

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461587

研究課題名(和文) TEL-AML1陽性白血病の発症過程の解明と分子標的療法の開発

研究課題名(英文) Leukemogenic pathway of TEL-AML1-positive leukemia

研究代表者

江口 峰斉 (EGUCHI-ISHIMAE, MINENORI)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50420782

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)：腫瘍化におけるTEL-AML1の協働因子を同定するために、TEL-AML1陽性細胞への附加的な遺伝子異常の導入により、造腫瘍能が獲得されるかどうか検討した。TEL-AML1発現ES細胞より得られたTie2陽性細胞にレトロウイルスベクターを用いてランダムに挿入変異を導入後、免疫不全マウスへの移植により造腫瘍能の獲得の有無を検討した。移植により、マウス骨髄内でB220陽性細胞の増殖を認めた。レトロウイルス挿入部位を同定すると、細胞膜構造蛋白や転写因子などをコードする遺伝子内に挿入していた。挿入部位に位置する遺伝子の発現異常がTEL-AML1融合遺伝子と協働して腫瘍化に作用していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：TEL-AML1 is the most common fusion gene in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). It alone is not enough to cause leukemia, and additional genetic change(s) are necessary. Retroviral vector-mediated insertional mutagenesis was applied on TEL-AML1-expressing hematopoietic progenitor cells to identify the cooperating genetic changes with TEL-AML1 in leukemogenesis. Tie2-positive cells containing immature hematopoietic progenitors were transduced by retroviral vector to induce insertional mutagenesis, and then transplanted into immunodeficient mice. In these mice B220-positive cells were expanded, and tumor formation was observed in some of them. Analysis of retroviral integration site in these tumors showed intra-genic insertion of viral sequences possibly resulting in disruption of gene expression/regulation. Genes located near the integration site may be the target of cooperating genetic changes necessary for leukemogenesis by TEL-AML1.

研究分野：小児科学

キーワード：白血病 融合遺伝子

1. 研究開始当初の背景

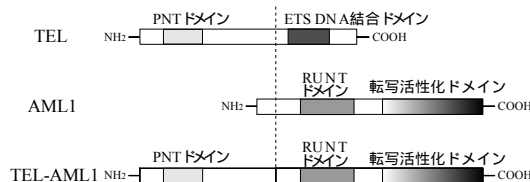
(1) *TEL-AML1* 融合遺伝子と小児急性リンパ性白血病

12:21 染色体転座で形成される *TEL-AML1* (*ETV6-RUNX1*) 融合遺伝子は、小児急性リンパ性白血病(ALL)の約 10-20%に認められる融合遺伝子であり、小児 ALL で認められる白血病特異的融合遺伝子の中で最も頻度が高い。*TEL-AML1* 陽性 ALL は低リスク群に分類され、比較的予後は良好の白血病である。しかしながら、治療終了後の再発が多いことや、一部に治療抵抗性の予後不良群が含まれており、これらの再発例、予後不良例を早期に抽出することが重要である。また治療成功例や長期生存例の増加に伴い、長期間にわたる化学療法の副作用として、成長障害や学習障害など晩期障害を抱える症例も増えている。化学療法の軽減による晩期障害の予防の観点からも新規の分子標的療法の開発が望まれる。

(2) *TEL-AML1* 融合遺伝子による白血病化のメカニズム

*TEL*(*ETV6*)遺伝子は ETS ファミリーに属する転写因子をコードする。TEL 蛋白はアミノ末端側に多量体形成能をもつ Pointed (HLH) ドメインを、カルボキシ末端側に DNA 結合の ETS ドメインを有しており(図 1)、骨髓造血に必須であることが示されている。TEL は転写抑制に働き、その転写抑制機能は、主に Pointed ドメインと ETS ドメインの間の領域にヒストン脱アセチル化酵素 HDAC や Sin3A、NcoR などの転写抑制因子がリクルートされることによる。

図 1 *TEL-AML1*融合蛋白



一方 *AML1*(*RUNX1*)は DNA 結合領域である Runt ドメインと転写活性化ドメインを有する転写因子であり、胎生期の AGM (aorta-gonad-mesonephros)領域、胎児肝、骨髓での二次造血(definitive hematopoiesis)に必須である。*TEL-AML1* 融合蛋白は *AML1* のほぼ全長に転写抑制領域を含む *TEL* のアミノ末端側部分が結合する形をとり(図 1)、機能的には *AML1* の転写活性をドミナントネガティブに抑制する。*TEL-AML1* の造腫瘍能の多くはこの *AML1* の機能抑制に基づく。造血前駆細胞に *TEL-AML1* を導入すると、未分化 B リンパ球が自己複製能を獲得し、成熟障害を生じることが示されている。

(3) *TEL-AML1* による腫瘍化には付加的遺伝子異常が必要

我々は *TEL-AML1* 融合遺伝子は非白血病症例の臍帯血から 1-2%の頻度で検出されることを報告した。この頻度は *TEL-AML1* 陽性白

血病の発症頻度のほぼ 100 倍と高頻度であり、胎生期に形成される *TEL-AML1* 陽性細胞は、前白血病細胞の形成に過ぎず、約 1/100 の頻度で付加的な遺伝子異常(2<sup>nd</sup> hit)を獲得した後に、最終的に白血病として発症する過程が考えられる。遺伝子改変マウス(トランスジェニックマウス、ノックインマウス)やレトロウイルスによる *TEL-AML1* 融合遺伝子導入の実験系では、*TEL-AML1* 遺伝子のみでは白血病は生じないことからこの仮説は支持される。

白血病形成の過程における *TEL-AML1* の協働因子を同定し、*TEL-AML1* による白血病化のメカニズムを解明することは分子標的療法など、新たな治療法の開発のためにも重要である。

2. 研究の目的

小児急性リンパ性白血病で最も高頻度な *TEL-AML1* 陽性白血病において、*TEL-AML1* 融合遺伝子のみを有する前白血病細胞から白血病細胞への進展に不可欠な付加的遺伝子異常の同定を試み、分子標的療法の開発に繋がる知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *TEL-AML1* 融合遺伝子を発現するマウス ES 細胞の作製

Chicken-beta-actin (CAG) プロモーター下に *TEL-AML1* を発現する発現ベクターを作製し、マウス ES 細胞に遺伝子導入した。造血細胞分化後に効率的に遺伝子導入細胞を分離するために、*TEL-AML1* のアミノ末端側に GFP (緑色蛍光タンパク質)を結合した発現ベクターを作製し、遺伝子導入に用いた。

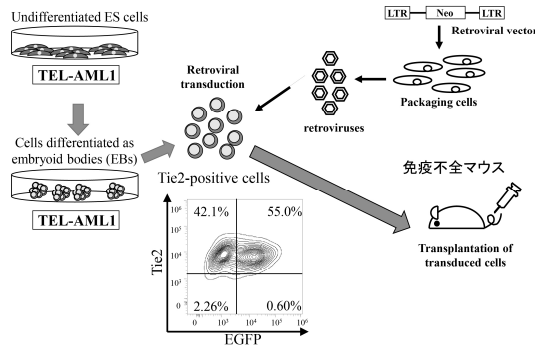
(2) *TEL-AML1* 融合遺伝子を発現するマウス ES 細胞の免疫不全マウスへの移植

CAG プロモーター下に *TEL-AML1* を発現するマウス ES 細胞を造血前駆細胞を含む細胞分画である Tie2<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>分画へ分化させ、セルソーターにて分離後に免疫不全マウスである NOD/Shi-scid,IL-2RγKO Jic (NOG)マウスに経尾静脈的ないしは骨髓内注入により移植した。移植後白血病などの腫瘍の発症の有無に関して経過観察を行った。腫瘍の形成を認めたマウスでは骨髓や肝・脾などを採取し、フローサイトメトリーや遺伝子発現解析を行った。

(3) レトロウイルスによる挿入変異を用いた *TEL-AML1* による腫瘍化の協働因子の同定

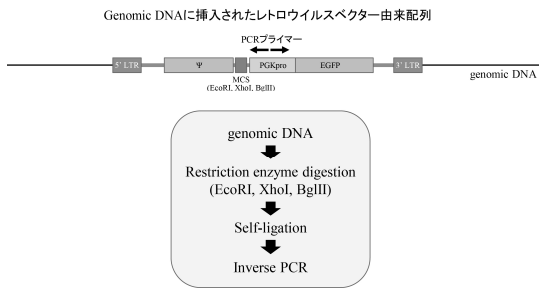
*TEL-AML1* を発現する ES 細胞を造血細胞に分化させた段階で、インサートを持たないレトロウイルスベクターを遺伝子導入し、ランダムにゲノムに組み込ませる(図 2)。その後、コロニープレATINGアッセイを行い、自己複製能を獲得したコロニーから細胞を回収し、レトロウイルスの挿入部位を同定することにより、腫瘍化における *TEL-AML1*

図2 *TEL-AML1*陽性細胞の腫瘍形成能



の協働因子を同定する。またレトロウイルスによる挿入変異を導入した *TEL-AML1* 発現マウス Tie2<sup>+</sup>陽性細胞を NOG マウスへ移植し、白血病などの腫瘍の発生について観察した。腫瘍の発生を認めた場合、腫瘍細胞から DNA を抽出し、レトロウイルスの挿入部位を inverse PCR 法を用いて検索し、影響を受けた遺伝子を同定した(図3)。

図3 レトロウイルス挿入部位の同定



#### 4. 研究成果

##### (1) *TEL-AML1* 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 *TEL-AML1* を発現する発現ベクターを作製し、マウス ES 細胞に遺伝子導入し、恒常的に *TEL-AML1* 融合遺伝子を発現するマウス ES 細胞を作製した。免疫不全マウスの血液中で ES 由来細胞を容易に識別するために、*TEL-AML1* のアミノ末端側に EGFP (緑色蛍光タンパク質) を結合した発現ベクターを作製し、実験に用いた。*TEL-AML1* の発現はこの ES 細胞の生存・増殖に影響せず、造血細胞への分化においてその影響が認められた。*TEL-AML1* を発現する ES 細胞を造血細胞へ分化させると、野生型の ES 細胞と異なり、早期の造血幹細胞を含む分画である Tie2 陽性 c-kit 陽性分画は減少しており、Tie2 陰性 c-kit 陽性の細胞群が増加する。これらの Tie2 陰性 c-kit 陽性の細胞群は造血細胞への分化に必要な転写因子群の発現が低下しており、造血コロニーアッセイにおいても造血コロニー産生能が著しく低下していた。このことから *TEL-AML1* 発現細胞においては、少数産生される Tie2 陽性 c-kit 陽性細胞群が白血病幹細胞を含み、白血病の発生母地となると考えられる。

##### (2) *TEL-AML1* 融合遺伝子を発現するマウス

##### ES 細胞の免疫不全マウスへの移植

*TEL-AML1* 発現マウス ES 細胞より得られた Tie2 陽性細胞分画を分離して NOG マウスに移植し、白血病の発症の有無を検討したが、有意な白血病の発症は認められなかった。これは *TEL-AML1* 融合遺伝子単独では白血病の発症に十分ではないことを示しており、*TEL-AML1* 融合遺伝子以外に付加的遺伝子異常が必要であることを示唆している。

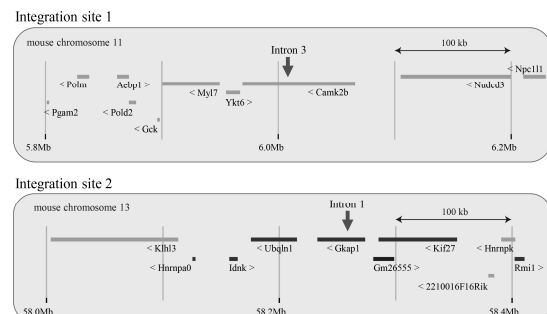
##### (3) レトロウイルスによる挿入変異を用いた *TEL-AML1* 腫瘍化の協働因子の同定

腫瘍化における *TEL-AML1* の協働因子を同定するために、*TEL-AML1* 陽性 ES 細胞に二次的な遺伝子異常を導入することにより、腫瘍化能が得られるかどうかに関して検討した。具体的には *TEL-AML1* を発現する ES 細胞を Tie2 陽性の未分化造血細胞に分化させた段階で、レトロウイルスベクターを用いてランダムに挿入変異を導入後、コロニープレッシングアッセイや NOG マウスへの移植により造腫瘍能の獲得の有無を検討した。コロニープレッシングアッセイではレトロウイルスによる挿入変異の導入により増殖能の亢進が認められた。また免疫不全マウスである NOG マウスへの移植においては、有意な白血病の発症は研究期間中には認められなかったが、肝脾腫などの形成を認め、in vivo での細胞増殖能の亢進が認められた。

*TEL-AML1* 発現細胞の骨髄へのホーミングを促進するために *CD44* 遺伝子のコーディング領域をレトロウイルスに組み込み、*CD44* が同時に発現する細胞を用いて更に検討した。*TEL-AML1* と *CD44* を発現する Tie2 陽性細胞を NOG マウスに移植すると、マウスの骨髄内では B220 陽性の B リンパ球に分化した細胞の増殖を認めた。同時に骨髄から漏れ出たと思われる骨髄外の腫瘍形成を認めた。この腫瘍も B220 陽性であり、B リンパ球系統に方向付けされた細胞と思われた。レトロウイルスの挿入部位を用いたクローナリティの解析では、骨髄内および腫瘍組織の B220 陽性細胞はオリゴクローナルに増殖した細胞であった。

実際のレトロウイルスの挿入部位を同定すると、細胞膜構造蛋白や転写因子などをコードする遺伝子の内部に挿入していた(図4)。

図4 *TEL-AML1*腫瘍細胞におけるviral integration site



遺伝子内にレトロウイルスが挿入していることより、挿入部位に位置する遺伝子の発現異常が生じていると考えられた。同定された遺伝子の発現異常をヒト白血病細胞で確認したところ、発現減弱や亢進の発現異常が一部の症例で認められた。これらの遺伝子の発現異常が *TEL-AML1* 融合遺伝子と協働して腫瘍化に作用し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 11 件)

1. Tezuka Y, Fukuda M, Watanabe S, Nakano T, Okamoto K, Kuzume K, Yano Y, Eguchi M, Ishimae M, Ishii E, Miyazaki T, "Histological characterisation of visceral changes in a patient with type 2 Gaucher disease treated with enzyme replacement therapy" *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 査読あり、2017 (in press)
2. Higaki T, Chisaka T, Moritani M, Ohta M, Takata H, Yamauchi T, Yamaguchi Y, Konishi K, Yamamoto E, Ochi F, Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Mitani Y, Ishii E. Installation of multiple automated external defibrillators to prevent sudden death in school-aged children, *Pediatr Int*, 査読あり、58 巻 12 号、1261-1265 頁、2016 年
3. 江口真理子, 石前峰斎, 石井榮一. 小児白血病の発症過程 - 白血病幹細胞と clonal evolution-, *日本臨牀*, 査読なし、74 巻別冊 8 号、201-208 頁、2016 年
4. 石前峰斎, 江口真理子. 遺伝子プロファイリングと癌治療 白血病、癌と化学療法、査読なし、43 巻 11 号、1341-1345 頁、2016 年
5. Wu Z, Eguchi-Ishimae M, Yagi C, Iwabuki H, Gao W, Tauchi H, Inukai T, Sugita K, Ishii E, Eguchi M. "HMGA2 as a potential molecular target in KMT2A-AFF1-positive infant acute lymphoblastic leukaemia" *Br J Haematol*, 査読あり、171 巻 5 号、818-829 頁、2015 年
6. Gao W, Higaki T, Eguchi-Ishimae M, Iwabuki H, Wu Z, Yamamoto E, Takata H, Ohta M, Imoto I, Ishii E, Eguchi M. 2015. DGCR6 at the proximal part of the DiGeorge critical region is involved in conotruncal heart defects. *Human Genome Variation*, 査読あり、2 巻 15004、2015 年
7. Aoki Y, Watanabe T, Saito Y, Kuroki Y, Hijikata A, Takagi M, Tomizawa D, Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Kaneko A, Ono R, Sato K, Suzuki N, Fujiki S, Koh K, Ishii E, Shultz LD, Ohara O, Mizutani S, Ishikawa F. Identification of CD34+ and CD34- leukemia-initiating cells in MLL-rearranged human acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 査読あり、125 巻 6 巻、967-980 頁、2015 年
8. Tokuda K, Eguchi-Ishimae M, Iwabuki H, Kawakami S, Tauchi H, Ishii E, Eguchi M. Lineage-dependent skewing of loss of heterozygosity (LOH) of KRAS gene in a case of juvenile myelomonocytic leukemia, *European journal of haematology*, 査読あり、94 巻 2 号、177-181 頁、2015 年
9. 江口真理子, 石前峰斎, 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*、査読なし、56 巻 10 号、1871-1881 頁、2015 年
10. Tokuda K, Eguchi-Ishimae M, Yagi C, Kawabe M, Moritani K, Niiya T, Tauchi H, Ishii E, Eguchi M. CLTC-ALK fusion as a primary event in congenital blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm, *Genes, chromosomes & cancer*, 査読あり、53 巻 1 号、78-89 頁、2014 年
11. 江口真理子, 石前峰斎. 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*、査読なし、69 巻 5 巻、644-651 頁、2014 年

[学会発表](計 17 件)

1. 森谷京子、越智史博、米澤早知子、石前峰斎、江口真理子、田内久道、石井榮一、渋谷勇一、山田耕治. 化学療法中に腸管穿孔を来した生体肝移植後パーキットリンパ腫の一例. 第 58 回日本小児血液・がん学会、品川プリンスホテル、東京都港区、2016 年 12 月 17 日
2. 米澤早知子、森谷京子、石前峰斎、江口真理子、田内久道、石井榮一. 極端な偏食による巨赤芽球性貧血を発症した乳児の 1 例. 第 58 回日本小児血液・がん学会、品川プリンスホテル、東京都港区、2016 年 12 月 17 日
3. 石前峰斎、江口真理子、田内久道、米澤早知子、森谷京子、石井榮一. MLL-AF4 陽性急性リンパ性白血病の発症過程. 第 58 回日本小児血液・がん学会、品川プリンスホテル、東京都港区、2016 年 12 月 15 日
4. 江口真理子、石前峰斎、石井榮一. Impact of chromosome translocation in leukemia development. 第 78 回日本血液学会、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市、2016 年 10 月 15 日
5. 石前峰斎、江口真理子、森谷京子、米澤早知子、手塚優子、田内久道、石井榮一. Clonal evolution of CRLF2-rearranged ALL - Analysis of relapsed cases with P2RY8-CRLF2 fusion gene. 第 78 回日本血液学会、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市、2016 年 10 月 13 日
6. Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Wu Z, MingW, Iwabuki H, Tauchi H, Ishii E. HMGA2 as a potential molecular target in MLL-AF4 positive infant acute lymphoblastic leukemia.

- ICHG 2016 (The 13th International Congress of Human Genetics), Special Focused Session, 京都国際会議場, 京都府京都市, 2016年4月6日
7. Ozaki E, Eguchi-Ishimae M, Tezuka Y, Kagata K, Naruto T, Imoto I, Eguchi M, Ishii E. Clinical application of next generation sequencing in a family with undiagnosed genetic conditions. ICHG 2016 (The 13th International Congress of Human Genetics), 京都国際会議場, 京都府京都市, 2016年4月5日
  8. Tezuka Y, Eguchi-Ishimae M, Ozaki E, Muriko K, Eguchi M, Ishii E. FGFR1 is a possible candidate for the severe renal phenotype in a case of Wolf-Hirschhorn syndrome. ICHG 2016 (The 13th International Congress of Human Genetics), 京都国際会議場, 京都府京都市, 2016年4月4日
  9. 久保田真理、田内久道、井上真依子、新田美里、森谷京子、米澤早知子、石前峰齋、江口真理子、石井榮一、倉田美恵、増本純也。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、甲府富士屋ホテル、山梨県甲府市、2015年11月29日
  10. 米澤早知子、田内久道、新田美里、森谷京子、石前峰齋、江口真理子、石井榮一。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、甲府富士屋ホテル、山梨県甲府市、2015年11月28日
  11. 井上真依子、森谷京子、米澤早知子、江口真理子、石前峰齋、田内久道、石井榮一。非寛解期に臍帯血移植を行った先天性急性単球性白血病の一例。第57回日本小児血液・がん学会、甲府富士屋ホテル、山梨県甲府市、2015年11月27日
  12. 石前峰齋、江口真理子、武洲英、森谷京子、米澤早知子、井上真依子、久保田真理、新田美里、手塚優子、田内久道、石井榮一。Infant acute bilineal leukemia with MLL-AF4 fusion. 第77回日本血液学会、ANAクラウンプラザホテル金沢、石川県金沢市、2015年10月16日
  13. 新田美里、田内久道、米澤早知子、森谷京子、久保田真理、石前峰齋、江口真理子、石井榮一。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、大阪国際会議場、大阪府大阪市、2015年4月18日
  14. 石前峰齋、江口真理子、武洲英、文明、岩路秀彦、犬飼岳志、杉田完爾、石井榮一。HMGA2 as a potential molecular target in MLL-AF4 positive infant acute lymphoblastic leukemia. The 56<sup>th</sup> annual meeting of the American Society of Hematology. Moscone Center, San Francisco, USA, 2014年12月7日
  15. 森谷京子、久保田真理、新田美里、中野直子、石前峰齋、江口真理子、田内久道、石井榮一。慢性再発性多発性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、岡山コンベンションセンター、岡山県岡山市、2014年11月30日
  16. 武洲英、森谷京子、田内久道、井上真依子、久保田真理、新田美里、越智史博、石前峰齋、江口真理子、石井榮一。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、岡山コンベンションセンター、岡山県岡山市、2014年11月29日
  17. 石前峰齋、江口真理子、武洲英、八木千裕、文明、岩路秀彦、犬飼岳志、杉田完爾、石井榮一。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、大阪国際会議場、大阪府大阪市、2014年10月31日
- 〔図書〕(計2件)
1. 石前峰齋、江口真理子、石井榮一。乳児白血病における遺伝子プロファイリング、Annual Review 血液 2014、中外医学社、査読なし、90-97頁、2014年
  2. Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Ishii E. Hematopoietic stem cells: The basis of normal and malignant hematopoiesis. Hematological Disorders in Children - Pathogenesis and Treatment. Springer books、査読なし、2017年(in press)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
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
  - (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 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