

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19591135

研究課題名（和文）12p13転座型白血病の原因遺伝子TELの発生病学的機能解析

研究課題名（英文）Functional and biological study of leukemia-associated TEL gene

研究代表者

江口 峰斉（EGUCHI MINENORI）

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50420782

研究成果の概要（和文）：

白血病でしばしば異常が認められる *TEL* 遺伝子の機能と、遺伝子異常による腫瘍化のメカニズムを解明するために、正常の *TEL* 遺伝子を高発現するマウス ES 細胞を作製し、その分化能、増殖能に関して検討した。赤芽球系の細胞のみに正常 *TEL* を高発現するマウス ES 細胞を作製し、血液細胞へ分化させると赤芽球系の前駆細胞が増加した。また全ての造血細胞で *TEL* 遺伝子を過剰発現させると、造血細胞はより未分化な状態にとどまっていた。*TEL* 遺伝子は細胞を未分化な状態に維持する働きがあることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Murine embryonic stem (ES) cells overexpressing wild type *TEL* were established. The ES cells were differentiated into hematopoietic cells and were analyzed in detail to clarify its role in hematopoiesis and leukemogenesis. ES cells forced to express wild type *TEL* after committed to erythroid lineage produced more erythroid progenitors than control ES cells without any effects in hematopoietic cells of other lineages. When *TEL* gene was expressed at very early stage of hematopoiesis, more immature hematopoietic stem cells were produced than control ES cells. These results suggested that *TEL* might work to maintain hematopoietic cells at immature state. The precise mechanism of this effect of *TEL* remains to be clarified and now being investigated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：TEL/ETV6、ES 細胞、造血細胞分化

1. 研究開始当初の背景

白血病の発症には様々な染色体転座・融合遺伝子が関与し、融合遺伝子による白血病化

のメカニズムを理解することはその治療法の開発にも必要である。また染色体転座により形成される異常な融合蛋白は、多くの場合

転座を起こした元の野生型蛋白の正常な働きを阻害することが知られており、融合蛋白の機能のみならず、正常蛋白の機能の解明も重要である。TEL は造血器腫瘍で高頻度に染色体転座に関わり、様々な融合遺伝子を形成する遺伝子の一つである。また TEL 遺伝子の存在する 12 番染色体短腕の欠失は造血器腫瘍でしばしば認められ、TEL 遺伝子の機能喪失が造血細胞の腫瘍化に果たす役割が推測される。TEL 遺伝子は造血細胞を含む多くの細胞に発現しており、ETS ファミリーに属する転写抑制因子を蛋白質としてコードしている。TEL 遺伝子を欠失したノックアウトマウス等の解析から TEL は成体での骨髓造血および血管の発生に必須であることが知られている。このように TEL 遺伝子の造血細胞の分化・増殖における重要性は認識されていたが、TEL が造血細胞分化を含む細胞分化に果たす具体的な役割、詳細な細胞生物学的機能は解明されていなかった。

2. 研究の目的

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。したがってそれら転写因子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、また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。本研究では野生型 TEL が造血制御に果たす役割の解明を目的として、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 の役割を発生工学的手法から明らかにすることを試みた。TEL が造血制御に果たす役割とともに、TEL の欠失や変異が正常造血制御に与える影響、および白血病化、腫瘍化への関わり等、TEL の機能と白血病化の関連性を明確にすることにより、TEL 関連融合遺伝子による白血病化の機構を解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 発生工学的手法(トランスジェニックマウス)を用いた TEL およびそのドミナントネガティブ(dominant negative)変異体の機能解析

TEL の造血細胞分化における機能をより詳細に解明するために、造血細胞の分化段階特異的に TEL 遺伝子を発現させたトランスジェニックマウスを作製し、*in vitro* および *in vivo* でその表現型、造血幹細胞の機能解析を行った。野生型 TEL を赤芽球および巨核球系に特異的な GATA1 プロモーター下で発現させるトランスジェニックマウスを作製し、このトランスジェニックマウスの末梢血及び

骨髓血を血算、細胞形態、表面マーカーによって評価するとともに、骨髓幹細胞機能をコロニーアッセイなどにより検討した。

同様に変異型 TEL の機能を解析するために、GATA1 プロモーター下で TEL のドミナントネガティブ変異体である HLH または ETS (それぞれ TEL の HLH ドメイン、ETS ドメインを欠失した変異体)を発現するトランスジェニックマウスを作製し、その表現型(長期的に白血病などの造血器腫瘍が発生するかどうか)および *in vitro* での骨髓幹細胞機能をコロニーアッセイなどで評価した。

(2) マウス ES 細胞における TEL の発現

正常マウス ES 細胞を中胚葉、ヘマンジオブラスト、各系列の血液細胞、血管系細胞に分化させて各分化段階での TEL の発現を検討した。

(3) 発生工学的手法(ES 細胞)による TEL の血液細胞の発生・分化における役割の検討

赤芽球系特異的な TEL 遺伝子の過剰発現野生型 TEL を赤芽球・巨核球系に特異的な GATA1 プロモーター下で発現させるマウス ES 細胞を作製し、*in vitro* で embryoid body (胚様体)および各血液細胞系列の細胞に分化させ、各分化段階で、FACS や RT-PCR 法で遺伝子発現を解析することにより、TEL が血液細胞分化に与える影響を検討した。

全造血細胞での TEL 遺伝子の過剰発現

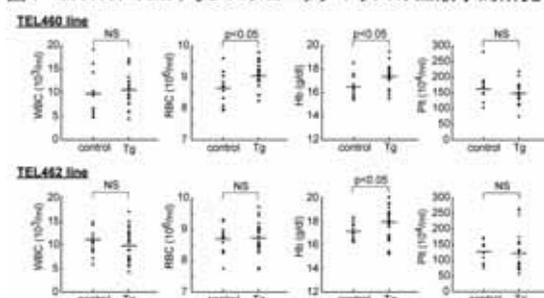
Chicken β -actin (CAG)プロモーター下に EGFP-TEL 融合蛋白を発現するベクターを作成、マウス ES 細胞に遺伝子導入し、恒常的に TEL を高発現するマウス ES 細胞を作製した。この ES 細胞を *in vitro* で embryoid body (胚様体)、ヘマンジオブラストおよび各血液細胞系列の細胞に分化させ、各分化段階で、FACS による表面マーカー解析や RT-PCR 法で解析することにより、TEL が血液細胞分化に与える影響を検討した。ヘマンジオブラストおよび血液の分化は主にコロニーアッセイを用いた。

4. 研究成果

(1) 発生工学的手法(トランスジェニックマウス)を用いた TEL およびそのドミナントネガティブ変異体の機能解析

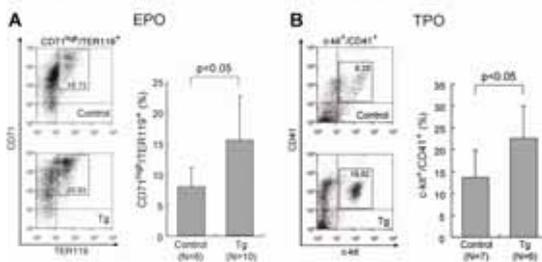
赤芽球および巨核球の発生・分化における TEL の役割を検討するために、GATA1 の遺伝

図1 GATA1-TELトランスジェニックマウスの血液学的所見



子発現制御領域(IE3.9int)下に *TEL* を発現する *GATA1-TEL* トランスジェニックマウスを作製した。*GATA1-TEL* トランスジェニックマウスには個体観察上明らかな異常を認めなかったが、末梢血の血液学的解析では4系統中2系統でHbが有意に高値であった(図1)。骨髓細胞表面マーカー解析では対照群と比較して明らかな差はなかったが、骨髓細胞をEPOおよびTPO存在下で短期間培養すると、対照群と比較してそれぞれ $CD71^{+}/TER119^{+}$ 分画および $CD41^{+}/c-kit^{+}$ 分画の有意な増加が認められた(図2)。*GATA1* 制御領域下に *TEL* を過剰発現させると赤芽球系前駆細胞が増加することから、*TEL* が赤芽球の発生・分化に重要な転写因子であることが示唆された。

図2 EPO、TPO存在下での骨髓細胞の分化能

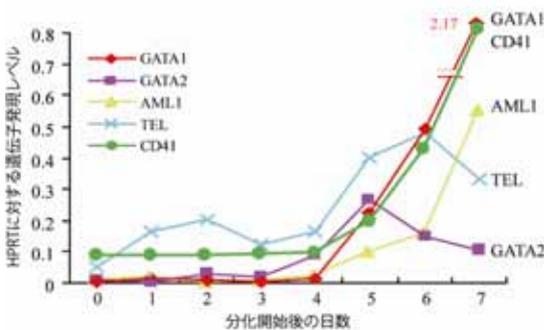


TEL のドミナントネガティブ変異体である HLH または ETS を同様に *GATA1* プロモーター下で発現するトランスジェニックマウスでは、末梢血の血液学的解析、骨髓細胞の表面マーカー解析やコロニーアッセイでは対照群と比較して有意差は認められなかった。また2年間にわたる観察期間中に白血病の発症は認めなかった。

(2) マウス ES 細胞における *TEL* の発現

野性型 ES 細胞から LIF (Leukemia inhibitory factor) 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の発現は分化開始5日後頃から認められた。*TEL* はそれらに先駆けて分化開始1~2日後から発現しており、5~6日後に発現が増強するが、さらに分化した $CD71$ あるいは $CD41$ 陽性細胞では *TEL* の発現は急速に低下していた(図3)。

図3 ES 細胞分化における各転写因子の発現パターン



(3) 発生工学的的手法(ES 細胞)による *TEL* の血液細胞の発生・分化における役割の検討

赤芽球系特異的な *TEL* 遺伝子の過剰発現転写因子 *TEL* の正常な血液細胞の発生・分化に関わる機能、特に赤芽球分化における *TEL* の役割を検討するために、血液細胞特異的な *GATA1* の遺伝子発現制御領域(IE3.9int)下に *TEL* を発現する ES 細胞を作製した (*GATA1-TEL* ES)。コントロールの野性型 ES 細胞は血液への分化開始5日後より *GATA1* の発現が認められ、以降分化の進行にともない上昇した。一方 *TEL* は分化開始前に既に発現しており、以降比較的発現レベルは一定に保たれていた。*GATA1* 遺伝子発現制御領域下に *TEL* を発現させた ES 細胞は血液細胞への分化にともないコントロール ES 細胞と同様に分化開始5日後より *GATA1* の発現上昇が認められ、同時に *TEL* の発現も誘導された。内因性および誘導された *TEL* の発現量は分化開始6日後以降コントロール ES 細胞と比較して有意に増加していた。*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、増殖能は野生型の ES 細胞と比較して変化はなく、細胞表面マーカー解析では $CD71$ 陽性細胞群の割合は対照群と比較して明らかな差は認めなかった。分化開始7日後の細胞を用いてコロニーアッセイを行うと *GATA1-TEL* ES 細胞ではコントロールと比較して BFU-E が有意に高値であった(図4)。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 $CD71^{+}/TER119^{+}$ 分画の有意な増加が認められた(図5)。これらの結果より ES 細胞から赤芽球への分化系では *TEL* の過剰発現は赤芽球系前駆細胞を増加させる効果があることが示された。また *GATA1-TEL* ES 細胞では成熟赤芽球である $CD71^{+}/TER119^{+}$ 分画において、*Alas-E* や *β -major globin* 遺伝子の発現が上昇しており、

図4 *GATA1-TEL* ES 細胞のコロニーアッセイ

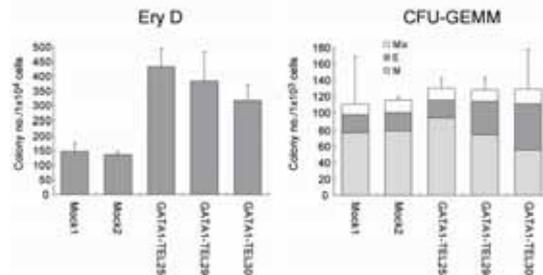
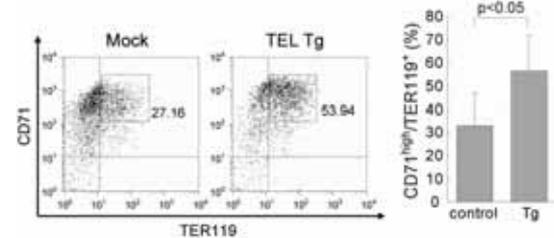


図5 *GATA1-TEL* ES 細胞の EPO 存在下での分化

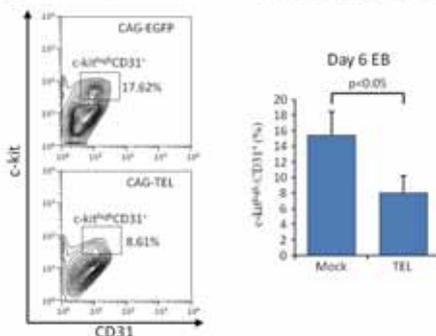


ヘモグロビン合成が亢進している可能性が示唆された。以上の結果より、TELは未分化な段階で赤芽球系前駆細胞を維持する作用を有するとともに、赤芽球の成熟を促進する働きを有していることが明らかになった。

全造血細胞での TEL 遺伝子の過剰発現

Chicken β -actin (CAG) promoter 下に TEL 遺伝子を発現するマウス ES 細胞を作製し、造血細胞へ分化させる実験系を用いて、TEL 遺伝子の造血分化における役割に関して検討した。EGFP を TEL の N 末に融合させた発現ベクターを用いて、TEL を過剰発現する細胞を FACS 等にて識別可能とした。またコントロールとしては、EGFP のみを発現する ES 細胞を用いた。RNA を用いた定量 PCR による検討では、造血細胞への分化開始 6、7 日後の段階で TEL の発現量はコントロール ES 細胞の 5~10 倍程度に増加していた。TEL を過剰発現する ES 細胞は、コロニーアッセイにてコントロールと同じ程度の造血コロニーを形成し、TEL の過剰発現により造血細胞の産生自体は影響されないと考えられた。FACS 解析により、造血分化開始 6、7 日後の embryoid body を詳細に解析すると、TEL を過剰発現する ES 細胞では、EGFP 発現 ES 細胞と比較して、 $CD31^+/c-kit^{high}$ の細胞群が減少し、 $c-kit$ の発現が低い $CD31^+/c-kit^{low}$ の細胞群が相対的に増加していた(図 6)。また高い造血

図6 TELは $c-kit^{high}CD31^+$ 細胞を減少させる



細胞コロニー形成能を有する $Tie2^+/c-kit^{high}$ の細胞群にも軽度ながら減少傾向を認め、その前段階と思われる $Tie2^+/c-kit^{low}$ の細胞群がやや増加していた。この細胞群は *AML1* や *SCL*、*GATA2* などの造血細胞特異的な転写因子を発現しているが、 $Tie2^+/c-kit^{high}$ の細胞群と比較して細胞周期制御因子である *CDKN1C* ($p57^{KIP2}$) の発現が高く、そのコロニー形成能はより低かった。これらの結果から、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働きを有する可能性が示唆された。

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8件)

M. Eguchi-Ishimae, M. Eguchi, K. Maki, C. Porcher, R. Shimizu, M. Yamamoto, K. Mitani, "Leukemia-related transcription factor TEL/ETV6 expands erythroid precursors and stimulates hemoglobin synthesis.", *Cancer Sci*, 査読あり、100 巻 4号、689-697 頁、2009 年

M. Eguchi-Ishimae, M. Eguchi, K. Ohyashiki, T. Yamagata, K. Mitani, "Enhanced expression of the EVI1 gene in NUP98/HOXA-expressing leukemia cells.", *Int J Hematol*, 査読あり、89 巻 2号、253-256 頁、2009 年

L. Kearney, D. Gonzalez De Castro, J. Yeung, J. Procter, S. W. Horsley, M. Eguchi-Ishimae, C. M. Bateman, K. Anderson, T. Chaplin, B. D. Young, C. J. Harrison, H. Kempfski, C. W. So, A. M. Ford, M. Greaves, "Specific JAK2 mutation (JAK2R683) and multiple gene deletions in Down syndrome acute lymphoblastic leukemia.", *Blood*, 査読あり、113 巻 3号、646-648 頁、2009 年

H. Tauchi, D. Tomizawa, M. Eguchi, M. Eguchi-Ishimae, K. Koh, M. Hirayama, N. Miyamura, N. Kinukawa, Y. Hayashi, K. Horibe, E. Ishii, "Clinical features and outcome of MLL gene rearranged acute lymphoblastic leukemia in infants with additional chromosomal abnormalities other than 11q23 translocation.", *Leuk Res*, 査読あり、32 巻 10号、1523-1529 頁、2008 年

M. Eguchi-Ishimae, M. Eguchi, H. Kempfski, M. Greaves, "NOTCH1 mutation can be an early, prenatal genetic event in T-ALL.", *Blood*, 査読あり、111 巻 1号、376-378 頁、2008 年

K. Tokita, K. Maki, J. Tadokoro, Y. Nakamura, Y. Arai, K. Sasaki, M. Eguchi-Ishimae, M. Eguchi, K. Mitani, "Chronic idiopathic myelofibrosis expressing a novel type of TEL-PDGFRB chimera responded to imatinib mesylate therapy.", *Leukemia*, 査読あり、21 巻 1号、190-192 頁、2007 年

M. Eguchi, M. Eguchi-Ishimae, D. Knight, L. Kearney, R. Slany, M. Greaves, "MLL chimeric protein activation renders cells vulnerable to chromosomal damage: an explanation for the very short latency of infant leukemia.", *Genes Chromosomes Cancer*, 査読あり、45 巻 8号、754-760 頁、2006 年

江口真理子、石前(江口)峰音、「特集・慢性骨髄増殖疾患と後天性遺伝子異常～真性

赤血球増加症と Jak2 を中心に～ 4.慢性骨髄増殖疾患と TEL-チロシンキナーゼ異常」血液フロンティア、査読なし、16 巻、397-407 頁、2006 年

〔学会発表〕(計 6 件)

江口真理子、石前(江口)峰斉、岩路秀彦、太田雅明、村尾紀久子、竹本幸司、石井榮一、「HDR 症候群に認められた GATA3 遺伝子の新規変異とその機能解析」、第 54 回日本人類遺伝学会総会、2009 年 9 月 24 日、東京

江口真理子、石前(江口)峰斉、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 は赤芽球系前駆細胞を増加させる」、第 69 回日本血液学会総会、2007 年 10 月 11 日、横浜

石前(江口)峰斉、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

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

江口真理子、石前(江口)峰斉、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、2006 年 10 月 8 日、福岡

石前(江口)峰斉、江口真理子、三谷絹子、

Helena Kempinski, 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

〔図書〕(計 1 件)

江口真理子、石前(江口)峰斉、石井榮一、「特集 小児疾患における臨床遺伝学の進歩 各論 . 話題の疾患遺伝子 乳児白血病」、小児科、査読なし、50 巻 7 号、1093-1099 頁、2009 年

6 . 研究組織

(1)研究代表者

江口 峰斉 (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

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
(H20 H21：連携研究者)
山形 哲也 (YAMAGATA TETSUYA)
獨協医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30424047
(H19 まで研究分担者)
牧 和宏 (MAKI KAZUHIRO)
獨協医科大学・医学部・講師
研究者番号：50337391
(H19 まで研究分担者)