

平成21年 5月12日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591114
 研究課題名（和文） MDS/AMLの多段階発症・進展機構における、AML1遺伝子変異の役割解明
 研究課題名（英文） AML1 point mutations play a pivotal role in the pathogenesis of MDS/AML
 研究代表者
 原田 浩徳（HARADA HIRONORI）
 広島大学・原爆放射線医科学研究所・講師
 研究者番号：10314775

研究成果の概要：骨髄異形成症候群(MDS)の発症や骨髄増殖性疾患(MPD)の白血病化に関わる遺伝子異常として、AML1 遺伝子点突然変異を発見した。ヒト造血幹細胞を用いて AML1 変異体の役割を解析し、MDS 発症の主原因となること、MPD から白血病化していく原因となっていることを見出した。さらに AML1 変異体と他の遺伝子異常を共に造血幹細胞に発現させることにより、MDS 発症機構を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：骨髄異形成症候群, AML1/RUNX1, 骨髄増殖性疾患, 協調遺伝子変異, Evi1, BMI-1, 造血幹細胞,

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは MDS の多段階発症機構の全容解明を目指し、分子標的治療の開発につなげていくことを目標としている。MDS 患者の遺伝子異常を解析した結果、AML1 点突然変異が高頻度であることを見出した。さらに、AML1 点変異を持つ患者では RTK～RAS 経路の遺伝子異常を高頻度に合併することも発見した。この結果を踏まえ、AML1 点変異と RAS 経路遺伝子異常の重複により MDS を発症することを実証しようとしており、これ

までにマウスの造血幹細胞への導入を行った。研究代表者らのこれまでの研究実施状況は以下のとおりである。

(1) まず、原爆被爆者の MDS 患者では AML1 の N 末端領域の点突然変異が非常に高率であることを発見した。さらに、化学療法や放射線療法を受けた後に MDS や急性骨髄性白血病 (AML) を発症した症例にも、AML1 点変異が高率に認められることを見出した。

(2) 次に全ての MDS 患者で AML1 遺伝子全長を解析した結果、芽球 5%以上の MDS

(RAEB、RAEBt、MDS 由来の AML : これらを MDS/AML と定義) の約 25% に AML1 の点変異が認められ、それ以外の血液疾患ではまれであることを発見した。さらに機能解析により、AML1 変異体が AML1 としての機能を消失し、正常 AML1 に対する拮抗作用をもつことを示した。以上より、AML1 点変異が AML1-MTG8 などのキメラ蛋白と同様、MDS/AML 発症のマスターイベントであることを示し、AML1 点変異を持つ MDS/AML を遺伝子レベルからの一疾患単位として新たに提唱した。

(3) しかし、先天的に AML1 点変異を有し高率に白血病へ移行する家族性血小板減少症 (FPD/AML) でさえ、白血病発症は 10 歳以降であることから、付加的な遺伝子異常の蓄積が発症に必要であると予測された。そこで、AML1 点変異を持つ群と持たない群で各種遺伝子異常の頻度を比較し、AML1 点変異と協調して MDS/AML 発症に関与する遺伝子変異の同定を試みた。その結果、AML1 変異群では高率に SHP2、NF1、RAS の遺伝子変異を認め、RTK~RAS シグナル伝達系がセカンドヒットの好発部位であることを明らかにした。一方、AML1 正常群では p53 変異が高率で、腫瘍化の機序が異なると推測した。

(4) これまで、AML1 遺伝子改変マウスは研究代表者らのグループ及び他のグループにより解析され、白血病の発症が期待されてきた。ところが、AML1-MTG8 ノックインマウスは胎生致死であり、生後 AML1-MTG8 を誘導するマウス系でも、変異誘導剤の投与なしには白血病を発症しなかった。そこで研究代表者らは、これまでの結果を踏まえて、AML1 点変異と RAS 経路遺伝子異常の両方を造血幹細胞に導入してマウスに移植すれば、MDS/AML が発症すると予測した。

(5) ところが最近、研究代表者と共同研究者のグループが、MDS/AML 患者でみられる AML1 点変異を単独で導入した造血幹細胞を移植したマウスが、長期飼育中に造血異常を来たして死に至ることを見出した。AML1-MTG8 キメラ蛋白の方がはるかに強い転写抑制作用を有しているにも関わらず、自然には白血病を発症しないのに対し、点変異体を導入したマウスが自然に白血病で死亡することは、これまでの常識を覆す驚きであった。飼育中に何らかのセカンドヒットを得たのではないかと考え、更に解析を行っている。

(6) これまで行ってきたマウスの造血幹細胞を用いた実験系では、細胞の異形成や増殖性、あるいは腫瘍としての生物活性などの点で、実際の MDS/AML 患者との乖離がある。ヒト体内で起こっている疾患現象をより深く解明するため、ヒト造血幹細胞を用いたモデルが必要と考えられた。

(7) また二次性の AML の中には、骨髄増殖性疾患 (MPD) からの進展症例も少なからず含まれている。これらの患者でも AML1 点変異は高頻度で、しかも高率に JAK2 点変異を併せ持っていることが研究代表者らの最近の解析で明らかになった。これらの症例では慢性期 (白血病発症前) に既に JAK2 の変異を有しており、「セカンドヒット」としてではなく、「増殖性変異パートナー」が先行して存在したと考えられる。

2. 研究の目的

以上これまでの研究成果を踏まえ、本研究計画では「ヒト造血幹細胞」を用いて骨髄異形成症候群/骨髄増殖性疾患(MDS/MPD)から白血病化していく上で、AML1 遺伝子点突然変異の果たす役割を解明する。MDS/MPD では、高頻度に白血病への進展が見られ、この分子メカニズムの一端を AML1 遺伝子の点突然変異が担っている。本研究では、AML1 点突然変異および協調する他の遺伝子異常を共に造血幹細胞に発現させて、MDS/MPD からの白血病化の分子機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト造血幹細胞への AML1 遺伝子変異と協調遺伝子変異の導入

AML1 変異体を緑(EGFP)、協調遺伝子変異体を赤(DSRED)で標識したレトロウイルスベクターを構築し、ヒト造血幹細胞に導入する。AML1 変異幹細胞、協調遺伝子変異幹細胞、および両変異を持つ幹細胞それぞれの *in vitro* での増殖反応およびコロニー形成能などを検討する。

① 遺伝子変異全長 cDNA の作製

AML1 変異 cDNA は患者検体で発見された変異と同じものを約 10 種類既に作製している。このうち N 末端側、C 末端側変異それぞれ 2 種類ずつ使用する。AML1-MTG8 キメラ遺伝子 cDNA も用いる。SHP2 変異 cDNA は 2 種類作製し、c-kit 変異 cDNA、JAK2 変異 cDNA (全てヒト遺伝子) も作製する。万一ヒト遺伝子作製が困難な場合、既に入手済みのマウス cDNA を用いる。

② 導入ベクターの構築

造血幹細胞に AML1 変異体および協調遺伝子変異体を導入するためのレトロウイルスベクター pMXs は、既に入手済みである(東大医科研:北村俊雄先生より供与)。AML1 変異体は緑色標識(IRES-EGFP)し、協調遺伝子変異体は赤色標識(IRES-DSRED)する。

③ ヒト造血幹細胞への導入

個々のレトロウイルスベクターを、パッケージング細胞である PLAT-GP を用いて、高力価のレト

ロウイルスを得る。出産時に不要となった胎盤より臍帯血を採取し、単核球分離後 CD34 陽性細胞を精製して造血幹細胞を採取する。前処置として 48 時間 IL-6、SCF、TPO で刺激しておき、このレトロウイルスを感染させる。フローサイトメーターで GFP 陽性、DSRED 陽性および両者とも陽性の分画を確認する。精製する場合はセルソーターで分取する。

④ *in vitro* 増殖反応およびコロニー形成能の検討

遺伝子導入した細胞を各種サイトカイン存在下で培養し、分化・増殖能、生存率などを検討する。AML1 変異を GFP で導入した未ソートの正常細胞・変異細胞混在系では、骨髄のモデルとして AML1 変異細胞が増殖能を獲得するのか、それともむしろ先に死滅してしまうのかが観察できる。生体蛍光顕微鏡下では、GFP 陽性細胞と陰性細胞が少ない細胞数でリアルタイムに検討できる。AML1 変異幹細胞、協調遺伝子変異幹細胞、および両変異を持つ幹細胞それぞれの、各種サイトカインに対する反応性および分化能を液体培養およびメチルセルロース培養条件で検討する。さらに、メチルセルロース培養に続いて液体培養を行う 2 ステップアッセイにより、自己複製能を検討する。

⑤ マウスへの移植実験

遺伝子変異幹細胞を放射線処理マウスに注入する。移植されたマウスの末梢血液所見およびパラフィン固定した造血臓器の病理組織所見を経時的に検討する。また造血細胞の表面マーカーを解析する。骨髄細胞の *in vitro* 増殖能およびコロニー形成能を検討する。

⑥ AML1 点変異と協調遺伝子異常を持つ幹細胞の遺伝子プロファイリングの検討

遺伝子異常を持つ幹細胞が正常幹細胞と比較してどのような違いがあるかを、マイクロアレイを用いて検討する。

(2) JAK2 変異造血幹細胞への AML1 遺伝子変異の導入

JAK2 変異を既に有する造血幹細胞に、AML1 変異を導入して白血病発症を検証する。

① 遺伝子変異導入造血幹細胞の作成

JAK2 変異を有する MPD 患者の骨髄から CD34 陽性細胞を分取して増幅し、AML1 遺伝子変異をレトロウイルスにより導入する。

② *in vitro* 増殖反応およびコロニー形成能の検討

遺伝子導入した細胞を各種サイトカイン存在下で培養し、分化・増殖能、生存率などを検討する。各種サイトカインに対する反応性および分化能を液体培養およびメチルセルロース培養条件で検討する。さらにメチルセルロース培養と液体培養を交互に行うことによる 2 ステップアッセイを行い、自己再生能を検討する。

4. 研究成果

2007 年度は、AML1 変異体および協調遺伝子変異体を組み込んだウイルスベクターを構築してヒト造血幹細胞に導入し、それぞれの幹細胞で *in vitro* での増殖反応およびコロニー形成能などを検討した。まず AML1 点変異および野生型、AML1-MTG8、SHP2 変異、c-kit 変異、JAK2 変異、N-RAS 変異、BMI-1、EVI-1 などの cDNA を作製し、造血幹細胞に AML1 変異体を導入するためのレトロウイルスベクタープラスミド pMXs に組み込んだ。これらには実験系により FLAG、HA などのタグや GFP、DsRed などの蛍光、あるいは neo、puro などの耐性遺伝子を付加した。まずマウス造血幹細胞に AML1 点変異体を導入して移植する実験系では、長期観察期間中に高率に白血病の発症を認めた。これはレトロウイルスによる遺伝子導入の際にセカンドヒットとなる遺伝子 (Evi1 など) に組み込まれるため、これらのマウスでは Evi1 の発現が亢進しており、実際に AML1 変異体と Evi1 を同時に導入して移植すると、白血病の発症は早くなった。次にヒト臍帯血由来造血幹細胞に AML1 点変異を導入したところ、変異の種類により全く異なる増殖形態をとることが判明し、それぞれの変異を有する患者症例の臨床病態に一致していた。D171N 変異体は、分化がブロックされて増殖も細胞死もしない状態となったため、他の遺伝子異常の獲得が必要と考えられた。一方 S291fsX300 変異体は、CD34 陽性細胞が増加していったことから、変異体自体増殖能を持っていると考えられた。

2008 年度は、引き続き AML1 変異体および協調遺伝子変異体を組み込んだウイルスベクターをヒト造血幹細胞に導入し、共発現による造血幹細胞の動態を *in vitro* での増殖反応およびコロニー形成能などで解析した。まず AML1 点変異を導入した造血幹細胞の遺伝子プロファイルを作成し、BMI-1 の発現が変異体のタイプにより異なることを見いだした。D171N 変異体では発現低下、S291fsX300 変異体では発現亢進していることから、造血幹細胞培養実験の結果は BMI-1 の発現が影響していると予測された。ところが患者サンプルでは、D171N タイプの症例で BMI-1 の著しい発現亢進が認められたことから、付加的に BMI-1 発現が誘導されたと考えられた。そこで D171N 変異体および BMI-1 を段階的に共発現させたところ、増殖能が付加され、MDS 病態を再現できた。次に JAK2 変異を有する MPD 患者の CD34 陽性細胞に AML1 点変異を導入した。するとコントロールと比較して幼弱細胞の増加

や自己再生能の亢進が認められ、AML1 変異体がMPD患者の白血病化開始因子であることが示唆された。

以上、本研究ではヒト造血幹細胞を用いてAML1 遺伝子点突然変異の役割解析し、骨髓異形成症候群(MDS)の発症の根幹となること、骨髓増殖性疾患(MPD)から白血病化していく原因となっていることを見出した。さらにAML1 点突然変異および協調する他の遺伝子異常を共に造血幹細胞に発現させて、MDS分子メカニズムを明らかにし、学会・論文等で報告した。一部は現在投稿中である。

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 8 件)

1. Harada Y, Harada H: Molecular Pathways Mediating MDS/AML with Focus on AML1/RUNX1 Point Mutations. *Journal of Cellular Physiology* 2009 (in press). 査読有総説
2. Watanabe-Okochi N, Kitaura J, Ono R, Harada H, Harada Y, Komeno Y, Nakajima H, Nosaka T, Inaba T, Kitamura T: AML1 mutations induced MDS and MDS/AML in a mouse BMT model. *Blood* 111(8), 4297-4308, 2008. 査読有
3. Zharlyganova D, Harada H, Harada Y, Shinkarev S, Zhumadilov Z, Zhunusova A, Tchaizhunusova NJ, Apsalikov KN, Kemaikin V, Zhumadilov K, Kawano N, kimura A, Hoshi M: High frequency of AML1/RUNX1 point mutations in radiation-associated myelodysplastic syndrome around Semipalatinsk Nuclear Test Site. *Journal of Radiation Research* 49(5), 549-555, 2008. 査読有
4. Hirabayashi K, Kawano N, Ohtaki M, Harada Y, Harada H, Muldagaliyev T, Apsalikov K, Hoshi M: Health status of radiation exposed residents living near the Semipalatinsk Nuclear Test Site based on health assessment by interview. *Hiroshima Journal of Medical Science* 57(1), 27-35, 2008. 査読有
5. Zharlyganova D, 原田結花, 原田浩徳, Chaizhunusova N, Apsalikov K, Zhunusova A, 川野徳幸, 星 正治, 木村昭郎: セミパラチンスク核実験場近郊住民における骨髓異形成症候群 (MDS) の遺伝子学的検討. *広島医学* 61(4), 91-93, 2008. 査読無
6. 原田浩徳, 原田結花: MDS の発症と進展. *Biotherapy* 22(1), 1-8, 2008. 査読無総説
7. 原田浩徳, 原田結花: 〈平成 17 年度第 47 回日本臨床血液学会: MDS 特別賞受賞論文〉 AML1/RUNX1 点突然変異を持つ MDS/AML の多段階発症機構. *臨床血液* 48(7), 541-546, 2007. 査読無総説
8. Li X-L, Arai Y, Harada H, Shima Y, Yoshida H, Rokudai S, Aikawa Y, Kimura A, Kitabayashi I: Mutations of the HIPK2 gene in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome impair AML1- and p53-mediated transcription. *Oncogene* 26(51), 7231-7239, 2007. 査読有

[学会発表] (計 14 件)

1. Harada H: AML1 mutation in AML/MDS. 6th Korean Society of Hematology AML/MDS Working Party Symposium, 3rd Korea-Japan Joint Symposium on Molecular Targets and AML/MDS Therapeutics, Seoul, Korea, 2009.3.14.
2. 今川 潤, 原田浩徳, 原田結花, 丁 曄, 兵頭英出夫, 木村昭郎: 慢性骨髓増殖性疾患からの白血病移行メカニズムの解明. 第 70 回日本血液学会総会, 京都, 2008. 10. 12.
3. 加藤菜穂子, 米野由希子, 渡辺 (大河内) 直子, 原田浩徳, 原田結花, 北浦次郎, 北村俊雄: AML, MDS でみられた C/EBP α 変異体のマウス BMT モデルによる解析. 第 70 回日本血液学会総会, 京都, 2008. 10. 11.
4. 渡辺 (大河内) 直子, 北浦次郎, 原田浩徳, 米野由希子, 加藤菜穂子, 小埜良一, 野阪哲哉, 中島秀明, 北村俊雄: マウス骨髓移植モデルにおいて, Evi 1 は MDS/AML を誘発する. 第 70 回日本血液学会総会, 京都, 2008. 10. 11.
5. 原田浩徳, 原田結花, 丁 曄, 今川 潤, 許 泰一, 木村昭郎: AML1/RUNX 1 点変異部位による MDS/AML 発症機構の相違と新たな病型分類. 第 70 回日本血液学会総会, 京都, 2008. 10. 11.
6. 丁 曄, 原田浩徳, 原田結花, 今川 潤, 許 泰一, 木村昭郎: AML1/RUNX 1 点変異による MDS/AML 多段階発症機構. 第 70 回日本血液学会総会, 京都, 2008. 10. 10.
7. Harada H, Ding Y, Harada Y: Distinct molecular pathways and clinical features of MDS/AML by 2 types of AML1/RUNX1 mutations. 15th International RUNX Workshop, Provincetown, USA, 2008.9.16.
8. 今川 潤, 原田浩徳, 原田結花, 丁 曄, 木村昭郎: C/EBP α 変異パターンによる急性骨髄性白血病および骨髓異形成症候群の病型解析. 第 105 回日本内科学会講演会, 東京, 2008. 4. 11.
9. Zharlyganova D, Harada Y, Harada H, Zhumadilov Z, Zhunusova A,

- Chaizhunossova N, Shinkarev S, Kimura A, Hoshi M: High incidence of AML1 point mutations in myelodysplastic syndrome among residents of the Semipalatinsk Nuclear Test Site. The Fifth International Symposium of Hiroshima University 21st Century COE program, Hiroshima, Japan, 2008.1.24.
10. 原田浩徳, 原田結花, 丁 曄, 許 泰一, 木村昭郎: C/EBP α 変異パターンによるAMLおよびMDS病型の解析. 第69回日本血液学会総会・第49回日本臨床血液学会総会, 横浜, 2007. 10. 11.
 11. 渡辺(大河内)直子, 沖 俊彦, 小埜良一, 原田浩徳, 湯池晃一郎, 東條有伸, 中島秀明, 野阪哲哉, 稲葉俊哉, 北浦次郎, 北村俊雄: RasGRP4と変異型AML1はマウスBMTモデルにおいて協調的に働き, T細胞性白血病を誘発する. 第69回日本血液学会総会・第49回日本臨床血液学会総会, 横浜, 2007. 10. 11.
 12. 丁 曄, 原田浩徳, 原田結花, 木村昭郎: AML1点変異をマスターイベントとするMDS/AML発症機構の解明. 第69回日本血液学会総会・第49回日本臨床血液学会総会, 横浜, 2007. 10. 11.
 13. Ding Y, Harada Y, Harada H: AML1/RUNX1 point mutation plays a pivotal role in the pathogenesis of MDS/AML. RUNX 2007 (14th RUNX Meeting), Singapore, 2007.8.20.
 14. Zharlyganova D, 原田結花, 原田浩徳, Chaizhunossova N, Apsalikov K, Zhunossova A, 川野徳幸, 星 正治, 木村昭郎: セミパラチンスク核実験場近郊住民における骨髄異形成症候群(MDS)の遺伝子学的検討. 第48回原子爆弾後障害研究会, 広島, 2007. 6. 3.

[図書] (計 1件)

1. 原田浩徳, 原田結花: 治療関連白血病の予後・治療法. 金倉 譲シリーズ監修, 松村到, 高橋 聡, 宮崎泰司編, 血液診療エキスパート vol.1 白血病. 東京, 中外医学社, 2009 (印刷中)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 浩徳 (HARADA HIRONORI)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・講師
研究者番号: 1 0 3 1 4 7 7 5

(2) 研究分担者

原田 結花 (HARADA YUKA)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教
研究者番号: 5 0 3 7 9 8 4 8

(3) 連携研究者