguchi T, Philipsen S, Yamamoto M, and Ohneda K. The regulation of GATA factor expression is distinct between erythroid and mast cell lineages. *Mol Cell Biol* **32**, 4742-4755 (2012) 査読有  
DOI: 10.1128/MCB.00718-12.

[学会発表] (計 5 件)

1. **鈴木未来子**、山寄博未、大槻晃史、清水律子、Emery H. Bresnick、James Douglas Engel、山本雅之。染色体転座・逆位による *EVI1* 発現白血病の新規マウスモデル樹立と *EVI1* 遺伝子発現制御解析。平成 25 年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ 個体レベルからみた炎症とがん、琵琶湖ホテル、滋賀、2014 年 2 月 17-18 日
2. **鈴木未来子**、山寄博未、大槻晃史、清水律子、Emery H. Bresnick、James Douglas Engel、山本雅之。GATA2 遺伝子エンハンサーが inv(3)(q21;q26)において *EVI1* 遺伝子を活性化し白血病を誘発する。第 18 回造血器腫瘍研究会、がん研究会がん研究所、東京、2014 年 2 月 7 日
3. **鈴木未来子**、山寄博未、加藤幸一郎、清水律子、James Douglas Engel、山本雅之。白血病逆位モデルマウスを用いた *EVI1* 高

発現白血病発症機構の解析。第 17 回造血器腫瘍研究会、宮崎、2013 年 2 月 1-2 日

4. **鈴木未来子**、山寄博未、加藤幸一郎、清水律子、James Douglas Engel、山本雅之。3q21q26 白血病染色体転座・逆位モデルマウスを用いた *EVI1* 遺伝子転写活性化機構の解析。転写研究会 若手ワークショップ@鬼怒川、鬼怒川、2013 年 1 月 24-26 日
5. **鈴木未来子**、山寄博未、清水律子、James Douglas Engel、山本雅之。大腸菌人工染色体 (BAC) を用いた 3q21q26 染色体転座・逆位による *EVI1* 遺伝子高発現白血病モデルマウスの樹立。日本生化学会東北支部第 78 回例会・シンポジウム、山形、2012 年 5 月 26 日

[その他]

ホームページ等

研究内容紹介

<http://www.dmbc.med.tohoku.ac.jp/cgi-bin/project/view.cgi>

プレスリリース (2014 年 4 月 4 日)

「染色体転座・逆位による白血病発症機構を解明」

<http://www.med.tohoku.ac.jp/news/2441.html>

河北新報 (2014 年 4 月 4 日)

「白血病発症、DNA 領域の一部が鍵に 東北大などが解明」

[http://www.kahoku.co.jp/tohokunews/2014/04/20140404\\_13006.html](http://www.kahoku.co.jp/tohokunews/2014/04/20140404_13006.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 未来子 (SUZUKI MIKIKO)

東北大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：80508309