

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 7 日現在

機関番号：32666
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2014～2016
課題番号：26461434
研究課題名(和文)新規RCSD1-ABL1遺伝子癌化能と分子標的薬開発

研究課題名(英文)Leukemogenicity of the RCSD1-ABL1 gene

研究代表者

猪口 孝一 (Inokuchi, Koiti)

日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授

研究者番号：10203267

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)：我々はRCSD1-ABL1陽性ALL患者細胞からRCSD1 exon3(90 bp)の有無で2種類のRCSD-ABL1が発現していることを明らかにした。この2サブタイプRCSD1-ABL1cDNAのクローニングに成功した。この2種類のcDNAをBa/F3細胞に遺伝子導入し癌化能を観察したところexon 3・RCSD1/ exon 4・ABL1 (R3A4)に癌化能が強く観察された。この2種類のRCSD1-ABL1cDNAのgene expression profile解析により関係分子シグナル機構を同定し明らかにした。Tyk2分子を同定した。また、マウスにより白血病化能を確認した。

研究成果の概要(英文)：Two RCSD1-ABL1 cDNA were cloned from a cells of RCSD1-ABL1-positive acute leukemia. One is cDNA consisted of exon 3 of RCSD1/ exon 4 of ABL1 (R3A4), another is consisted of exon 2 of RCSD1/ exon 4 of ABL1 (R2A4). R3A4 and R2A4 were expressed in Ba/F3 cells using retrovectors. Using phosphorylation antibody array detected the increased phosphorylation of Tyk2 in R3A4-Ba/F3 cells. Western blotting analysis confirmed the increased phosphorylation of Tyk2, although no increased phosphorylation of Tyk2 in R2A4-Ba/F3 cells. Tyrosine kinase inhibitor assays also showed the sensitivity of R3A4-Ba/F3 cells to the TKIs imatinib, dasatinib, and JAK2 inhibitor I, which is a pan family including Tyk2 inhibitor. R3A4-Ba/F3 cells showed sensitivity only to JAK-inhibitor I. These findings suggest that the kinase-activating pathways and sensitivities to TKIs vary between fusion sites of RCSD1-ABL1 in leukemogenesis.

研究分野：血液内科

キーワード：RCSD1 ABL1 ALL Ba /F3 TKI Tyk2

1. 研究開始当初の背景

(1) RCSD1-ABL1 陽性 B-ALL は極めて予後不良な疾患であり、TKI は一時的な効果しかない。RCSD1-ABL1 陽性 B-ALL は ABL1-TK 活性の上昇を認めるが、BCR-ABL 陽性白血病に用いられる TKI の効果は一時的に過ぎない。これは BCR-ABL1 との ABL1 遺伝子切断点の違いによる。

(2) RCSD1-ABL1 は 2 種類の transcripts を白血病患者より我々は確認している。

2. 研究の目的

(1) RCSD1-ABL1 陽性急性リンパ性白血病 (ALL) は t(1;9)(q23;q34) 染色体異常を伴う B-ALL で極めて予後不良な疾患である。ABL1 チロシンキナーゼ活性の上昇を認めるものの、BCR-ABL 陽性白血病に用いられるチロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) の効果は限局的に過ぎない。我々は RCSD1-ABL1 陽性 ALL 患者細胞から RCSD1 exon3(90 bp)の有無で 2 種類の RCSD-ABL1 が発現していることを明らかにしたが、詳細は不明である。この不明の 2 サブタイプ RCSD1-ABL1cDNA のクローニングを行い、2 サブタイプの特徴と白血化能と機能ドメインを *in vitro* で明らかにする。

(2) gene expression profile 解析により関係分子シグナル機構を同定し明らかにする。

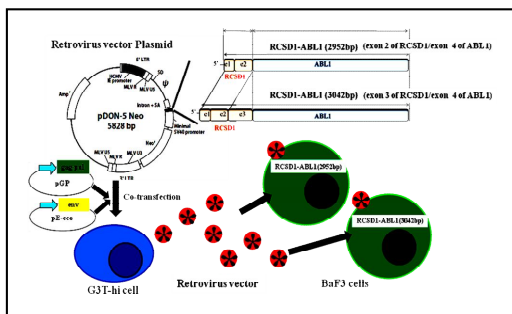
(3) RCSD1-ABL1cDNA 遺伝子導入マウスおよび RCSD1-ABL1cDNA 遺伝子発現 B-ALL モデルマウスの作成を行う。

以上 3 project が研究期間の目的である。

3. 研究の方法

今回の期間内に RCSD1-ABL1 遺伝子の急性白血化機構の解明を一番で目指す。

1. 2 サブタイプ RCSD1-ABL1cDNA のクローニングを行う。
2. *In vitro* での機能解析を Ba/F3 細胞、Mock 細胞に RCSD1-ABL1cDNA を遺伝子導入して明らかにする (図 1)。



3. gene expression profile 解析および免疫沈降法・Western により関係分子シグ

ナル機構を同定する。

4. 2 サブタイプの RCSD1-ABL1cDNA 遺伝子発現 Ba/F3 細胞を移植し、マウスの白血化を観察する。

4. 研究成果

(1) 我々は RCSD1-ABL1 陽性 ALL 患者細胞から 2 種類 (RCSD1 exon3 の有無の 2 種類; 90 bp の差がある) の RCSD1-ABL1 遺伝子のクローニングに成功した (図 2)。

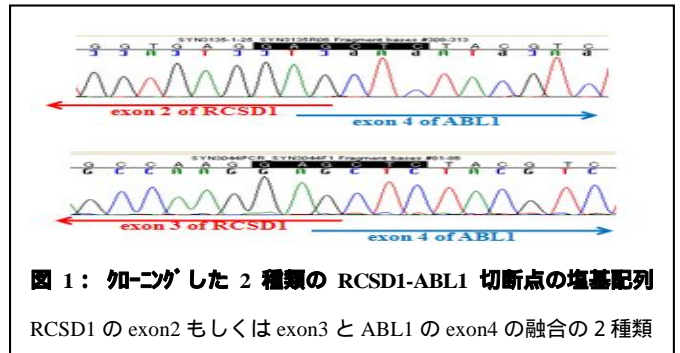


図 1: クローニングした 2 種類の RCSD1-ABL1 切断点の塩基配列

RCSD1 の exon2 もしくは exon3 と ABL1 の exon4 の融合の 2 種類

(2) ABL1 の切断点は通常の切断点部位とは違っていた。BCR-ABL1 遺伝子と 2 種類の RCSD1-ABL1 遺伝子における ABL1 切断点部位の相違。RCSD1 と融合するのは exon4 であった。

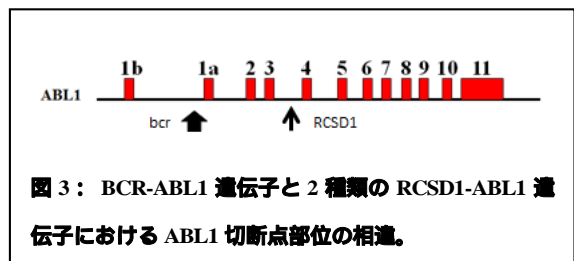
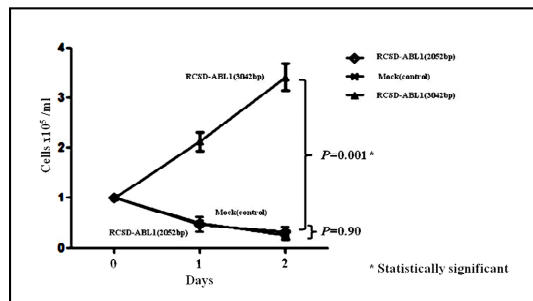


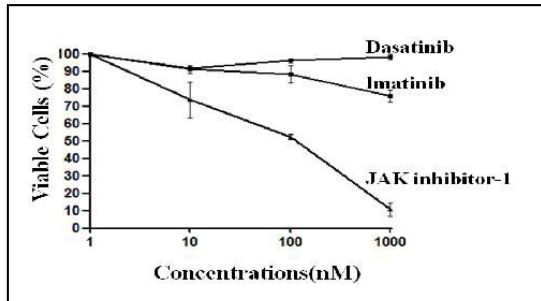
図 3: BCR-ABL1 遺伝子と 2 種類の RCSD1-ABL1 遺伝子における ABL1 切断点部位の相違。

(3) この 2 種類の RCSD1-ABL1 遺伝子をレトロウイルスベクター経由でマウスのリンパ系幹細胞株 BaF3 に導入したところ、RCSD1 遺伝子の exon3 と ABL1 遺伝子の exon4 の融合遺伝子のみが BaF3 の IL3 依存性から脱却し IL3 非依存性に自立増殖能を獲得していることを確認した (図 4)。したがってこの RCSD1 exon3 に相当する 30 アミノ酸は RCSD1-ABL1 遺伝子のトランスフォーメーション活性に重要な配列であることが確かめられた (図 4: 下図)。

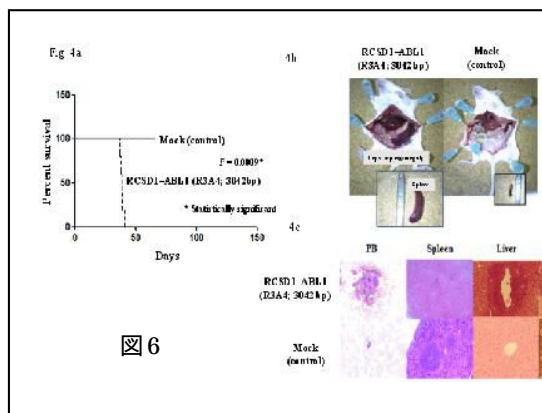


* Statistically significant

(4) imatinib や dasatinib のチンナーゼ抑制薬や JAK-1 抑制薬にてこの自立増殖能のある RCSD1-ABL1cDNA 導入 Ba/F3 に確認したところ、JAK-1 抑制薬のみが自立増殖能を抑制し、殺細胞作用を有していた。imatinib や dasatinib のチンナーゼ抑制薬は殺細胞効果はなかった(図5:下図)をかけた



(5) Exon3 の有無で 2 種類の RCSD1-ABL1cDNA 導入 Ba/F3 をマウスに導入したところ Exon3 の有の RCSD1-ABL1cDNA 導入 Ba/F3 が白血病化し、マウスは短期に死亡した。解剖すると脾臓腫大や肝臓などに白血病細胞が多数浸潤していた。



(6) gene expression profile 解析により下流に 関係していると考えられる分子シグナル機構を同定し明かにした。Tyk2 分子が gene expression profile 解析により発現が亢進していたが、STAT2 分子を介してリン酸化されていると考えられた。

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 6 件)

Tamai H, Yamaguchi H, Miyake K, Takatori M, Kitano T, Dan K, Inokuchi K. (2016) The kinase-activating pathways and sensitivities to TKIs vary between fusion sites of RCSD1-ABL1 in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. International

Journal of Recent Scientific Research. 7: 9729-9733.

Ryotokuji T, Yamaguchi H, Ueki T, Usuki K, Kurosawa S, Kobayashi Y, Kawata E, Tajika K, Gomi S, Kanda J, Kobayashi A, Omori I, Marumo A, Fujiwara Y, Yui S, Terada K, Fukunaga K, Hirakawa T, Arai K, Kitano T, Kosaka F, Tamai H, Nakayama K, Wakita S, Fukuda T, Inokuchi K. (2016) Clinical characteristics and prognosis of acute myeloid leukemia associated with DNA-methylation regulatory gene mutations. Haematologica. 2016 Sep;101(9):1074-81.

Kurosawa S, Yamaguchi H, Yamaguchi T, Fukunaga K, Yui S, Wakita S, Kanamori H, Usuki K, Uoshima N, Yanada M, Shono K, Ueki T, Mizuno I, Yano S, Takeuchi J, Kanda J, Okamura H, Inamoto Y, Inokuchi K, Fukuda T. (2016) Decision Analysis of Postremission Therapy in Cytogenetically Intermediate-Risk Acute Myeloid Leukemia: The Impact of FLT3 Internal Tandem Duplication, Nucleophosmin, and CCAAT/Enhancer Binding Protein Alpha. Biol Blood Marrow Transplant. 22:1125-32.

Inokuchi K, Kumagai T, Matsuki E, Ohashi K, Shinagawa A, Hatta Y, Takeuchi J, Yoshida C, Wakita H, Kozai Y, Shirasugi Y, Fujisawa S, Iwase O, Yano S, Okamoto S, Oba K, Sakamoto J, Sakamaki H. (2014) Efficacy of molecular response at 1 or 3 months after the initiation of dasatinib treatment can predict an improved response to dasatinib in imatinib-resistant or imatinib-intolerant Japanese patients with chronic myelogenous leukemia during the chronic phase. J Clin Exp Hematop. 54:197-204.

Tamai H, Miyake K, Yamaguchi H, Shimada T, Dan K, Inokuchi K. (2014) Inhibition of S100A6 induces GVL effects in MLL/AF4-positive ALL in human PBMC-SCID mice. Bone Marrow Transplant. 49:699-703.

Inokuchi K, Wakita S, Hirakawa T, Tamai H, Yokose N, Yamaguchi H,

Dan K. (2011) RCSD1-ABL1-positive B lymphoblastic leukemia is sensitive to dexamethasone and tyrosine kinase inhibitors and rapidly evolves clonally by chromosomal translocations. Int J Hematol.94: 255-60.

〔学会発表〕(計 2 件)

Tamai H., et al. Leukemogenicity of RCSD1-ABL1 of Ph-like acute lymphoblastic leukemia varies between fusion sites. OS-3-67.第 77 回日本血液学会総会 10 月、2015 年 .

Tamai H., et al.Examination of RCSD1-ABL1-leukemogenicity OS-1-96. 第76 回日本血液学会総会 10 月、2014 年 .

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

猪口 孝一 (INOKUCHI, Kouichi)
日本医科大学 血液内科学分野・大学院教授

研究者番号：10203267

(2)研究分担者

玉井 勇人 (TAMAI, Hayato)
日本医科大学 血液内科学分野・講師

研究者番号：40465349

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()