

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007～2008
課題番号：19591139
研究課題名 (和文) PU.1, C/EBP α 及び ϵ による骨髄・単球系への分化誘導メカニズムの解析
研究課題名 (英文) Differentiation induction of the myelomonocytic cells with C/EBPs and PU.1
研究代表者 松下 弘道 (MATSUSHITA HIROMICHI) 東海大学・医学部・講師 研究者番号：50286481

研究成果の概要：

MLL 遺伝子異常を有する急性骨髄性白血病 (AML) における、顆粒球系分化に重要な転写因子 C/EBP α および C/EBP ϵ の意義を明らかにするために、同異常を有する細胞株に遺伝子導入したところ、成熟単球分化が誘導された。この時、単球系分化に重要な転写因子 *Sfpi-1* (*PU.1*) の発現を伴い、癌遺伝子 *Myc* はこれに拮抗的に作用した。レチノイン酸存在下でも生じる成熟単球分化においても、C/EBP α および C/EBP ϵ の発現増加を伴っていた。これらの所見は、*MLL* 遺伝子異常を有する AML に対する分子療法の基礎的所見として重要であると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：骨髄性白血病、C/EBP、PU.1、*Myc*、分化

1. 研究開始当初の背景

骨髄系細胞の分化は、種々の転写因子やサイトカインにより制御されている。造血幹細胞は、granulocyte colony stimulating factor (G-CSF)、monocyte colony stimulating factor (M-CSF) などのサイトカインや、PU.1、C/EBP α などの骨髄系転写因子の作用により、common myeloid progenitor (CMP)、

granulo-monocytic progenitor (GMP) を経て、骨髄系前駆細胞に分化し、さらに C/EBP ϵ や C/EBP β などの転写因子の作用により成熟過程に至る。

正常核型を有する急性骨髄性白血病 (Acute myelogenous leukemia: AML) の約 10% に C/EBP α の mutation を認めること、AML にしばしば認められる遺伝子異常である *RUNX1-RUNX1T1* や *FLT3* 遺伝子の

intandem duplication(FLT3-ITD)により発現が抑制されること、これらの遺伝子異常のある白血病細胞に C/EBP α を発現させることにより分化が誘導されること、急性前骨髄球性白血病 (Acute promyelocytic leukemia : APL) に認められる PML-RAR α は C/EBP ϵ の発現を抑制すること、C/EBP α あるいは C/EBP ϵ の強制発現により分化誘導がもたらされること、などが明らかにされ、C/EBP α や C/EBP ϵ などの骨髄系前駆細胞の発現・機能異常が AML の発症機序に極めて重要であること、分子レベルの治療法の標的となりうることが示唆されてきた。

好酸球増多を伴う急性骨髄単球性白血病 (M4Eo) においても、特異的に認められる 16 番染色体逆位に由来するキメラ遺伝子産物 CBF β -SMMHC により、C/EBP α の機能抑制により骨髄単芽球レベルで分化が停止すること、さらに C/EBP α が成熟単球分化を誘導することが明らかにされた。さらに、少数の報告ながら、C/EBP α や C/EBP ϵ は正常な単球系細胞の分化にも重要な機能を有することが明らかにされつつある。

第 11 番染色体上 (11q23) に存在する *MLL* 遺伝子は、約 50 種類のパートナー遺伝子とキメラ遺伝子を形成し、骨髄単球系の特徴を有する AML の 1 病型を発症させる。成人においては、エトポシドなどの抗腫瘍薬使用後の二次性 AML にしばしば認められ、その予後は一般に不良とされる。

そこで、本研究では特に *MLL* 遺伝子異常を有する AML に着目し、C/EBP α や C/EBP ϵ の発現レベルやその強制発現に伴う細胞形態、細胞表面抗原、遺伝子発現変化などを検討し、分化誘導機構をより詳細に解明することにより、分子機構に基づいた治療法の開発を目指すものである。

2. 研究の目的

事前の検討で、*MLL* 遺伝子異常を有する白血病細胞株は C/EBP α や C/EBP ϵ を強制発現により成熟単球に分化した。またこれらの細胞は、APL に顆粒球系分化を誘導するレチノイン酸投与により同様の単球系分化が誘導されることが知られている。これらを踏まえて、下記の項目を具体的な目的とした。

- (1) レチノイン酸による C/EBP α および C/EBP ϵ 発現誘導の検討
- (2) C/EBP α および C/EBP ϵ の強制発現に伴う各種遺伝子発現の変化
- (3) 細胞増殖因子共存下での C/EBP α および C/EBP ϵ による分化誘導効果

3. 研究の方法

- (1) レチノイン酸による C/EBP α および C/EBP ϵ 発現誘導の検討

MLL 遺伝子異常を有するヒトおよびマウス骨髄性白血病細胞株 (THP-1、MOLM14、HF-6) を、*all-trans* レチノイン酸 (ATRA) または *9-cis* レチノイン酸 (*9-cis* RA) 存在下で培養し、生細胞数、細胞形態、細胞表面抗原、C/EBP α および C/EBP ϵ の発現変化を検討した。

- (2) C/EBP α および C/EBP ϵ の強制発現に伴う各種遺伝子発現の変化

4-Hydroxy tamoxifen (4-HT) により活性誘導が可能な C/EBP α および C/EBP ϵ 発現ウイルスを packaging cell line である PLAT-E 細胞 (東京大学医科学研究所 北村俊雄教授より供与) を用いて作製し、HF-6 細胞 (三重大学大学院 野阪哲哉教授より供与) に導入した。4-HT 処理後、FACS Vantage

(BD, Franklin Lakes, NJ)を用いて遺伝子導入細胞を回収し、total RNAを抽出した。定量 RT-PCR により各種遺伝子発現を検討した。

(3) 細胞増殖因子存在下でのC/EBP α およびC/EBP ϵ による分化誘導効果

C/EBP α および C/EBP ϵ と拮抗的に作用すると報告されている Myc や、AMLにおいて細胞増殖を誘導し予後不良因子とされる FLT3-ITD をあらかじめ HF-6 に導入してから C/EBP α および C/EBP ϵ を強制発現させ、その分化誘導能について検討した。

4. 研究成果

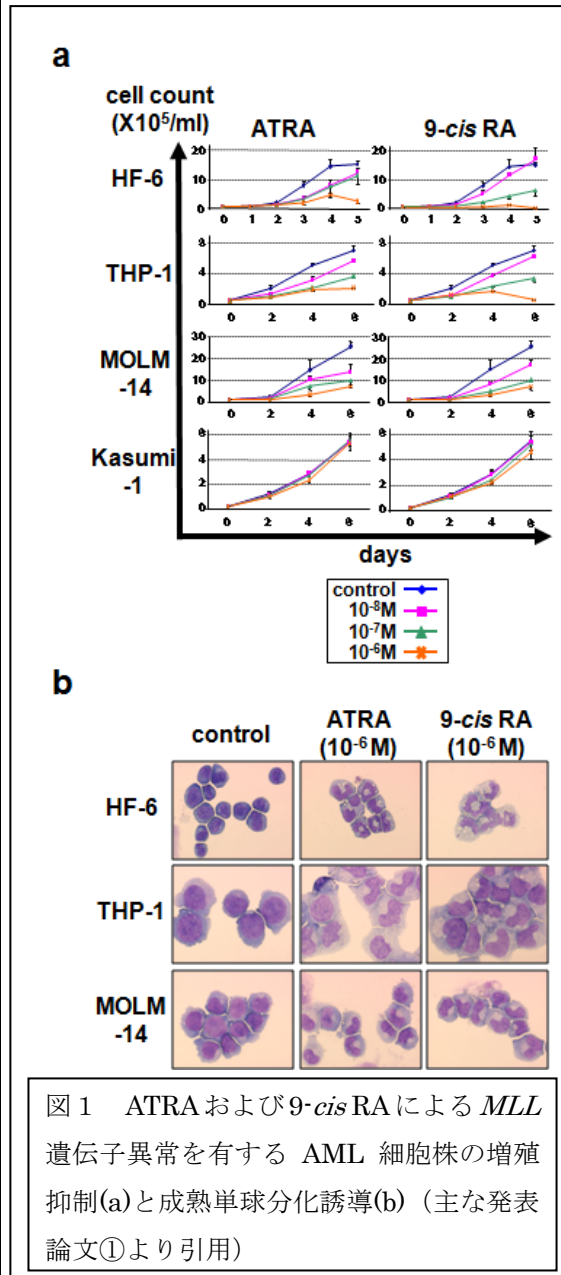
(1) レチノイン酸による C/EBP α および C/EBP ϵ 発現誘導の検討

THP-1、MOLM14 および HF-6 は、全て ATRA および 9-*cis* RA の濃度依存性に細胞増殖抑制を認めた。一方、*MLL* 遺伝子異常を有さないヒト AML 細胞株 Kasumi-1 の増殖は抑制されなかった (図 1 a)。増殖抑制を認めた3つの細胞株は ATRA および 9-*cis* RA 存在下で成熟単球に分化した (図 1 b)。ヒト白血病細胞株である THP-1 および MOLM14 では CD11b や CD36 の発現増加を伴っており、単球系分化が確認された。

検討に用いた全ての細胞株において、ATRA および 9-*cis* RA により C/EBP α および C/EBP ϵ の発現増加が Western blot 法により確認された (図 2、一部省略)。

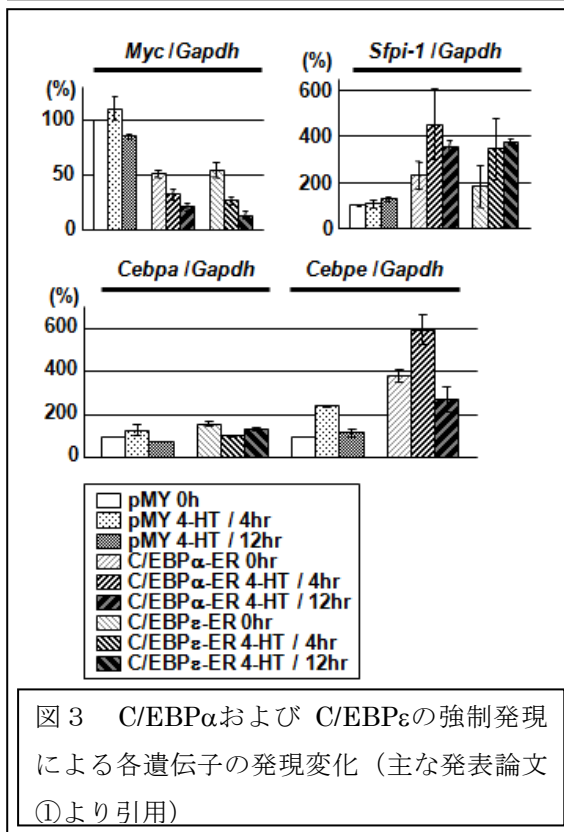
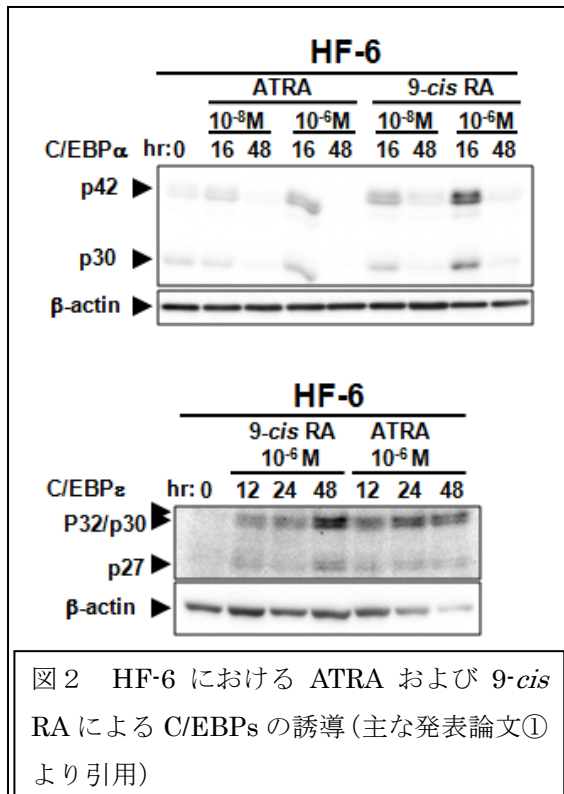
HF-6 細胞に C/EBP α および C/EBP ϵ を強制発現させた場合、ATRA および 9-*cis* RA を作用させた時と同様に細胞増殖抑制および分化誘導が生じるという事前の検討結果と合わせて、*MLL* 遺伝子異常を有する AML

は ATRA および 9-*cis* RA により成熟単球に分化すること、その際に C/EBP α および C/EBP ϵ が重要な機能を有することが示唆された。



(2) C/EBP α および C/EBP ϵ の強制発現に伴う各種遺伝子発現の変化

C/EBP α および C/EBP ϵ の強制発現により、癌遺伝子 *Myc* mRNA の発現低下と、単球系分化に重要であるとされる *PU.1* の mouse homologue である *Sfpi-1* mRNA の発現増加を伴っていた。また C/EBP α の強制発



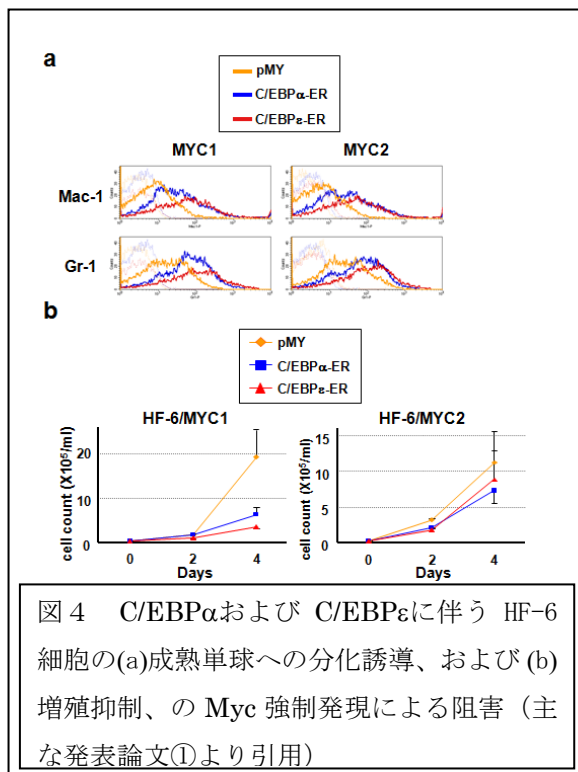
現により *Cebpe* mRNA の発現誘導を認めたが、C/EBPε の強制発現では *Cebpa* mRNA の発現誘導は認められなかった (図3)。

以上より、C/EBPs による成熟単球分化は

Myc の発現抑制と PU.1 の発現誘導により達成されること、単球系分化誘導において C/EBPε は C/EBPα の下流に位置することが示された。

(3) 細胞増殖因子存在下での C/EBPα および C/EBPε による分化誘導効果

C/EBPs と Myc は互いに拮抗的に作用することが知られている (2) の結果から、実際に C/EBPs により Myc の発現が抑制されることが確認された。そこで、あらかじめ HF-6 細胞に Myc を発現誘導させておいてから C/EBPs の発現誘導を行ったところ、Myc は C/EBPs による増殖抑制および成熟単球分化に抑制的に作用した (図4 a, b)。一方、FLT3-ITD を先に発現誘導した場合には、C/EBPs による成熟単球分化に影響を与えなかった。



以上の結果から、*MLL* 遺伝子異常を有する AML の C/EBPs による成熟単球分化には Myc の発現抑制が必須であること、

FLT3-ITD の発現の有無は関与しないことが示された。

本研究により、*MLL* 遺伝子異常を有する AML 細胞の成熟単球分化における C/EBP α および C/EBP ϵ の重要性が明らかにされた。今後詳細な検討が必要であるが、レチノイン酸あるいはその下流に位置する C/EBPs のシグナルが、これらの AML に対する特異的分子療法の標的となりうることが示唆された。

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 5 件)

- ① Matsushita H., Nakajima H., Nakamura Y., Tsukamoto H., Tanaka Y., Jin G., Yabe M., Asai S., Ono R., Nosaka T., Sugita K., Morimoto A., Hayashi Y., Hotta T., Ando K., Miyachi H. C/EBP α and C/EBP ϵ induce the monocytic differentiation of myelomonocytic cells with the *MLL*-chimeric fusion gene. *Oncogene* 27, 6749-6760, 2008, 査読有
- ② Matsushita H., Nakamura N., Asai S., Yabe M., Hayama N., Kondo Y., Urano T., Miyachi H. A leukemic change as an initial manifestation of the common variant type of ALK-positive anaplastic large cell lymphoma in a patient with lung adenocarcinoma. *Intern Med* 47, 2057-2062, 2008, 査読有
- ③ Asai S., Okami K., Nakamura N., Sugimoto R., Takeo T., Ogawa Y., Kojima S., Yamamoto S., Matsushita H., Miyachi H. Tortoiseshell appearance of bilateral submandibular

glands by infiltration of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *J Ultrasound Med* 27, 969-73, 2008, 査読有

- ④ 松下弘道、田中由美子、宮地勇人. MDS の診断—当検査室の対応— MDS の診断における血液総合診断システムの有用性と今後の課題” . 日本検査血液学会雑誌 第 10 巻、63-71、2009、査読無
- ⑤ 松下弘道、矢部みはる、宮地勇人. 1. 分野別のコンサルテーション/診療支援 5) 染色体・遺伝子検査. 臨床検査 第 53 巻、299-303、2009、査読無

[学会発表] (計 12 件)

- ① Matsushita H., Muguruma Y., Ando K. Establishment of MDS model using NOD/SCID/gnull(NOG) mice. The 3rd Korean Society of Hematology (KSH) and Japanese Society of Hematology (JSH) Joint Symposium. 2009 年 3 月 14 日. 韓国・ソウル
- ② 松下弘道、中村嘉彦、矢部みはる、浅井さとみ、安藤潔、宮地勇人. *MLL* キメラ遺伝子を有する急性骨髄性白血病細胞のレチノイン酸による単球系分化の検討. 第 55 回 日本臨床検査医学会学術集会. 2008 年 11 月 30 日. 名古屋
- ③ 金貴蘭、松下弘道、浅井さとみ、宮地勇人. 白血病細胞の抗癌剤耐性における FLT3/ITD の役割. 第 55 回 日本臨床検査医学会学術集会. 2008 年 11 月 30 日. 名古屋
- ④ 増川敦子、荒川聡、松下弘道、山本美紀、宮地勇人. 慢性骨髄性白血病症例における染色体異常の多様性. 第 55 回 日本臨床検査医学会学術集会. 2008 年 11 月 28 日. 名古屋

- ⑤ 六車ゆかり、松下弘道、八幡崇、弓野静、宮地勇人、安藤潔. 骨髓異形成症候群の *in vivo*モデルの確立. 第 70 回 日本血液学会総会. 2008 年 10 月 11 日. 京都
- ⑥ 松下弘道、中村直哉、浅井さとみ、矢部みはる、端山直樹、近藤祐介、浦野哲哉、宮地勇人. 肺癌経過中に白血化で発症した *anaplastic large cell lymphoma* の一例. 第 70 回 日本血液学会総会. 2008 年 10 月 10 日. 京都
- ⑦ 松下弘道. MDS の診断一当検査室の対応. 日本検査血液学会 第 9 回学術集会. 2008 年 7 月 27 日. 津
- ⑧ 山本美紀、増川敦子、松下弘道、荒川聡、田中由美子、大島利夫、宮地勇人. Variant type の b2a2 fusion と考えられる *BCR-ABL* mRNA を検出した慢性骨髄性白血病の一例. 日本検査血液学会 第 9 回学術集会. 2008 年 7 月 27 日. 津
- ⑨ 松下弘道、田中由美子、浅井さとみ、宮地勇人. 活性誘導型 C/EBP α および C/EBP ϵ による *MLL* キメラ遺伝子を有する急性骨髄性白血病の単球系分化. 第 54 回日本臨床検査医学会総会・第 47 回日本臨床化学会年会連合大会. 2007 年 11 月 23 日. 大阪
- ⑩ 金貴蘭、松下弘道、浅井さとみ、森恵美子、宮地勇人. 白血病細胞の抗癌剤耐性における FLT3/ITD の役割. 第 54 回日本臨床検査医学会総会・第 47 回日本臨床化学会年会連合大会. 2007 年 11 月 23 日. 大阪
- ⑪ 森恵美子、浅井さとみ、金貴蘭、小林広幸、松下弘道、宮地勇人. 葉酸拮抗剤耐性白血病における放射線殺細胞効果. 第 54 回日本臨床検査医学会総会・第 47 回日本臨床化学会年会連合大会. 2007 年 11 月 23 日. 大阪

- ⑫ 松下弘道、中島秀明、中村嘉彦、塚本秀雄、田中由美子、浅井さとみ、小埜良一、野阪哲哉、安藤潔、宮地勇人. C/EBP α および C/EBP ϵ による *MLL* キメラ遺伝子を有する骨髄単球性白血病細胞の単球系分化. 第 69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会. 2007 年 10 月 11 日. 横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織
(1) 研究代表者

松下 弘道 (MATSUSHITA HIROMICHI)
東海大学・医学部・講師
研究者番号：50286481

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

宮地 勇人 (MIYACHI HAYATO)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：20174196

安藤 潔 (ANDO KIYOSHI)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：70176014

中島 秀明 (NAKAJIMA HIDEAKI)
慶應義塾大学・医学部・専任講師
研究者番号：30217723