

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670463

研究課題名(和文)染色体逆位特異的EVI1発現機構を用いた白血病幹細胞の同定と新規治療標的の探索

研究課題名(英文)Identification of leukemia-initiating cells in an inv(3)(q21q26) mouse model

研究代表者

山本 雅之(Yamamoto, Masayuki)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50166823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：染色体3q21と3q26との間の転座または逆位は、EVI1遺伝子の高発現を誘導することによって、予後不良の白血病を引き起こす。本研究では、3番染色体逆位を再現するモデルマウス(3q21q26マウス)を用いて白血病幹細胞を同定することを目的とした。白血病を発症した3q21q26マウスの骨髄では、B細胞マーカーであるB220陽性細胞と骨髄球マーカーであるGr1陽性細胞が増加していた。このうちB220陽性かつ前駆細胞マーカーc-Kit陽性細胞は、コロニー形成能を有し、ヌードマウスにおいて白血病を再現した。このことから、B220陽性c-Kit陽性画分に白血病幹細胞が含まれることが示された。

研究成果の概要(英文)：Chromosomal translocation and inversion between 3q21 and 3q26 gives rise to acute myeloid leukemia with poor diagnosis. Overexpression of EVI1 gene located on 3q26 driven by GATA2 distal hematopoietic enhancer located on 3q21 is a major cause of leukemogenesis. We previously generated a transgenic mouse model (3q21q26 mouse) recapitulating inv(3)(q21q26) allele by linking two bacterial artificial chromosome clones. To identify leukemia-initiating cells in leukemia with inv(3)(q21q26), we analyzed the leukemic 3q21q26 mouse bone marrow cells. The 3q21q26 mice developed leukemia in which B cell marker B220+ and myeloid cell marker Gr1+ populations were expanded. In these leukemic cells, B220+/Gr1-/c-Kit+ cells exhibited blast-like morphology and have colony-forming ability. In addition, nude mice, into which B220+/Gr1-/c-Kit+ cells were transplanted, developed leukemia. These results indicate that B220+/Gr1-/cKit+ cells contained leukemia-initiating cells in the leukemic 3q21q26 mice.

研究分野：分子生物学

キーワード：染色体転座 染色体逆位 白血病 EVI1 GATA2

1. 研究開始当初の背景

3 番染色体長腕 21 (3q21) 領域と同じく 3 番染色体長腕 26 (3q26) 領域との間の転座または逆位は、3q21 側に存在する *GATA2* 遺伝子エンハンサーが、3q26 領域に存在する *EVII* 遺伝子の高発現を誘導し、白血病を引き起こす。この 3q21 と 3q26 の転座および逆位を伴う白血病は、WHO 分類にて予後不良群に分類されている。その一因として、白血病の治療標的となる白血病幹細胞が同定されておらず、発症機構が分かっていないことがあげられる。

以前に私たちは、大腸菌人工染色体 (BAC) を用いて、3q21 領域と 3q26 領域との逆位アレルを約 200 kb にわたって再現するトランスジェニックマウス (3q21q26 マウス) を樹立した (図 1)。このマウスは、造血幹細胞および前駆細胞を含む細胞画分において高いヒト *EVII* 遺伝子の発現を示し、24 週令以降に白血病を発症した。このことから、3q21q26 マウスはヒト 3 番染色体転座および逆位を伴う白血病のモデルであると言える。

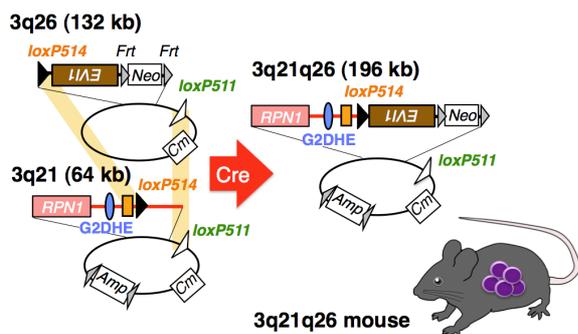


図 1 3q21q26 マウス
3q21 領域と 3q26 領域をそれぞれ含む二つの BAC クローンを Cre-LoxP システムを用いて結合することによって、逆位を再現するモデルマウスを樹立した。

2. 研究の目的

本研究では、3q21q26 マウスを用いて、3 番染色体転座・逆位を伴う白血病における白血病幹細胞を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 3q21q26 マウスを用いた白血病幹細胞の同定

白血病を発症した 3q21q26 マウスの骨髄細胞における分化マーカー発現様式をフローサイトメトリーによって解析する。それぞれの細胞画分の分離し、形態解析、コロニー形成能解析、ヌードマウスへの移植による白血病再構築解析を行うことによって、白血病幹細胞を含む細胞画分を同定する。

(2) 逆位アレル由来 *EVII* 遺伝子発現の可視化マウスの作製と解析

3q21 と 3q26 との間の逆位アレルによって制御される *EVII* 遺伝子の発現を 1 細胞レベルで可視化するために、逆位アレルの制御下に tdTomato 蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックマウスを樹立する。このマウスにおける tdTomato 発現を元に、白血病幹細胞を含む細胞画分をさらに詳細に明らかにすることを旨とする。

4. 研究成果

(1) 3q21q26 マウスにおける白血病幹細胞の同定

白血病を発症した 3q21q26 マウスの骨髄をフローサイトメトリーによって解析したところ、B 細胞マーカーである B220、骨髄球系細胞のマーカーである Gr1 のいずれかまたは両方が発現している細胞が増加していた。B220 単独陽性細胞 (B220+/Gr1-細胞)、B220 と Gr1 共陽性細胞 (B220+/Gr1+細胞)、Gr1 単独陽性細胞 (B220-/Gr1+細胞) を分離し、未熟な細胞のマーカーである c-Kit の発現を解析したところ、B220+/Gr1-細胞画分において c-Kit が強く発現していた (図 2)。

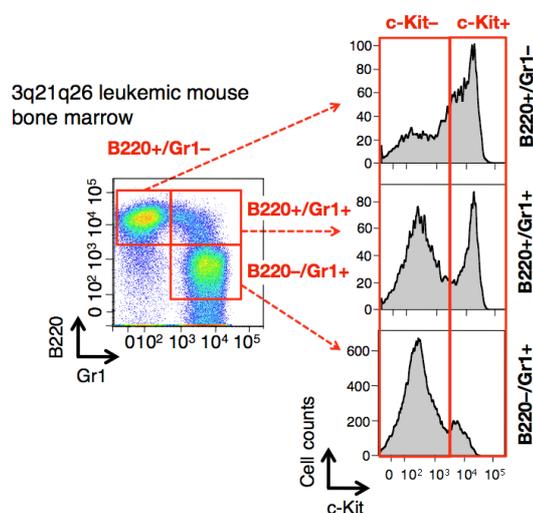


図 2 3q21q26 マウス白血病細胞のフローサイトメトリー解析

白血病細胞を B220 と Gr1 の発現によって三つの画分に分離し (左図)、それぞれの画分における c-Kit の発現を解析した (右図)。

それぞれの画分の細胞を c-Kit 発現の有無によって分取し、ライトギムザ染色にて形態を解析した。その結果、B220+/Gr1-/c-Kit+細胞は芽球様の形態を示しているのに対して、B220-/Gr1+/c-Kit±細胞は分葉した核をもつ分化した形態を示していた (図 3)。また、これらの細胞における *EVII* 遺伝子の発現を解析したところ、B220+Gr1-c-Kit+細胞にお

いて最も強い発現が観察された。

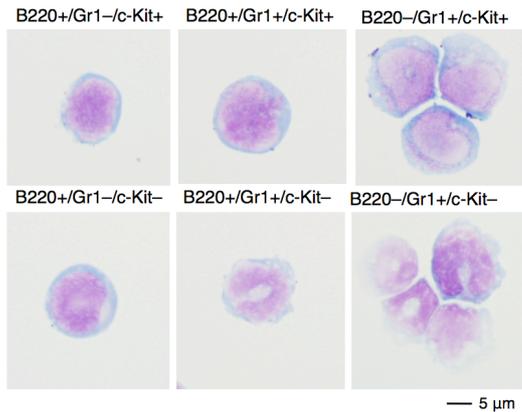


図3 3q21q26 マウス白血病細胞の形態解析
白血病細胞のライトギムザ染色を行い、形態を評価した。

さらに、これらの細胞を用いて、コロニーアッセイを行ったところ、B220+/Gr1-/c-Kit+細胞および B220+/Gr1+/c-Kit+細胞においてコロニー形成が確認された。しかしながら、B220+/Gr1-/c-Kit+細胞由来のコロニー形成細胞のみ継代可能であった。B220+/Gr1-/c-Kit+細胞由来のコロニー形成細胞の形態を解析したところ、芽球様の細胞とともに、分葉した核をもつ細胞がみられた。また、この細胞のフローサイトメトリー解析を行ったところ、B220-/Gr1+細胞が出現していることが確認できた。これらの結果から、白血病マウスの骨髄において、B220+/Gr1-/c-Kit+細胞中に前駆細胞が含まれており、この細胞が分化することによって B220+/Gr1+細胞や B220-/Gr1+細胞が産生されることが示唆された。

B220+/Gr1-/c-Kit+細胞中に白血病幹細胞が含まれているかを明らかにするために、白血病マウスの骨髄から B220+/Gr1-/c-Kit+細胞および B220+/Gr1+/c-Kit+細胞を分取し、ヌードマウスに移植した。B220+/Gr1-/c-Kit+細胞を移植したヌードマウスは移植後8週間以内にすべてのマウスが白血病を発症したのに対し、B220+/Gr1+/c-Kit+細胞を移植したヌードマウスでは白血病の発症はみられなかった。また、B220+/Gr1-/c-Kit+細胞を移植し、白血病を発症したヌードマウスの骨髄をフローサイトメトリーによって解析したところ、B220+/Gr1-/c-Kit+細胞だけでなく、Gr1+細胞が出現しており、ドナーマウスの白血病を再現していた。この結果から、B220+/Gr1-/c-Kit+細胞中に白血病幹細胞が含まれていることが明らかになった。

(2) 逆位アレル由来 *EVII* 遺伝子発現の可視化マウスの作製と解析

EVII 遺伝子の発現を tdTomato 蛍光によって

モニターするトランスジェニックマウスを作製した。3q21q26 マウスで用いた BAC 構築を用いて、その *EVII* 遺伝子の翻訳開始点に tdTomato の cDNA を相同組換えによって挿入した BAC クローン (3q21q26-tdTomato) を作製した (図4)。この BAC クローンをマウス受精卵に顕微注入することによって、トランスジェニックマウス (3q21q26-tdTomato マウス) を樹立した。

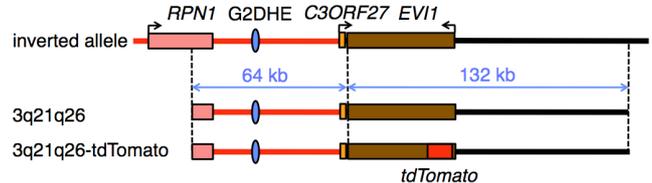


図4 3q21q26-tdTomato 構築
3q21q26 構築の *EVII* 遺伝子翻訳開始点に *tdTomato* 遺伝子を挿入した。

3q21q26-tdTomato マウスにおける tdTomato の発現様式を確認するために、骨髄細胞の tdTomato 蛍光をフローサイトメトリーによって解析した。造血幹細胞および前駆細胞を含む Lineage-/Scal+/c-Kit+ (LSK) 画分において強い tdTomato 蛍光が観察された (図5)。この tdTomato 蛍光は、分化した細胞 (CD19+、Gr1+、Ter119+細胞) では減少する傾向がみられたが、B220+細胞では、それ以外の細胞と比較して、高く維持されていた (図5)。この tdTomato の発現様式は、3q21q26 マウスで見られる *EVII* 遺伝子の発現様式と一致していた。

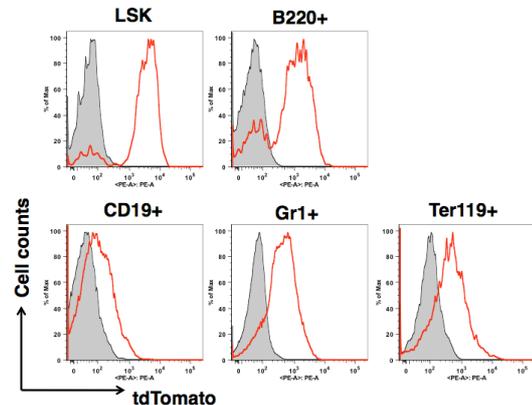


図5 3q21q26-tdTomato の発現様式
3q21q26-tdTomato マウスの骨髄細胞を分取し、それぞれの tdTomato 発現を解析した。灰色: 野生型マウス、赤: 3q21q26-tdTomato マウス。

白血病発症前のマウス骨髄内で、B220+細胞において高い tdTomato 蛍光および *EVII* 遺伝子の発現が観察されたことは、白血病を発症した 3q21q26 マウスにおいて、B220+細胞に高い *EVII* 遺伝子発現が観察されることおよび、B220+細胞内に白血病幹細胞が含まれる

ことと相関する。今後、3q21q26 マウスと3q21q26-tdTomato マウスとを交配することにより、白血病発症マウスにおける tdTomato 蛍光を観察する。これにより、B220+/Gr1-/c-Kit+細胞内の白血病幹細胞画分をさらに詳細に明らかにできると考えられる。

なお、本研究期間中に3q21q26 マウスを理化学研究所バイオリソースセンターへ寄託した(登録番号RBRC09508)。

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 7 件)

1. Keleku-Lukwete N, Suzuki M, Otsuki A, Tsuchida K, Katayama S, Hayashi M, Naganuma E, Moriguchi T, Tanabe O, Engel JD, Imaizumi M, Yamamoto M. Amelioration of inflammation and tissue damage in sickle cell model mice by Nr2f2 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **112**, 12169-12174 (2015) 査読有 doi: 10.1073/pnas.1509158112.
 2. Moriguchi T, Suzuki M, Yu L, Takai J, Ohneda K, and Yamamoto M. Progenitor stage-specific activity of a cis-acting double GATA motif for Gatal gene expression. *Mol Cell Biol* **35**, 805-815 (2015) 査読有 doi: 10.1128/MCB.01011-14.
 3. Moriguchi T, Yu L, Takai J, Hayashi M, Satoh H, Suzuki M, Ohneda K, and Yamamoto M. The Human GATA1 Gene Retains a 5' Insulator That Maintains Chromosomal Architecture and GATA1 Expression Levels in Splenic Erythroblasts. *Mol Cell Biol* **35**, 1825-1837 (*co-first authors) (2015) 査読有 doi: 10.1128/MCB.00011-15.
 4. Ohmori S, Moriguchi T, Noguchi Y, Ikeda M, Kobayashi K, Tomaru N, Ishijima Y, Ohneda O, Yamamoto M, and Ohneda K. GATA2 is critical for the maintenance of cellular identity in differentiated mast cells derived from mouse bone marrow. *Blood* **125**, 3306-3315 (2015) 査読有 doi: 10.1182/blood-2014-11-612465.
 5. Yamazaki H*, Suzuki M*, Otsuki A, Shimizu R, Bresnick EH, Engel JD, and Yamamoto M. A remote GATA2 hematopoietic enhancer drives leukemogenesis in inv(3)(q21;q26) by activating EVI1 expression. *Cancer Cell* **25**, 415-427 (2014) (cover photo and commentary; *co-first author) 査読有 doi: 10.1016/j.ccr.2014.02.008.
6. Moriguchi T, and Yamamoto M. A regulatory network governing Gatal and Gata2 gene transcription orchestrates erythroid lineage differentiation. *Int J Hematol* **100**, 417-427 (2014) 査読有 doi: 10.1007/s12185-014-1568-0.
 7. Suzuki M, Yamamoto M, and Engel JD. Fetal globin gene repressors as drug targets for molecular therapies to treat the β -globinopathies. *Mol Cell Biol* **34**, 3560-3569 (2014) 査読有 doi: 10.1128/MCB.00714-14.
- [学会発表] (計 11 件)
1. 鈴木未来子「染色体転座を伴う白血病モデルマウスの開発と EVI1 陽性白血病の解析」第 386 回東北医学会例会シンポジウム、東北大学医学部良陵会館、仙台、2015 年 11 月 17 日
 2. 鈴木未来子「染色体転座による原がん遺伝子 EVI1 誘導機構の解析」第 8 回 Symphony、ホテルメトロポリタンエドモンド飯田橋、東京、2015 年 9 月 26-27 日
 3. 鈴木未来子「染色体転座に起因する白血病誘導エンハンサーの解析」第 26 回がん・エピゲノム研究会、東北大学医学部良陵会館、仙台、2015 年 7 月 29 日
 4. 片山紗乙莉, 鈴木未来子, 呉繁夫, 山本雅之. EVI1 遺伝子高発現白血病における白血病発症機構. 第 81 回日本生化学会東北支部例会, 片平さくらホール, 仙台, 2015 年 5 月 9 日
 5. 片山紗乙莉, 鈴木未来子, 呉繁夫, 山本雅之. 染色体転座モデルマウスを用いた EVI1 遺伝子高発現白血病幹細胞の解析. 平成 26 年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ 個体レベルでのがん研究の新展開, 琵琶湖ホテル, 滋賀, 2015 年 2 月 5-6 日
 6. Suzuki M. "A novel mouse model harboring human inv(3)(q21q26) allele reveals mechanisms underlying EVI1-expressing leukemia" Functional Genomics and Experimental Medicine, Tohoku University, Sendai, Japan, February 3, 2015
 7. 片山紗乙莉, 鈴木未来子, 呉繁夫, 山本雅之. EVI1 白血病モデルマウスにおける白血病幹細胞の同定. 東北大学大学院医学系研究科第 8 回リトリート大学院生研究発表会, 東北大学医学部 6 号館仙台, 2015 年 1 月 17 日
 8. 鈴木未来子, 片山紗乙莉, 山寄博未, James Douglas Engel, 山本雅之. EVI1 陽性白血病において EVI1 発現量が白血病細胞の分化形態を規定する. 第 87 回日本生化学会大会, 国立京都国際会館,

- 京都, 2014年10月16-18日
9. Moriguchi T, Yu Lei Takai J, Hayashi M, Satoh H, Suzuki M, Ohneda K and Yamamoto M. *Human GATA1 Gene Retains 5' Insulator that Maintains Chromosomal Architecture and Expression Level in Hematopoietic Cells*. Sep 7-9th. Hemoglobin Switching Conference, Oxford, UK. (2014)
 10. Suzuki M, Yamazaki H, Katayama S, Otsuki A, Shimizu R, Bresnick EH, Engel JD and Yamamoto M. *GATA2 distal hematopoietic enhancer induces EVI1-expressing leukemia in inv(3)(q21;q26)*. The 19th Hemoglobin Switching Conference, Oxford, UK (2014)
 11. 鈴木未来子, 山寄博未, 大槻晃史, 清水律子, Emery H. Bresnick, James Douglas Engel, 山本雅之「染色体転座・逆位における *EVI1* 遺伝子活性化および白血病発症機構の解析」第10回血液学若手研究者勉強会(麒麟塾), コクヨホール(品川), 2014年7月12日

[その他]

ホームページ等

研究内容紹介

<http://www.dmbc.med.tohoku.ac.jp/cgi-bin/project/view.cgi>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 雅之 (YAMAMOTO MASAYUKI)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50166823

(2) 研究分担者

鈴木 未来子 (SUZUKI MIKIKO)
東北大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：80508309