

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2006～2009

課題番号：18591085

研究課題名(和文) 白血病関連転写因子 TEL の ES 細胞を用いた機能解析と新規結合蛋白の同定

研究課題名(英文) The role of TEL in embryonic stem cell differentiation, and identification of a new interacting protein.

研究代表者

江口 真理子 (EGUCHI MARIKO)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40420781

研究分野：小児科学

科研費の分科・細目：小児血液学

キーワード：TEL/ETV6, 転写因子, 造血細胞分化, ES 細胞

1. 研究計画の概要

正常な細胞の発生・分化に関わる転写因子の変異は、様々な病的状態や癌化を引き起こすため、その正常な機能およびその変異体が腫瘍化に果たす役割を理解することは癌の予防や新しい治療法の開発のために重要である。TEL 遺伝子は血液および血管の分化に必須であり、様々な造血器腫瘍や固形腫瘍で融合遺伝子を形成することが知られているが、その機能についてはまだ不明な点が多い。本研究では正常 TEL の機能および転座型 TEL による腫瘍化のメカニズムの解明を目的として以下の解析を行う。(1)発生工学的手法(マウス ES 細胞)を用いて血液細胞の発生・分化・増殖における TEL の役割を明らかにする。(2)TEL の新規結合蛋白を同定し、TEL による血液細胞の分化制御機構を解明する。(3) TEL キメラ遺伝子産物の機能解析を行い、TEL 関連転座による細胞の腫瘍化機構を解明する。

2. 研究の進捗状況

(1)転写因子 TEL が造血細胞の分化・増殖に与える影響について、マウス ES 細胞の系を用いて検討を行った。野生型 ES 細胞から LIF を除去し血液細胞に分化させると、*AML1*、*GATA1*、*GATA2*、*CD41* などの血液細胞特異的な遺伝子は分化開始 5 日後頃から発現が認められた。TEL はそれらに先駆けて分化開始 1～2 日後から発現し、5～6 日後に発現が増強するが、さらに分化した CD71 陽性細胞では TEL の発現は急速に低下していた。

(2)Chicken β -actin (CAG)プロモーター下に EGFP-TEL 融合蛋白を発現するベクターを作成、ES 細胞に遺伝子導入して恒常的に EGFP-TEL を発現する ES 細胞株を樹立し、TEL

の血液分化に与える影響を詳細に検討した。CAGプロモーター下に TEL を発現させた ES 細胞では TEL の発現量は野生型 ES 細胞の約 5 倍に増加しており、核内に複数の焦点を形成して局在していた。分化開始 7 日後に colony assay を行うと、TEL を高発現した ES 細胞では野生型 ES 細胞と比較して CFU-GEMM および BFU-E の有意な増加が認められた。FACS 解析を行うと、TEL を高発現する ES 細胞では、血液分化に伴い通常では発現が低下する Flk1 や c-kit の発現が遷延する傾向が認められた。(3)赤芽球分化における TEL の役割を検討するため、血液細胞特異的な GATA1 の遺伝子発現制御領域下に TEL を発現する ES 細胞を作製した(GATA1-TEL ES)。この ES 細胞は、分化開始後 5 日頃より GATA1 の発現上昇とともに TEL の発現も誘導され、以降コントロール ES 細胞と比較して有意に TEL の発現が増加していた。TEL の発現増加に関わらず GATA1-TEL ES 細胞の赤芽球への分化能は野生型の ES 細胞と同様であり、CD71 陽性細胞群の割合も対照群と比較して明らかな差は認めなかったが、コロニーアッセイを行うと GATA1-TEL ES 細胞では対照群と比較して BFU-E が有意に高値であった。また分化開始 7 日後の細胞を EPO 存在下で培養すると対照群と比較して CD71+TER119+分画が有意に増加した。

以上よりマウス ES 細胞の血液分化系において、TEL は細胞の未分化性を維持するとともに、血液前駆細胞を増加させる働きを有する可能性が示唆された。現在 TEL の標的遺伝子を定量的 PCR 等にて検討中である。

(4) TEL による血液細胞の分化制御機構を解明することを目的に、TEL に結合する蛋白を同定するため Two Hybrid Analysis を行った。

その結果これまで報告されていない新たな蛋白が TEL と結合する可能性が示唆された。GST プルダウンアッセイを行い、両者の *in vitro* での結合を確認した。現在 TEL および TEL 結合蛋白を同時に発現する ES 細胞を作製し、血液分化における 2 者の細胞内局在の変化および分化に与える影響を検討中である。

3. 現在までの達成度

予定よりやや遅れている。研究代表者の異動により研究環境の再整備の必要性が生じたこと、および出産により仕事量の減少が避けられなかったことがもっとも影響していると考えられる。

4. 今後の研究の推進方策

(1) 血液細胞分化の過程での TEL の役割については把握できたが、そのメカニズムはまだ不明である。今後 ES 細胞分化の各ステップでどのような遺伝子が TEL により影響を受けるかを解析し、TEL の標的遺伝子を見出す。また TEL を knockdown させることによって TEL の変異や欠失が細胞の腫瘍化にどのような役割を果たすかを検討する。

(2) TEL と新規結合蛋白の細胞分化における役割を解明するため、*in vivo* での両者の結合を証明するとともに、分化の各ステップで両者が果たす役割を ES 細胞にて検討する。

(3) *TEL-TRKC* や *TEL-AML1* など TEL キメラ遺伝子産物を発現する ES 細胞を用いてその機能解析を行い、TEL 関連転座による分化障害や腫瘍化のメカニズムを検討する。

5. 代表的な研究成果

(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 Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Maki K, Porcher C, Shimizu R, Yamamoto M, Mitani K. Leukemia-related transcription factor TEL/ETV6 expands erythroid precursors and stimulates hemoglobin synthesis. *Cancer Sci*(査読有り), in press

② Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Ohyashiki K, Yamagata T, Mitani K. Enhanced expression of the EVI1 gene in NUP98/HOXA-expressing leukemia cells. *International Journal of Hematology* (査読有り) 89, 2009, 253-256

③ Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Kempski H, Greaves M. NOTCH1 mutation can be an early, prenatal genetic event in T-ALL. *Blood*(査読有り) 111, 2008, 376-378

④ Tauchi H, Tomizawa D, Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Koh K, Hirayama M, Miyamura N, Kinukawa N, Hayashi Y, Horibe K, Ishii E. Clinical features and outcome of MLL gene rearranged acute lymphoblastic

leukemia in infants with additional chromosomal abnormalities other than 11q23 translocation. *Leukemia Research*(査読有り) 32, 2008, 1523-1529

⑤ Tomizawa D, Koh K, Sato T, Kinukawa N, Morimoto A, Isoyama K, Kosaka Y, Oda T, Oda M, Hayashi Y, Eguchi M, Horibe K, Nakahata T, Mizutani S, Ishii E. Outcome of risk-based therapy for infant acute lymphoblastic leukemia with or without an MLL gene rearrangement, with emphasis on late effects: a final report of two consecutive studies, MLL96 and MLL98, of the Japan Infant Leukemia Study Group. *Leukemia*(査読有り) 21, 2007, 2258-2263

⑥ Tokita K, Maki K, Tadokoro J, Nakamura Y, Arai Y, Sasaki K, Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Mitani K. Chronic idiopathic myelofibrosis expressing a novel type of TEL-PDGFRB chimera responded to imatinib mesylate therapy. *Leukemia*(査読有り) 21, 2007, 190-192

⑦ Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Knight D, Kearney L, Slany R, Greaves M. MLL chimeric protein activation renders cells vulnerable to chromosomal damage: an explanation for the very short latency of infant leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*(査読有り) 45, 2006, 754-760

[学会発表] (計 5 件)

① Minenori Eguchi-Ishimae, Mariko Eguchi, Kazuhiro Maki, Ritsuko Shimizu, Masayuki Yamamoto, Kinuko Mitani. Leukemia-related transcription factor TEL expands erythroid precursors. 第 66 回日本癌学会総会, 2007 年 10 月 4 日, 横浜

② 江口真理子, 石前峰斎, 牧和宏, 清水律子, 山本雅之, 三谷絹子. 白血病関連転写因子 TEL は赤芽球前駆細胞を増加させる. 第 69 回日本血液学会総会・第 49 回臨床血液学会総会, 2007 年 10 月 11 日, 横浜

③ 石前峰斎, 江口真理子, 大屋敷純子, 大屋敷一馬, 三谷絹子. 7;11 転座における HoxA 遺伝子とその cofactor の発現. 第 69 回日本血液学会総会・第 49 回臨床血液学会総会, 2007 年 10 月 11 日, 横浜

④ 江口真理子, 石前峰斎, 三谷絹子, Robert Slany, Mel Greaves. MLL 融合遺伝子により DNA damage が蓄積する. 第 68 回日本血液学会総会・第 48 回臨床血液学会総会, 2006 年 10 月 8 日, 福岡

⑤ 石前峰斎, 江口真理子, 三谷絹子, Helena Kempski, Mel Greaves. T-ALL における Notch1 遺伝子変異は胎生期に形成される. 第 68 回日本血液学会総会・第 48 回臨床血液学会総会, 2006 年 10 月 7 日, 福岡