

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461597

研究課題名(和文) MLL転座型白血病の白血病幹細胞の同定と治療応用に向けての基礎研究

研究課題名(英文) Identification of targetable leukemogenic pathway and leukemic stem cells in MLL fusion-positive leukemia

研究代表者

江口 真理子 (EGUCHI, MARIKO)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40420781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：MLL転座型白血病に対する新規治療法への基礎データを得るための実験を行った。(1)白血病細胞を免疫不全(NOG)マウスに移植し、早期に骨髄に生着する白血病細胞の遺伝子発現パターンを検討した結果、造血幹細胞と類似の発現パターンを示した。(2)乳児白血病検体及び細胞株を用いて腫瘍化におけるMLL融合蛋白の役割を検討した。MLL融合蛋白存在下で癌抑制遺伝子miRNA let7bとp16INK4Aの発現がDNAメチル化により低下し、癌遺伝子HMGA2の発現が増加した。(3)脱メチル化剤とHMGA2阻害剤によりMLL転座型白血病細胞の増殖が抑制され、新規分子標的療法としての可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：MLL gene rearrangement in infant acute lymphoblastic leukemia and secondary leukemia represent a hallmark of poor prognosis. To obtain necessary information to exploit novel targeting therapy, (1) we examined the cell type that first engraft in the bone marrow and initiate subsequent leukemic cell growth in NOG mice. As a result, the initiating cells expressed gene expression pattern similar to hematopoietic stem cells with abnormal expression of some genes. (2) The role MLL fusion protein on leukemic cell growth and survival was examined in infant ALL samples and in leukemic cell lines. As a result MLL protein suppressed miRNA let-7b and p16 by DNA hypermethylation, whereas it increased the expression of oncogene HMGA2. (3) DNA demethylating reagent 5-azacytidine and HMGA2 inhibitor suppressed the growth of leukemic cells with MLL gene rearrangement, which suggested that combination of these reagents may be one of the candidate for targeting therapy toward MLL rearranged leukemia.

研究分野：小児科学

キーワード：小児血液学 白血病 融合遺伝子

### 1. 研究開始当初の背景

染色体 11q23 に位置する *MLL* 遺伝子は 40 以上の転座相手と融合遺伝子を形成し、乳児白血病や TopoII 阻害剤使用後の治療関連白血病に高率に認められ、いずれも極めて予後不良である。

申請者らは全国規模の乳児白血病共同研究において、FISH 法による *MLL* 遺伝子再構成の診断法を開発し、早期の骨髄移植を含む強力な治療で *MLL* 再構成を有する乳児白血病の長期予後を著明に改善し得た (Blood 98:3589,2001; Br J Haematol 118:999,2002, Blood 104:3527,2004)。しかし長期生存率はなお 50%未満で、治療後も晩期障害に苦しむ例が多く、患者の生命予後および Quality of Life の改善のためには新たな分子標的療法が必要である。

*MLL* 融合遺伝子は、転座相手にかかわらず、野生型 *MLL* のアミノ末端側の AT hook とメチル化転移酵素ホモロジー(MT)領域という 2 つの DNA 結合領域が転座相手と結合する形をとる。このことから、*MLL* 融合蛋白は基本的に標的遺伝子の転写制御(おそらく野生型 *MLL* の標的遺伝子の発現攪乱)により腫瘍化に導くと推測される。

*MLL-AF4* 融合遺伝子陽性の乳児白血病では多くの場合、*MLL-AF4* は胎生期に生じる。まず *MLL-AF4* 融合遺伝子が胎児の造血細胞で生じ、*MLL-AF4* による細胞生存・維持能の亢進により前白血病細胞が形成される。その後 *FLT3* 遺伝子変異等の付加異常が生じて細胞に増殖活性が付与され白血病幹細胞が形成されると考えられる。

*MLL* 融合遺伝子を有する白血病の効果的な治療法(分子標的療法)の開発のためには白血病化における転写因子としての *MLL* 融合蛋白の機能を明確にする必要があり、*MLL* 融合蛋白の標的遺伝子の同定とその攪乱のメカニズムの検討が必要である。また治療標的とすべき白血病幹細胞あるいは前白血病細胞の特徴を明らかにすることは、白血病細胞の根絶を目指す治療の実現には必須である。

### 2. 研究の目的

白血病の根源である白血病幹細胞および前白血病細胞を標的とした分子標的療法など、新たな治療戦略の開発に必要な基礎データを得ることを目的とする。具体的には、(1) *MLL* 転座型白血病の前白血病細胞、白血病幹細胞の特徴(表面抗原、遺伝子発現など)と局在の解明、(2) 前白血病細胞および白血病幹細胞の生存・維持における *MLL* 融合蛋白の役割の解明を試み、治療標的となりうる分子、シグナル経路の同定を試みる。(3) 分子標的療法の候補となり得る薬剤を検索する。

### 3. 研究の方法

(1) *MLL* 融合遺伝子を有する白血病細胞株を用いた白血病幹細胞の同定

KOCL69 などの *MLL* 融合遺伝子陽性白血

病細胞株を EGFP でマーキング後、免疫不全マウスに移植し、その骨髄内での白血病細胞の局在を免疫染色や発現アレイ、フローサイトメトリー等で検討する。

(2) *MLL* 融合遺伝子を発現するマウス ES 細胞の作製

未分化な状態から造血細胞、間葉系細胞へ分化する過程で *MLL-AF4* 融合遺伝子を恒常的に発現するマウス ES 細胞を作製するために、各分化段階での発現が安定した Chicken-beta-actin (CAG) プロモーター下に *MLL-AF4* を導入した発現ベクターを作製する。

(3) 免疫不全マウスへの移植実験による前白血病細胞・白血病幹細胞の同定と解析

*MLL-AF4* 融合遺伝子発現 ES 細胞の *in vivo* での骨髄内局在や増殖能を検討するために、NOD/SCID や NOG などの免疫不全マウスに ES 細胞より分化させた Tie2 陽性細胞を経尾静脈的ないしは骨髄内注入により移植する。*in vivo* での解析を容易にするために、ES 細胞を EGFP でマーキングした後にマウスへ移植する。移植後 4-8 週間後にマウス骨髄内での局在および細胞分化の状態を免疫染色、骨のホールマウント染色やフローサイトメトリー等で確認する。

(4) 白血病幹細胞の生存・維持に必要な因子の同定と、その機能阻害による白血病細胞増殖抑制の試み

未分化造血幹細胞を含む Tie2 陽性細胞分画において、*MLL-AF4* により発現が影響を受ける標的遺伝子を網羅的な発現アレイを用いて解析する。同定された標的遺伝子についてその白血病化における意義を検討するとともに、分子標的薬のターゲットとしての可能性についても検討する。これら標的遺伝子に対する siRNA や中和抗体などを用いて白血病幹細胞の生存・増殖を抑制できるかどうかを免疫不全マウスへの生着阻害などを指標として検討する。

### 4. 研究成果

(1) *MLL* 融合遺伝子を有する白血病細胞株を用いた白血病幹細胞の同定

*MLL* 融合遺伝子を有する白血病細胞株 (KOCL45、KOCL69 など) の細胞集団中に存在が予想される白血病幹細胞の同定を目的として、白血病細胞株を EGFP でマーキング後、免疫不全マウス (NOG マウス) に移植し、白血病モデルマウスの作製を試みた。細胞株により異なるが、免疫不全マウスに移植後 1~2 ヶ月でマウスは白血病を発症した。骨髄内では移植した白血病細胞は移植早期には骨端部に骨稜に沿って存在する傾向があり、正常の造血幹細胞に類似していると思われた。この骨髄内で骨周辺に付着した白血病幹細胞分画を含むと思われる細胞群を Collagenase 処理により回収し、遺伝子発現のパターンを網羅的な発現アレイを用いて解析した。その結果、白血病細胞を移植後免疫不全マウスの

骨髄に早期に生着する白血病細胞群は *TAL1* 等の未分化造血細胞で発現する複数の遺伝子の発現が高いことが示され、白血病幹細胞としての可能性が示唆された。また一部の細胞表面抗原の発現が有意に上昇しており、骨髄生着における関与が示唆された。現在これらの細胞表面抗原の骨髄生着における意義づけを行うとともに、白血病細胞の維持・増殖に及ぼす影響を検討中である。

(2) *MLL* 融合遺伝子を発現するマウス ES 細胞の作製

CAG プロモーター下に恒常的に *MLL-AF4* を発現するマウス ES 細胞を作製した。このマウス ES 細胞では、*MLL-AF4* 融合遺伝子の発現は未分化な状態から造血細胞への分化まで、各分化段階で恒常的に発現していた。また ES 細胞は中胚葉細胞、造血細胞および間葉系細胞に問題なく分化する能力を保持しており、*MLL-AF4* は未分化 ES 細胞の未分化能の維持および増殖能に影響を与えなかった。しかしながら、*MLL-AF4* を発現する未分化 ES 細胞は *Fik1* 陽性細胞への分化が阻害されており、*Fik1* 陽性細胞より派生する造血細胞への分化も抑制されていた。未分化な造血幹細胞を含む細胞分画である *Tie2* 陽性かつ *c-kit* 陽性の分画も *MLL-AF4* を発現する細胞では減少していた。造血細胞への分化が抑制されている代わりに、*Pdgfra* 陽性の間葉系細胞の方向へ分化が進む傾向が認められた。しかし *MLL-AF4* 発現マウス ES 細胞を collagen I 等でコートした培養ディッシュで培養すると 2-3 週間程度で CD45 陽性の造血細胞が少数ながら出現することから、*MLL-AF4* 発現 ES 細胞の造血細胞への分化能は完全に喪失しているのではなく、適切な条件下では造血細胞へ分化する能力を有していることが示された。

(3) 免疫不全マウスへの移植実験による前白血病細胞・白血病幹細胞の同定と解析

CAG プロモーター下に *MLL-AF4* を恒常的に発現するマウス ES 細胞を未分化造血細胞を含む *Tie2* 陽性細胞へ分化させた後、免疫不全マウスにこの *MLL-AF4* 発現 ES 由来造血前駆細胞を移植し、白血病を発症するかどうか検討を行ったが、有意な白血病の発症は認められなかった。*MLL-AF4* 発現 ES 細胞はマウス体内で優位にリンパ球を含む造血細胞に分化することはなく、*MLL-AF4* を発現する *Tie2* 陽性細胞はむしろ造血細胞への分化が抑制されていると思われた。現在レトロウイルス挿入変異により付加異常を導入し、細胞増殖への影響や移植マウスでの白血病の発症の有無を検討中である。

また *MLL-AF4* 発現 ES 細胞およびコントロール (EGFP 発現) ES 細胞から *Tie2* 陽性細胞を FACS にて分離し、発現アレイにて遺伝子発現の違いを解析し、この細胞分画における *MLL-AF4* の標的遺伝子を検索した。*MLL-AF4* 発現細胞では多数の遺伝子の発現上昇が認められたが、がん遺伝子として報告

されている *HMGA2* 遺伝子もその一つであった。白血病検体の解析により *HMGA2* 遺伝子は、*MLL-AF4* 陽性の乳児白血病症例においても高発現が認められており、白血病化に關与している可能性が考えられた。

(4) 白血病幹細胞の生存・維持に必要な因子の同定と、その機能阻害による白血病細胞増殖抑制の試み

*MLL-AF4* 融合遺伝子を有する急性リンパ性白血病 (ALL) 症例と細胞株の解析により、*MLL-AF4* 陽性 ALL ではがん遺伝子である *HMGA2* 遺伝子の発現上昇とともに、その抑制因子である microRNA *let-7b* の発現低下が認められた。この *let-7b* の発現低下は DNA メチル化が関与しており、脱メチル化剤である 5-Azacitidine 処理により *let-7b* の発現が回復するとともに、*MLL-AF4* 陽性 ALL 細胞株の増殖は抑制された。また *HMGA2* の阻害剤でも同様に *MLL-AF4* 陽性 ALL 細胞株の増殖は抑制された。*HMGA2* は細胞周期・細胞老化の制御因子である *p16INK4A* 遺伝子の発現を抑制するが、白血病細胞を 5-Azacitidine や *HMGA2* 阻害剤で処理することにより *HMGA2* の標的である *p16INK4A* 遺伝子の発現上昇が認められた。細胞増殖・老化を制御する *let-7b*-*HMGA2*-*p16INK4A* 経路は *MLL-AF4* 陽性白血病の維持・増殖に重要であり、分子標的薬のターゲットとなり得ると考えられた。

## 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 14 件)

1. Morimoto A, Shioda Y, Imamura T, Ishii E (15 名, 10 番目). Intensified and prolonged therapy comprising cytarabine, vincristine and prednisolone improves outcome in patients with multisystem Langerhans cell histiocytosis: results of the Japan Langerhans Cell Histiocytosis Study Group-02 Protocol Study. *Int J Hematol* 2016 年 (in press). 査読有り DOI: 10.1007/s12185-016-1993-3
2. Kurosawa H, Tanizawa A, Tono C, Ishii E (18 名, 17 番目). Leukostasis in Children and Adolescents with Chronic Myeloid Leukemia: Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Pediatr Blood Cancer* 2016 年; 63 巻: 406-411 頁. 査読有り DOI: 10.1002/pbc.25803
3. Imamura T, Kiyokawa N, Kato M, Ishii E (32 名, 31 番目). Characterization of pediatric Philadelphia-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with kinase fusions in Japan. *Blood Cancer J* 2016 年; 6 巻: e419 頁. 査読有り DOI: 10.1038/bcj.2016.28

4. 江口真理子, 石前峰斉, 石井榮一. 小児白血病研究の現状と展望 白血病幹細胞を中心として. 臨床血液 2015 年; 56 巻: 1871-1881 頁. 査読有り DOI: 10.11406/rinketsu.56.1871
5. Wu Z, Eguchi-Ishimae M, Ishii E, Eguchi M (10 名, 2, 9, 10 番目). HMGA2 as a potential molecular target in KMT2A-AFF1-positive infant acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol 2015 年; 171 巻: 818-829 頁. 査読有り DOI:10.1111/bjh.13763
6. Koh K, Tomizawa D, Ishii E (19 名, 19 番目). Early use of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for infants with MLL gene- rearrangement-positive acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 2015 年; 29 巻: 290-296 頁. 査読有り DOI: 10.1038/leu.2014.172
7. Hatanaka M, Miyamura T, Koh K, Ishii E (10 名, 9 番目). Respiratory syncytial virus infection in infants with acute leukemia: a retrospective survey of the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. Int J Hematol 2015 年; 102 巻: 697-701 頁. 査読有り DOI:10.1007/s12185-015-1890-1
8. Tokuda K, Eguchi-Ishimae M, Ishii E, Eguchi M (7 名, 2, 6, 7 番目). Lineage-dependent skewing of loss of heterozygosity (LOH) of KRAS gene in a case of juvenile myelomonocytic leukemia. European journal of haematology 2015 年; 94 巻: 177-181 頁. 査読有り DOI: 10.1111/ejh.12355
9. Gao W, Higaki T, Eguchi-Ishimae M, Ishii E, Eguchi M (11 名, 3, 10, 11 番目). DGCR6 at the proximal part of the DiGeorge critical region is involved in conotruncal heart defects. Human Genome Variation 2015 年; 2 巻: 15004 頁. 査読有り DOI:10.1038/hgv.2015.4
10. Aoki Y, Watanabe T, Saito Y, Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Ishii E (20 名, 8, 9, 10 番目). Identification of CD34+ and CD34-leukemia-initiating cells in MLL-rearranged human acute lymphoblastic leukemia. Blood 2015 年; 125 巻: 967-980 頁. 査読有り DOI: 10.1182/blood-2014-03-563304
11. Honda S, Arakawa S, Nishida Y, Yamaguchi H, Ishii E, Shimizu S. Ulk1-mediated Atg5-independent macroautophagy mediates elimination of mitochondria from embryonic reticulocytes. Nat Commun 2014 年; 5 巻: 4004 頁, 査読有り DOI:10.1038/ncomms5004
12. 江口真理子, 石前峰斉. TEL-AML1 型小児急性リンパ性白血病の分子遺伝学的機序. 血液内科 2014 年; 69 巻: 644-651 頁, 査読無し
13. Tokuda K, Eguchi-Ishimae M, Yagi C, Ishii E, Eguchi M (9 名, 2, 8, 9 番目). CLTC-ALK fusion as a primary event in congenital blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. Genes, chromosomes & cancer 2014; 53: 78-89. 査読有り DOI: 10.1002/gcc.22119
14. Nagai K, Ochi F, Terui K, Ishii E (15 名, 15 番目). Clinical characteristics and outcomes of chediak-Higashi syndrome: a nationwide survey of Japan. Pediatr Blood Cancer 2013; 60: 1582-1586. 査読有り DOI:10.1002/psc.24637
- 〔学会発表〕(計 21 件)
1. 石井榮一、日本における HLH-2004 プロトコールによる血球貪食性リンパ組織球症の治療成績、第 57 回日本小児血液・がん学会、2015 年 11 月 27~29 日、山梨県甲府市 甲府富士屋ホテル・常磐ホテル
  2. 井上真依子、非寛解期に臍帯血移植を行った先天性急性単球生白血病の一例、第 57 回日本小児血液・がん学会、2015 年 11 月 27~29 日、山梨県甲府市 甲府富士屋ホテル・常磐ホテル
  3. 久保田真理、びまん性橋グリオーマ(DIPG)の治療経過中にサイトメガロウイルス感染から血球貪食症候群を発症した 1 剖検例、第 57 回日本小児血液・がん学会、2015 年 11 月 27~29 日、山梨県甲府市
  4. 米澤早知子、単一施設における小児がん患者の死亡例に関する検討、第 57 回日本小児血液・がん学会、2015 年 11 月 27~29 日、山梨県甲府市 甲府富士屋ホテル・常磐ホテル
  5. 石前峰斉、Infant acute bilineal leukemia with MLL-AF4 fusion gene、第 77 回日本血液学会、2015 年 10 月 16~18 日、石川県金沢市 石川県立音楽堂、ANA クラウンプラザホテル金沢、ホテル日航金沢、金沢アートホール、もてなしプラザ
  6. 新田美里、当科で経験した小児がん経験者の二次がん 4 症例の検討、第 118 回日本小児科学会、2015 年 4 月 17~19 日、大阪府大阪市 大阪国際会議場、リーガロイヤルホテル大阪
  7. Minenori Eguchi-Ishimae、HMGA2 as a potential molecular target in MLL-AF4 positive infant acute lymphoblastic leukemia. The 56th annual meeting of the American Society of Hematology、2014 年 12 月 6~9 日、San Francisco, USA
  8. 武洲英、生後早期に発症した MLL-AF4 陽性乳児急性骨髄性白血病の一例、第 56 回日本小児血液・がん学会、2014 年 11 月 28~30 日、岡山県岡山市 岡山コンベンションセンター、岡山シティミュージアム
  9. 森谷京子、骨髄炎との鑑別が困難であった

- 前駆 B 細胞性リンパ芽球型リンパ腫の一例、第 56 回日本小児血液・がん学会、2014 年 11 月 28～30 日、岡山県岡山市 岡山コンベンションセンター、岡山シティミュージアム
10. 山内俊史、まれな複雑心奇形として大動脈肺動脈窓と Fallot 四徴症を認めたトリソミー 14 モザイクの 1 例、第 59 回日本人類遺伝学会、2014 年 11 月 19～22 日、東京都江戸川区 タワーホール船堀
  11. 涌井 敬子、CGH+SNP アレイを用いた特定染色体領域の genotyping 評価の試み：トリソミー 14 モザイク症例の 2 細胞系列の 14 番染色体親由来推定、第 59 回日本人類遺伝学会、2014 年 11 月 19～22 日、東京都江戸川区 タワーホール船堀
  12. 村尾紀久子、全サブテロメア FISH 法により 4p16.2 欠失が判明した Wolf Hirschhorn 症候群の一例、第 59 回未熟児新生児学会、2014 年 11 月 10～12 日、愛媛県松山市 ひめぎんホール
  13. 石前峰齋、HMGA2 阻害剤による MLL-AF4 陽性乳児急性リンパ性白血病細胞の増殖抑制効果、第 76 回日本血液学会、2014 年 10 月 31 日～11 月 2 日、大阪府大阪市 大阪国際会議場
  14. Nakano N, A case of late onset FHL with missense mutation in UNC13D gene, The 16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID 2014), 2014 年 10 月 29 日～11 月 1 日、Prague, Czech Republic
  15. 伊藤正範、開放骨生検後、慢性再発性多発性骨髄炎(CRMO)として加療中に悪性リンパ腫として診断した一例、第 24 回日本小児リウマチ学会、2014 年 10 月 3～5 日、宮城県仙台市 仙台市情報・産業プラザ ネット U
  16. Kiriko Tokuda, In utero CLTC-ALK fusion in hematopoietic progenitor cells as a first step of leukemogenesis in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. The 55th annual meeting and exposition of the American Society of Hematology, 2013 年 12 月 7～10 日、New Orleans, USA
  17. 武洲英、MLL-AF4 融合遺伝子を有する急性リンパ性白血病に対する新規治療法についての検討、第 55 回小児血液・がん学会、2013 年 11 月 29 日～12 月 1 日、福岡県福岡市 ヒルトン福岡シーホーク
  18. 森谷京子、ウイルス関連血球貪食性リンパ組織球症を繰り返した骨髄異形成症候群の 1 女児例、第 55 回小児血液・がん学会、2013 年 11 月 29 日～12 月 1 日、福岡県福岡市 ヒルトン福岡シーホーク
  19. 江口 真理子、MLL 融合蛋白はマイクロ RNA let-7b の発現抑制を介し、癌遺伝子 HMGA2 の高発現を引き起こす、第 58 回日本人類遺伝学会、2013 年 11 月 20～23 日、宮城県仙台市 江陽グランドホテル
  20. 石前峰齋、HMGA2, a possible therapeutic target of MLL-AF4 positive ALL. 第 75 回日本血液学会、2013 年 10 月 11～13 日、北海道札幌市 ロイトン札幌・さっぽろ芸文館、札幌市教育文化会館
  21. 徳田 桐子、The first case of congenital BPDCN with CLTC-ALK rearrangement, 第 75 回日本血液学会、2013 年 10 月 11～13 日、北海道札幌市 ロイトン札幌・さっぽろ芸文館、札幌市教育文化会館
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
江口 真理子 (Eguchi, Mariko)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：40420781
  - (2) 研究分担者  
石井 榮一 (Ishii, Eiichi)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：20176126
- 江口 峰齋 (Eguchi, Minenori)  
愛媛大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：50420782
- 東山 繁樹 (Higashiyama, Shigeki)  
愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授  
研究者番号：60202272