

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 6月 4日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591214

研究課題名（和文） 転写因子異常による造血障害と白血病発症メカニズムの解明

研究課題名（英文） Transcriptional Dysregulation in Abnormal Hematopoiesis and Leukemia

研究代表者

奥田 司（OKUDA TSUKASA）

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：30291587

研究成果の概要（和文）：転写因子 AML1/Runx1 は造血発生の中心的役割を担う一方、その機能異常が白血病発症に深く関わる。本研究では白血病関連変異や翻訳後修飾が担う役割について、生化学的解析とマウス ES 細胞実験系を組み合わせて検討した。白血病関連変異の多くが機能廃絶をもたらしたが、翻訳後修飾変異体では生物活性を保持しているものも観察され、引き続きマウス個体での解析を試みている。また、会合分子の新規探索も併せて行った。

研究成果の概要（英文）：Transcription factor, AML1/Runx1, plays a pivotal role in hematopoietic development, and its dysfunction is closely related to leukemogenesis. In this study, the influence of leukemia-associated genomic alterations and post-translational modifications of this molecule were evaluated by use of biochemical analysis and experiments using mouse embryonic stem cells. In contrast to most cases of the leukemia-associated mutations that resulted in functional disruption, some mutants for modification residues of this molecule retained its biological activity. Mutant mouse lines for those mutations were currently being generated, and will be analyzed. A search for interacting molecules of AML1 was also performed as a supporting approach.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：血液内科学

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：血液腫瘍学、白血病、転写因子

1. 研究開始当初の背景

AML1 遺伝子（RUNX1 と呼ばれる）はヒト急性骨髄性白血病全体の約 20% という高頻度で染色体転座による再構成の標的となる遺伝

子であり、FAB 分類 M2 亜型の 8;21 相互転座切断点からクローニングされたものである。またこの遺伝子は転写因子複合体 PEBP2/CBF の DNA 結合サブユニットをコードすることが

示されている。AML1 は、造血初期発生、成体での血小板造血や胸腺 T 細胞の制御において重要な役割を担うことが知られている。

一方、8:21 転座では、遺伝子再構成によって AML1-MTG8 と呼ばれる融合遺伝子が形成される。ノックインマウスの作製によって、この融合遺伝子が個体のレベルにおいてドミナント・ネガティブ作用を発揮し、造血前駆細胞の自己複製と分化のバランスを変化させることによって白血病発症に関与していることが明らかにされている。

近年では AML1 のゲノム遺伝子の微細変異も白血病発症に係ることが明らかにされ、その後、骨髄性白血病・MDS 症例全体の約 5~7% に認められるというのが現在の共通理解となっている。

また、高頻度に白血病発症する家族性血小板異常症 (FPD/AML) では先天性に AML1 遺伝子座の片方のアレルが不活化されていることが知られ、AML1 「活性」の量的低下が造血障害の原因となっていることが示唆されている。

このように、AML1 転写機能の低下は付加の変異を蓄積することによって白血病発症に関わるものとされている。

AML1 の造血制御作用は標的遺伝子群に対する転写活性化作用を通じて発揮されているものと考えられているが、その活性は翻訳後修飾によって制御されていることが最近示唆されている。実際、AML1 蛋白質はリン酸化やメチル化などを受けていることが報告されている。こうした化学修飾は AML1 蛋白質の立体構造をわずかに変化させ、会合分子との相互作用に変化をもたらすことによって、その機能を調節しているものと考えられているが、白血病発症との関わりを含め、まだ、その全容は明らかにされていない。

2. 研究の目的

こうした背景の中、当該研究では AML1 遺伝子の微細変異や翻訳後修飾が造血制御や白血病発症にどのように関与しているのか、その解明につながる手がかりを得ることをその目的とした。

3. 研究の方法

(1) AML1 遺伝子の改変

マウス AML1b の cDNA をプラスミドに導入し、変異オリゴマーを用いた PCR 法によって、各種のミスセンス変異を導入した。下記の実験に先立って、PCR 増幅部位については両ストランドのシーケンシングを行い、狙い通りの遺伝子変異が導入されていること、そして他の部位には変異が生じて居ないことを確認した。

(2) AML1 の発現と転写活性化能の解析

変異 AML1 cDNA は HA タグをつけた後に真核細胞発現ベクターに乗せ換え、HeLa 細胞や Cos7 細胞へのトランスフェクションに供した。AML1 蛋白質の発現については抗 AML1 抗体や HA タグ抗体を用いたウエスタンブロット解析で、また転写活性化能はマウス M-CSF 受容体遺伝子プロモータまたはミエロペロキシダーゼ遺伝子プロモータのルシフェラーゼコンストラクトを用いたダブル・ルシフェラーゼアッセイで評価した。

(3) マウス ES 細胞への導入

マウス AML1 遺伝子座のゲノム DNA 断片に野生型 cDNA または変異 AML1 cDNA を挿入し、置換型ベクターを作製した。このベクターを用いて、野生型あるいは AML1 欠損 ES 細胞における相同組換えを利用して、AML1 遺伝子座に外来 cDNA をノックイン導入させた。

(4) ES 細胞の *in vitro* での血球分化

マウス ES 細胞をメチルセルロース中で培養し、胚様体形成を行った。ここで適切なコロニー刺激因子を加えておくと、胚様体から血球系の細胞を分化させることができる。

(5) 遺伝子改変マウスの作製

変異 AML1 をノックイン導入した野生型 ES 細胞をマウス胚盤胞期胚に注入し、キメラマウスを作製した。キメラマウスの交配によって胚細胞系列に変異が伝達されたマウス系列を樹立した。

(6) Yeast two-hybrid スクリーニング

GAL4-DNA 結合ドメインに AML1 遺伝子断片を融合させ、これを bait-construct とした。この融合遺伝子と GAL4-活性化ドメインに融合させた cDNA ライブラリーとを酵母細胞内に同時導入し、レポーター遺伝子の発現を指標として定法どおり相互作用分子のスクリーニングを行った。

4. 研究成果

上述のように AML1 の機能低下が白血病発症に関与するが、この機能の全廃は造血初期発生の欠如をもたらす。一方で AML1 の翻訳後修飾がその転写活性可能に大きな影響を及ぼすことが示唆されている。当該研究ではまず AML1 の DNA 結合ドメインの下流に位置する 2 箇所のアルギニン (R) 残基のメチル化について検討した。これらのアミノ酸をリシン (K) に置換したところ、転写活性化能が低下することを認めた。ただし全廃はしない。これは、これらの残基のメチル化が転写のコリプレッサーからの解離をもたらしているとする先行研究での観察と相関するものであった。一方、この非メチル化 AML1 変異体を AML1 欠損 ES 細胞に導入し、その造血

分化における作用を検討したところ、野生型 AML1 の場合と同様に、失われていた in vitro での血液細胞発生を取り戻させる作用があることを見出した。少なくとも骨髓系細胞の初期発生制御にはこのメチル化修飾は必須のものではないことが示唆された。

これを受けて、この R→K 変異を胚細胞系列で保有する遺伝子改変マウスの作製を試み、ヘテロ接合体の樹立に成功した。現在、交配によってホモ接合体の作製を試みており、今後、個体レベルでの作用の確認を行いたい。

他方、ヒト白血病で観察された AML1 ゲノム遺伝子変異には、DNA 結合ドメイン内にホットスポットがあることが知られる。今回のメチル化変異での観察とことなると、R139Q、R174Q、R177Q、そして I150ins といった白血病関連ミスセンス変異体はいずれも転写活性化機能を全廃しており、かつ、造血レスキュー機能も保持していない。また、作製された遺伝子改変マウスはノックアウトマウスと同様の表現型を持つものである。転写活性化能の残存と、生物作用の保持とが密接に関連することが示されたものと考えられる。

AML1 分子は何箇所かのセリン (S)・スレオニン (T) 残基やチロシン (Y) 残基にリン酸化修飾を受けていることが知られている。私たちはこうした翻訳後修飾の影響について網羅的な検討を進めている。S/T 残基に関してはアラニン (A) またはアスパラギン酸 (D) への変異体を検討し、また、Y 残基についてもフェニルアラニン (F) 残基へ置換した変異体を作製し、その影響についての検討を開始した。こうした変異体の生物作用のスクリーニングとマウス作製を通じて、今後、AML1 分子における翻訳後修飾の生物学的意義の解明を進めてゆきたい。

一方で、強い機能障害をもたらすことが知られる白血病関連点変異を導入した遺伝子改変マウスであっても、ヘテロ接合体はその生涯の間に白血病を発症しなかった。レトロウイルス挿入による強制発症造血器腫瘍ゲノムの解析からは、いくつかの共通挿入部位が見つかってきているが、その白血病発症における役割についてはさらに検討が必要となるものと思われた。

AML1 の翻訳後修飾は、協調して機能する蛋白との会合の状態を変化させることによって、その生化学的特性を変化させている可能性が示唆されている。こうした観点から、上述の研究を補完する目的で、AML1 と会合する分子の探索を Yeast Two-Hybrid 法によって行った。その結果、Runx1 の runt ドメインに結合する新規候補分子群、そして C 末端サブドメインに結合する候補分子群をそれぞれ数種ずつ特定した。いずれも酵母細胞の実験系では特異性高く結合することが確認され

た。今後、それぞれについての機能的関与について検討を進めたい。

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 Nagamachi A, Htun PW, Ma F, Miyazaki K, Yamasaki N, Kanno M, Inaba T, Honda Z, Okuda T, Oda H, Tsuji K, Honda H. A 5' untranslated region containing the IRES element in the Runx1 gene is required for angiogenesis, hematopoiesis and leukemogenesis in a knock-in mouse model. *Developmental Biology*, 345:226-236, 2010 (査読有) .
- ② Nishio M, Sakakura C, Nagata T, Komiyama S, Miyashita A, Hamada T, Kuryu Y, Ikoma H, Kubota T, Kimura A, Nakanishi M, Ichikawa D, Fujiwara H, Okamoto K, Ochiai T, Kokuba Y, Sonoyama T, Ida H, Ito K, Chiba T, Ito Y, Otsuji E. RUNX3 promoter methylation in colorectal cancer: its relationship with microsatellite instability and its suitability as a novel serum tumor marker. *Anticancer Research* 30:2673-2682, 2010 (査読有) .
- ③ Sakakura C, Hamada T, Miyagawa K, Nishio M, Miyashita A, Nagata H, Ida H, Yazumi S, Otsuji E, Chiba T, Ito K, Ito Y. Quantitative analysis of tumor-derived methylated RUNX3 sequences in the serum of gastric cancer patients. *Anticancer Research* 29:2619-2625, 2009 (査読有) .
- ④ 横田明日美、奥田 司. 造血発生制御の今日的理解 京都府立医科大学雑誌 119 : 681-693, 2010 (査読無).

[学会発表] (計 9 件)

- ① Nakamura K, Shiomi T, Okuda T. A search for associating molecules to the runt-domain of the leukemia-associated transcription factor, Runx1/AML1. 第 34 回日本分子生物学会年会 (横浜) 2011 年 12 月 14 日.
- ② Mizutani S, Taniwaki M, Okuda T. Biological analysis of AML1/RUNX1 arginine-mutants by means of hematopoietic rescue experiments of

Runx1-deficient mouse embryonic stem cells. 第 53 回米国血液学会年次総会 (サンディエゴ、米国) 2011 年 12 月 5 日.

- ③ Mizutani S, Taniwaki M, Okuda T. Biological analysis of AML1-arginine mutant by means of Runx1 mutant of *in vitro* differentiation of mouse ES cells. 第 73 回日本血液学会学術集会 (名古屋) 2011 年 10 月 16 日.
- ④ Mizutani S, Taniwaki M, Okuda T. Evaluation of the biological role for arginine methylation of RUNX1/AML1 by hematopoietic rescue experiments. 第 70 回日本癌学会学術総会 (名古屋) 2011 年 10 月 3 日.
- ⑤ Shiomi T, Nakamura K, Okuda T. Screening for interacting molecules of the hematopoiesis-associated transcription factor, Runx1/AML1. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (神戸) 2010 年 12 月 9 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥田 司 (OKUDA TSUKASA)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：30291587

(2) 研究分担者

阪倉 長平 (SAKAKURA CHOHEI)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：10285257

(3) 連携研究者

なし