

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293247

研究課題名(和文) 幹細胞白血病の分子基盤と細胞増殖制御

研究課題名(英文) Molecular mechanism of stem cell leukemogenesis and regulation of hematopoietic cell growth

研究代表者

野阪 哲哉 (Nosaka, Tetsuya)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30218309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々が作製した、MLLキメラ遺伝子を誘導発現することによって幹細胞白血病が発生する遺伝子改変マウスを用いて、PLZFが未分化造血細胞の増殖において重要な役割を担っていることを見出した。さらにPLZFの下流を解析したところ、EYA2遺伝子の発現が上昇しており、EYA2の強制発現のみでマウス造血細胞を不死化した。また、PLZFあるいはPLZF-RARAによって不死化した造血細胞においてEYA2遺伝子発現をノックダウンすると、細胞増殖が抑制され、PLZF-EYA2軸が白血病発症において重要な役割を担っていることが判明した。

研究成果の概要(英文)：We found that PLZF plays a pivotal role in hematopoietic stem cell leukemogenesis by using transgenic mice conditionally expressing an MLL chimeric gene. EYA2 gene expression was found to be elevated downstream of PLZF, and EYA2 expression was sufficient to immortalize hematopoietic cells. Furthermore, EYA2 knockdown resulted in reduced growth of the hematopoietic cells immortalized by PLZF or PLZF-RARA. These results suggest that the PLZF-EYA2 axis is important in leukemogenesis.

研究分野：血液学、分子生物学

キーワード：PLZF 白血病幹細胞 白血病モデルマウス EYA2

1. 研究開始当初の背景

我々は独自に開発した *MLL*(*Mixed Lineage Leukemia*, *HRX/ALL-1*)-*ENL*(*Eleven Nineteen Leukemia*)誘導発現型トランスジェニックマウスを用いた実験により、専ら造血幹細胞(HSC)のみから急性骨髄性白血病が生じるモデル系を確立し、*PLZF*(*Promyelocytic Leukemia Zinc Finger*)遺伝子が重要な働きを担っていることを明らかにした(Ono R et al., *Blood*, 2013)。今回、*PLZF*の下流で重要な働きを有する遺伝子を同定し、その機能を詳細に解析することにより、白血病幹細胞生成の分子機構に迫った。

2. 研究の目的

予後不良の小児白血病において高頻度で見つかる *MLL*キメラ遺伝子を介した白血病発症をひとつのモデル系として扱い、その分子基盤を解析し、がん幹細胞生成に広く関与する分子機構を明らかにすることを目的とする。最終的には、がん幹細胞選択的分子標的療法への応用を目指す。

3. 研究の方法

最初にまず、*PLZF*機能喪失変異マウスを準備し、同マウスの骨髄細胞から造血幹/前駆細胞を単離し、*MLL-ENL*を発現するレトロウイルスベクターを感染させ、コロニー継代アッセイを行ったところ、予想に反してコントロールマウスとの比較において *MLL-ENL*による不死化に有意差が観察されなかった。*MLL-ENL*の発現レベルや標的細胞が純粋な造血幹細胞のみではない問題を考慮すると、慎重な解釈が必要であるが、少なくとも、後からのノックダウンとは異なり、最初からの欠損の場合は *PLZF*に代わる因子が代償的に機能している可能性が高い。ひとつの可能性として、その因子は *PLZF*の下流の遺伝子が考えられる。

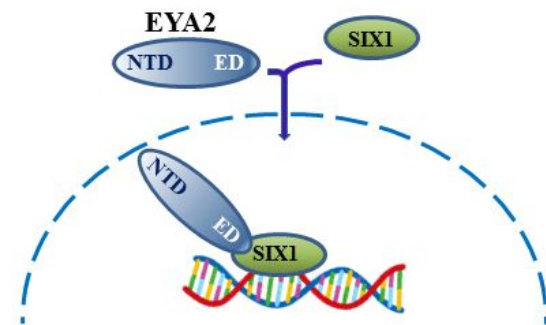
今回、*PLZF*の強制発現により不死化したマウス骨髄造血幹/前駆細胞における cDNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、*PLZF*下流でがん化に直接貢献している遺伝子を探索した。さらに、同定した遺伝子の機能を種々の分子生物学的手法を用いて詳細に解析した。

4. 研究成果

cDNA マイクロアレイ解析にて、造血幹細胞特異的に発現し、*PLZF*によって発現が増強す

るいくつかの遺伝子が同定され、そのうちのひとつ、*EYA2*に関してさらに解析した。

*EYA2*はショウジョウバエの眼の発生に重要な役割を果たす *ea*(*eyes absent*)遺伝子のホモログで、哺乳動物における4種の *EYA*(*eyes absent homolog*)遺伝子のうちのひとつである。N末側半分はNTD(N terminal domain)と呼ばれ、スレオニンフォスファターゼ活性と転写活性化能を有し、C末側半分(*EYA domain*, ED)はチロシンフォスファターゼ活性と蛋白相互作用活性を有する。*EYA2*は細胞質に存在する一方、ホメオボックス蛋白 *Six1*と結合し、核内に移行し、転写調節因子としても作用する(下図)。



*EYA1-4*のうち、マウスにおいて造血幹細胞で高発現しているのは、*EYA2*のみであり、また、*EYA2*はヒトの乳がん、卵巣がんの予後不良症例において高発現していることが知られている。これらのことから *EYA2*に着目した。

本研究の成果として、具体的には、以下の結果を得た。

- 1) *EYA2*遺伝子自体を強制発現させるとマウス骨髄細胞は不死化する。
- 2) 一部の急性前骨髄球性白血病(APL)症例で見られる *PLZF-RARA*遺伝子の強制発現によるマウス骨髄細胞のがん化において *EYA2*の発現が誘導される。
- 3) *PLZF*強制発現細胞、上記2)の *PLZF-RARA*強制発現細胞において *EYA2*の発現を抑制すると、がん細胞の増殖が抑制される(shRNAを用いた実験)。
- 4) 上記2)において ATRA 処理によって *PLZF-RARA*蛋白を分解すると、細胞増殖の抑制に先んじて *EYA2*の発現が下がる。
- 5) *PLZF*は *EYA2*遺伝子のプロモーター領域に結合し、*EYA2*の転写を活性化する。
- 6) *EYA2*は *Six1*と相互作用することによって造血細胞を不死化する。
- 7) *EYA2*とエストロゲン受容体との融合蛋白

としてマウス骨髄細胞に発現させ、タモキシフェン処理により細胞内局在を変えると、核内局在依存性に細胞を不死化する。

- 8) EYA2 のフォスファターゼ活性は造血細胞の不死化に影響を及ぼさない。
- 9) EYA2 による造血細胞の不死化に c-Myc の翻訳後修飾は関与しない。
- 10) ヒト急性骨髄性白血病 (AML) 症例の一部に EYA2 高発現例がある (公開データベース解析)。
- 11) EYA2 高発現ヒト AML 細胞は造血幹細胞や白血病幹細胞に類似した遺伝子発現プロファイルを示す。
- 12) PLZF-RARA で不死化したマウス造血細胞は PML-RARA で不死化したマウス造血細胞より EYA2 の発現が高い。
- 13) ヒト APL 症例において PLZF-RARA 陽性例は PML-RARA 陽性例より EYA2 の発現が高い (公開データベース解析)。

以上の結果は、EYA2 高発現 AML や PLZF-RARA 陽性 APL における新規分子標的療法の可能性を示唆する。PLZF-RARA 強制発現細胞の骨髄移植によるマウス白血病発症モデルは、PLZF-RARA 遺伝子の発現レベルや使用するマウスの系統を含め種々検討したが、PLZF-RARA の細胞毒性の問題や、発症しても白血病が骨髄球系統でなく、EYA2 の高発現が見られない、などの理由により、成功しておらず、*in vivo* 治療モデルは今後の検討課題である。

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 9 件)

- 1 Ono R, Masuya M, Ishii S, Katayama N, Nosaka T. Eya2, a target activated by Plzf, is critical for PLZF-RARA-induced leukemogenesis. *Mol Cell Biol* 査読有 accepted manuscript posted online 17 April 2017.
doi: 10.1128/MCB.00585-16.
- 2 Takeuchi, T, Yamaguchi M, Kobayashi K, Miyazaki K, Tawara I, Imai H, Ono R, Nosaka T, Tanaka K, Katayama N. MYD88, CD79B, and CARD11 gene mutations in CD5-positive diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer* 査読有 123:

1166-1173, 2017.

doi: 10.1002/cncr.30404.

- 3 Yamanaka K, Nakanishi T, Isono K, Hasegawa C, Inada Y, Mizutani K, Matsushima Y, Okada K, Mabuchi T, Kondo M, Yamagiwa A, Kakeda M, Habe K, Nosaka T, Gabazza EC, Yamazaki H, Mizutani H, Kawano M. Restrictive interleukin-10 induction by an innocuous Parainfluenza virus vector ameliorates nasal allergy. *J Allergy Clin Immunol* 査読有 139: 682-686.e7, 2017.
doi: 10.1016/j.jaci.2016.05.044.
- 4 Kobayashi K, Yamaguchi M, Miyazaki K, Imai H, Yokoe K, Ono R, Nosaka T, Katayama N. Expressions of SH3BP5, LMO3, and SNAP25 in diffuse large B-cell lymphoma cells and their association with clinical features. *Cancer Med* 査読有 5: 1802-1809, 2016.
doi: 10.1002/cam4.753.
- 5 Kitamura T, Okochi-Watanabe N, Enomoto Y, Nakahara F, Oki T, Komeno Y, Kato N, Doki N, Uchida T, Kagiya Y, Togami K, Kawabata KC, Nishimura K, Hayashi Y, Nagase R, Saika M, Fukushima T, Asada S, Fujino T, Izawa Y, Horikawa S, Fukuyama T, Tanaka Y, Ono R, Goyama S, Nosaka T, Kitaura J, Inoue D. Novel working hypothesis for pathogenesis of hematological malignancies; Combination of mutations-induced cellular phenotypes determines the disease (cMIP-DD). *J Biochem* 査読有 159: 17-25, 2016.
doi: 10.1093/jb/mvv114.
- 6 Tsurudome M, Ito M, Ohtsuka J, Hara K, Komada H, Nishio M, Nosaka T. The fusion protein specificity of the parainfluenza virus hemagglutinin-neuraminidase protein is not solely defined by the primary structure of its stalk domain. *J Virol* 査読有 89: 12374-12387, 2015.
doi: 10.1128/JVI.01448-15.
- 7 野阪哲哉. Jak-STAT 経路. In: 細胞シグナル操作法. 生体の科学 査読無

- 66(5): 420-421, 2015.
- 8 Ohtsuka J, Fukumura M, Tsurudome M, Hara K, Nishio M, Kawano M, Nosaka T. Vero/BC-F: an efficient packaging cell line stably expressing F protein to generate single round-infectious human parainfluenza virus type 2 vector. *Gene Ther* 査読有 21:775-784, 2014. doi: 10.1038/gt.2014.55.
 - 9 Watanabe K, Matsubara A, Kawano M, Mizuno S, Okamura T, Tsujimura Y, Inada H, Nosaka T, Matsuo K, Yasutomi Y. Recombinant Ag85B vaccine by taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed Mycobacteria-specific immune responses by intranasal immunization. *Vaccine* 査読有 32: 1727-1735, 2014. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.11.108.
- [学会発表](計 13 件)
- 1 Nagatake T, Suzuki H, Nasu A, Hirata S, Wada Y, Matsumoto N, Shimojou M, Morimoto S, Hosomi K, Ogami K, Tsujimura Y, Kawano M, Nosaka T, Yasutomi Y, Kunisawa J. Organogenesis of inducible bronchus-associated lymphoid tissue has essential role in the induction of antigen-specific immune responses by Ag85B-hPIV2-based anti-tuberculosis vaccine in mice. 第 10 回次世代アジュバント研究会 2017 年 1 月 23-24 日 千里ライフサイエンスセンター (大阪府・豊中市)
 - 2 Takeuchi T, Yamaguchi M, Kobayashi K, Miyazaki K, Tawara I, Imai H, Ono R, Nosaka T, Tanaka K, Katayama N. MYD88, CD79B, and CD79A gene mutations in CD5-positive diffuse large B-cell lymphoma. 58th ASH(American Society of Hematology) Annual Meeting and Exposition 2016 年 12 月 3-6 日 San Diego, USA
 - 3 Nagatake T, Wada Y, Matsumoto N, Shimojou M, Hirata S, Nasu A, Suzuki H, Hosomi K, Ogami K, Tsujimura Y, Kawano M, Nosaka T, Yasutomi Y, Kunisawa J. Inducible bronchus-associated lymphoid tissue plays an important role in the induction of antigen-specific immune response by Ag85B-hPIV2-based anti-tuberculosis vaccine in mice. AAI (The American Association of Immunologists) Annual Meeting (Immunology 2016) 2016 年 5 月 13-17 日 Seattle, USA
 - 4 Tsurudome M, Ito M, Nishio M, Nosaka T. The F protein specificity of the parainfluenza virus HN protein can be modified by substituting specified amino acids in the HN head domain. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 2016 年 10 月 23-25 日 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)
 - 5 Ono R, Masuya M, Ishii S, Katayama N, Nosaka T. Analysis of novel molecular mechanism in PLZF-mediated leukemogenesis. 第 78 回日本血液学会学術集会 2016 年 10 月 13-15 日 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
 - 6 Nagatake T, Wada Y, Matsumoto N, Shimojou M, Hirata S, Nasu A, Suzuki H, Hosomi K, Ogami K, Tsujimura Y, Kawano M, Nosaka T, Yasutomi Y, Kunisawa J. Essential role of inducible bronchus-associated lymphoid tissue genesis for the induction of antigen-specific immune response by Ag85B-hPIV2-based anti-tuberculosis vaccine in mice. 第 9 回次世代アジュバント研究会 2016 年 1 月 19 日 千里ライフサイエンスセンター(大阪府・豊中市)
 - 7 Tsurudome M, Ito M, Nishio M, Nosaka T. The F specificity of the Parainfluenza virus HN is not defined solely by the primary structure of the HN stalk domain. Negative Strand Virus Meeting 2015 2015 年 6 月 14-19 日 Siena, Italy
 - 8 Tsurudome M, Ito M, Nishio M, Komada H, Nosaka T. Factors that define the F protein specificity of the parainfluenza virus HN protein. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会 2015 年 11 月 22-24 日 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)
 - 9 Kobayashi K, Yamaguchi M, Miyazaki K, Imai H, Ono R, Nosaka T, Katayama N.

- Expression of SH3BP5, LMO3 and SNAP25 in diffuse large B-cell Lymphoma cells and association with clinical features.
第74回日本癌学会学術総会
2015年10月8-10日 名古屋国際会議場
(愛知県・名古屋市)
- 10 Nagatake T, Matsumoto N, Shimojou M, Suzuki H, Fukuyama S, Sato S, Ogami K, Tsujimura Y, Kawano M, Nosaka T, Kiyono H, Yasutomi Y, Kunisawa J. Immunological diversity of mucosa-associated lymphoid tissues for the development of mucosal vaccine.
第8回次世代アジュバント研究会
2015年1月20日 千里ライフサイエンスセンター (大阪府・豊中市)
- 11 Kobayashi K, Yamaguchi M, Miyazaki K, Imai H, Yokoe K, Ono R, Nosaka T, Katayama N. Expression of LMO3 and SNAP25 in diffuse large B-cell lymphoma cells and its relation to clinical features. *56th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition* 2014年12月6-9日 San Francisco, USA
- 12 鶴留雅人、伊藤守弘、大塚順平、駒田洋、西尾真智子、野阪哲哉. パラインフルエンザウイルスのHNとFの機能的相互作用の分子機構：Fとの相互作用におけるHNのHead領域の役割.
第62回日本ウイルス学会学術集会
2014年11月10-12日 パシフィコ横浜会議センター (神奈川県・横浜市)
- 13 Ono R, Masuya M, Katayama N, Nosaka T. Analysis of novel molecular mechanisms leading to an aberrant self-renewal by Plzf in leukemogenesis.
第76回日本血液学会学術集会
2014年10月31日-11月2日 大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)

〔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〕

三重大学大学院 医学系研究科 感染症制御
医学・分子遺伝学分野 ホームページ：

<http://www.medic.mie-u.ac.jp/microbiology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野阪 哲哉 (NOSAKA TETSUYA)
三重大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号： 30218309

(2) 連携研究者

小埜 良一 (ONO RYOICHI)
三重大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号： 40422414