

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790971

研究課題名(和文)ヌクレオフォスミン関連融合遺伝子からアプローチする新規白血病化機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of leukemogenesis through the NPM fusion gene

研究代表者

河原 真大(KAWAHARA, Masahiro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80617449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では急性骨髄性白血病の主な原因遺伝子の一つNPMが関連する融合遺伝子「NPM-MLF1」による白血病発症メカニズムに焦点をあてて解析を行った。NPM-MLF1融合遺伝子および野生型MLF1をマウス造血幹細胞・前駆細胞に強発現することで、一時的にコロニー形成能力が増強すること、Kit陽性の未熟細胞が増加すること、MLF1は造血幹細胞分画に発現が高く分化に伴って発現低下することを明らかにし、NPM-MLF1および野生型MLF1の強発現は、造血分化を傷害することで白血病発症に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed a mechanism for leukemogenesis through the NPM-MLF1 fusion gene and overexpression of wild-type MLF1. We found that clonogenic capacity is transiently enhanced and Kit-positive immature hematopoietic cells are increased by transduction of NPM-MLF1 and MLF1 into murine hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs), and MLF1 expression level is high in hematopoietic stem cells but decreases as differentiation, indicating that NPM-MLF1 and overexpression of MLF1 might contribute to leukemogenesis through dysregulation of normal differentiation of HSPCs.

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 造血幹細胞 NPM1 MLF1

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病 (Acute myeloid leukemia; AML) は、昨今の強力化学療法や同種幹細胞移植の進歩に伴って、一部の患者においては治癒可能な疾患となってきているものの、これらの治療はかなり高いリスク (治療関連死亡率は 20~30%) を有している。従ってその適応は若年患者や状態の良い患者に限られ、高齢患者や合併症を有する患者においては依然として有効な治療法がないのが現状である。

最近の遺伝子網羅的解析の結果から、Nucleophosmin (NPM) の C 末端変異 (NPMc) は、AML 症例のおよそ 30~40% と非常に高頻度に認められる遺伝子異常で、増殖亢進に関わる FLT3-ITD 変異と高率に併存することがわかってきた。これは、NPMc が AML の新規治療ターゲットとなりうる可能性を示しているが、そのためには、NPMc の細胞生物学的特徴を理解することが必要である。ところが、NPMc に関する近年の報告では、がん遺伝子として働くと記載されたり、逆にがん抑制遺伝子であると主張されたりで、評価が全く定まっていない。NPMc ノックインマウスモデルを用いた最近の報告によると、約 1/3 のマウスが遅発性の AML を引き起こすので、NPMc はがん遺伝子であるが、その力は比較的弱いものと推測される。また、より早期の白血病発症には、増殖亢進に関わる他の遺伝子の発現異常の付加が必要であるので、NPMc はがん遺伝子というよりは分化異常に関わるとも考えられる。いずれにせよ、NPMc の AML 発症における役割はコンディショナルノックインモデルでも不明な点が多く残されている。

我々は実際に臨床の現場で経験した t(3;5)(q25;q34) 染色体異常を有する de novo 難治性 AML 患者から、NPM/MLF1 融合遺伝子をクローニングした。この融合遺伝子は C 末を欠いた NPM (ほぼ NPMc に等しい) と、最初の 16 アミノ酸のみ欠いたほぼ全長の

MLF1 (myeloid leukemia factor 1) との融合タンパクをコードするので、NPM/MLF1 融合遺伝子の発現は、NPMc 病態に MLF1 発現異常が付加された状況を作り出している可能性がある。つまり、NPM/MLF1 を解析することで、NPMc 変異による白血病発症機構の一端を明らかにできる可能性があると同時に、MLF1 の発現異常が白血病発症に関与する可能性を助起する。しかし、MLF1 の造血における役割も不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、(1) NPM/MLF1 融合遺伝子の AML 発症における役割、(2) 融合パートナー MLF1 の造血における役割、を明らかにすることを主たる目的とした。

3. 研究の方法

(1) NPM/MLF1 融合遺伝子の AML 発症における役割

NPM1/MLF1 融合遺伝子によって AML が誘導されるかを検討するために、レンチウイルスシステム (IRES-GFP を搭載しており GFP にて追跡が可能なシステム) を用いて融合遺伝子をマウス造血幹細胞・前駆細胞に導入した後、コロニーアッセイによってコロニー形成能力を評価し、フローサイトメトリーによる細胞表面マーカー解析によって分化への影響を評価した。さらに、コロニー植え次ぎ法でコロニー形成能力が増強するかを検討し、同系マウスへ移植することで AML 発症の有無を解析した。

(2) 融合パートナー MLF1 の造血における役割

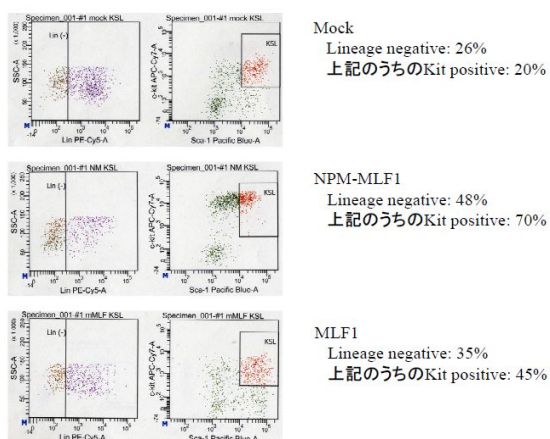
まず、MLF1 の造血幹細胞・前駆細胞での発現レベルを確認した。次に、レンチウイルスシステムを用いて MLF1 をマウス造血幹細胞・前駆細胞に導入した後、コロニーアッセイを行い、コロニー形成能力を評価すると同時に、コロニーの種類の違いやフローサイト

メトリーによる細胞表面マーカー解析から造血分化への影響を評価した。さらに同系マウスへ移植することで、MLF1 の強発現が造血機能に及ぼす影響を解析した。

4 . 研究成果

(1) NPM/MLF1 融合遺伝子の AML 発症における役割

コロニーアッセイを行ったところ、予想に反して、コロニー形成数はコントロールに比して減少した。しかしコロニー植え次ぎ法では、短期的にはコロニーの形成数がコントロールより明らかに多くなったが、長期的なコロニー形成能力の増強は認めなかった。フローサイトメトリーによる細胞表面マーカー解析で、成熟マーカー陽性細胞の割合がコントロールに比して少なく、幼弱マーカーKit 陽性細胞の割合が明らかに増加した。これらの結果は、NPM-MLF1 融合遺伝子によって、不完全ながらコロニー形成能力が増強すること、造血分化が傷害されることを示している。

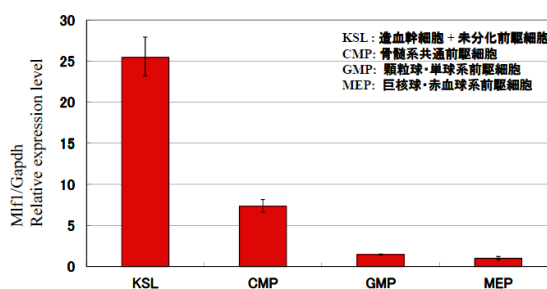


次に、同系マウスへの移植を行ったが、融合遺伝子が導入された成熟血液細胞(GFP 陽性で追跡)は、移植マウス末梢血中に認められなかった。移植後 24 時間での骨髄中の GFP 陽性細胞数はコントロールと同等であったことから、NPM-MLF1 融合遺伝子が、造血組織への遊走を妨げている可能性は否定的であった。むしろ、造血幹細胞の維持もしくは造血分化に関与している可能性が考えられる。

これらの問題をよりクリアーにするために、現在トランスジェニックマウスの作製を試みている。

(2) 融合パートナーMLF1 の造血における役割

まず、正常マウスの骨髄から、造血幹細胞・未熟前駆細胞分画や分化方向が拘束された骨髄系前駆細胞をソート分離し、MLF1 の発現レベルを確認したところ、造血幹細胞・前駆細胞分画で非常に高く発現していることを確認した。



次に MLF1 をレンチウイルスでマウス造血幹細胞・前駆細胞に導入後、コロニーアッセイを行ったところ、初回の捲込みではコロニー形成数はコントロールと同等であった。しかしコロニー植え次ぎ法では、NPM-MLF1 融合遺伝子の場合と同様にコロニー形成が短期的に維持された。フローサイトメトリーによる細胞表面マーカー解析では、NPM-MLF1 融合遺伝子ほどではないものの、成熟マーカー陽性細胞の割合がコントロールに比して少なく、幼弱マーカーKit 陽性細胞の割合が増加した。これらの結果は、MLF1 が造血幹細胞・未熟前駆細胞レベルを維持するために何らかの役割を果たしていることを示唆しており、NPM-MLF1 による造血分化障害の一翼を担っている可能性が高いと考えられた。

次に、同系マウスへの移植を行ったが、融合遺伝子が導入された成熟血液細胞(GFP 陽性細胞)は、移植マウス末梢血中に認められない一方で、移植後 24 時間での骨髄中の GFP 陽性細胞数はコントロールと同等であり、表現系は NPM-MLF1 の場合に非常に近かった。

すなわち、NPM-MLF1 の機能は、野生型 MLF1 の発現上昇が担う部分が多いことが示唆された。現在トランスジェニックマウスの作製を試み、NPM-MLF1 との比較を行う予定にしている。

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 3 件)

Nagai Y, Kawahara M, Sugino N, Shimazu Y, Hishizawa M, Yamashita K, Kadowaki N, Takaori-Kondo A: A case of minor BCR-ABL1 positive acute lymphoblastic leukemia following essential thrombocythemia and originating from a clone distinct from that harboring the JAK2-V617F mutation. *Experimental Hematology & Oncology*: 査読有 2014:3:6

DOI:10.1186/2162-3619-3-6.

Yoshida Y, Katsurada T, Oguma S, Nakabo Y, Yoshinaga N, Kawahara M, Kawabata H: Absent or extremely low neutrophil alkaline phosphatase activity levels in patients with myelodysplastic syndromes. *Intern Med*: 査読有:52:2013:479-482

DOI:http://dx.doi.org/10.2169/internalmedicine.52.9114

Kawahara M, Pandolfi A, Bartholdy B, Barreyro L, Will B, Roth M, Okoye UC, Todorova T, Figueroa ME, Melnick A, Mitsiades CS, Steidl U: H2.0-like homeobox (HLX) regulates early hematopoiesis and promotes acute myeloid leukemia.

Cancer Cell: 査読有:22:2012:194-208

DOI:10.1016/j.ccr.2012.06.027.

[学会発表] (計 10 件)

Nagai Y, Kawahara M, Hishizawa M,

Sugino N, Shimazu Y, Takaori-Kondo A: A Rare Population of Stem Cell Memory T Cells Is an Apex of the Hierarchy of Adult T-Cell Leukemia. The 55th ASH Annual Meeting and Exposition, December 6-9,2013, New Orleans, USA.

Sugino N, Kawahara M, Suzuki T, Nagai Y, Shimazu Y, Hishizawa M, Takaori-Kondo A: KDM1A is involved in the myelomonocytic/erythroid differentiation and is a promising target of AML.

第 75 回日本血液学会学術集会, 2013 年 10 月 11-13 日, 札幌.

Nagai Y, Kawahara M, Hishizawa M, Sugino N, Shimazu Y, Takaori-Kondo A: Challenge to identify ATL-initiating cells.

第 75 回日本血液学会学術集会, 2013 年 10 月 11-13 日, 札幌.

Kawase Y, Kondo T, Maeda T, Kawahara M, Kitawaki T, Kitano T, Yamashita K, Kawabata H, Takaori-Kondo A: Retrospective analysis of allogeneic HSCT for MDS:A single institution experience.

第 75 回日本血液学会学術集会, 2013 年 10 月 11-13 日, 札幌.

Chonabayashi K, Kawahara M, Watanabe A, Okita K, Nishizawa M, Kadowaki N, Takaori-Kondo A, Yamanaka S, Yoshida Y: Search for pathogenesis of acquired myelodysplastic syndromes using reprogramming technology.

第 75 回日本血液学会学術集会, 2013 年 10 月 11-13 日, 札幌.

Nakabo Y, Katsurada Y, Kawabata H, Kondo T, Kawahara M, Kitawaki T, Takaori-Kondo A, Yoshida Y: A case of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm with MLL-ENL fusion.

第 75 回日本血液学会学術集会, 2013 年 10 月

11-13日, 札幌.

Kawata T, Kawase Y, Hishizawa M, Kawahara M, Kondo T, Kitano T, Kadowaki N, Ohmori K, Takaori-Kondo A: Successful allo-SCT following mogamulizumab for a patient with refractory ATL.

第75回日本血液学会学術集会, 2013年10月11-13日, 札幌.

Nagai Y, Kawahara M, Hishizawa M, Sugino N, Shimazu Y, Takaori-Kondo A: Clonal and hierarchical expansion of adult T-cell leukemia cells in stem cell memory T-cell subset.

第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月3-5日, 横浜.

Sugino N, Kawahara M, Suzuki T, Nagai Y, Shimazu Y, Hishizawa M, Takaori-Kondo A: Inhibition of KDM1A suppresses the growth of acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes cells through inducing differentiation.

第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月3-5日, 横浜.

Fujita H, Kondou T, Sakamoto S, Kawahara M, Yamashita K, Kawabata H, Kadowaki N, Takaori-Kondo A.: Retrospective analysis of allogeneic SCT for therapy-related MDS/AML: A single center experience.

第74回日本血液学会学術集会, 2012年10月19-21日, 京都.

〔図書〕(計 1件)

河原真大, 北隆館, BIO Clinica 多遺伝子疾患, 「急性骨髄性白血病における疾患遺伝子研究」の項. 2012年 VOL.27 No.11 Cot. 2012 (通巻358号) pp25-29

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: リシン構造を有する LSD1 選択的阻害薬

発明者: 河原真大、他7名

権利者: 国立大学法人京都大学、他4機関

種類: 特許

番号: 国際特許番号 PCT/JP2013/82011

出願年月日: 2013年11月28日

国内外の別: 外国

取得状況(計 0件)

〔その他〕

京都大学医学部附属病院血液腫瘍内科ホームページ

<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~hemonc/research/leukemia.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河原 真大 (KAWAHARA MASAHIRO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号: 80617449

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし