

機関番号：13501

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 年度～2010 年度

課題番号：21790976

研究課題名 (和文) 急性リンパ性白血病に発現される骨髄球系抗原の解析

研究課題名 (英文) The analysis of myeloid antigens expressed in acute lymphoblastic leukemia

研究代表者

赤羽 弘資 (AKAHANE KOSHI)

山梨大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90377531

研究成果の概要 (和文)：

我々はこれまでに、小児急性リンパ性白血病(ALL)の中でも極めて予後不良である 17;19 転座型 ALL では骨髄球系抗原の CD33 が高頻度に発現されており、転座由来の E2A-HLF 融合転写因子が CD33 の発現を誘導することを報告してきた。本研究では、E2A-HLF による CD33 発現誘導の機序の解明に焦点を絞り解析を行い、E2A-HLF による CD33 遺伝子の発現誘導には転写開始点下流の PEA3 結合部位が重要であることを確認した。また PEA3 結合部位は、代表的な小児難治性 ALL である Philadelphia 染色体陽性 ALL と 11q23 転座型 ALL の CD33 発現においても必須であった。これらの知見は、難治性 ALL で認められる CD33 の発現が、PEA3 結合部位の活性化を介した共通の機序で誘導される可能性を示唆している。

研究成果の概要 (英文)：

We previously reported frequent expression of myeloid antigen CD33 on t(17;19)-ALL, which shows the poorest outcome in childhood ALL, and that E2A-HLF fusion transcriptional factor derived from t(17;19) induces CD33 expression. In this study, we analyzed the mechanism of CD33 expression induced by E2A-HLF and found that the PEA3 binding sites located downstream of the start site of CD33 gene is important for the induction by E2A-HLF. We also confirmed that PEA3 binding sites are essential for CD33 expression in both Philadelphia chromosome-positive ALL and ALL with 11q23 chromosomal translocations, which are representative refractory childhood ALLs. These observations indicate the possibility that CD33 expression in refractory ALLs was induced by the common mechanism mediated by activation of PEA3 binding sites.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：急性リンパ性白血病、骨髄球系抗原、CD33、CD13

1. 研究開始当初の背景

急性リンパ性白血病(ALL)は T または B リンパ球前駆細胞の白血化であるが、このうち 5～32% の症例で骨髄球系抗原の発現が認められる。最近、小児 ALL で最も強力な化学療法を行っているドイツを中心とした BFM グル

ープから、骨髄球系抗原の一つである CD33 が陽性の小児 B リンパ球前駆細胞型 ALL 症例の予後が CD33 陰性例と比べて際立って不良であると報告され、小児 ALL における骨髄球系抗原、特に CD33 発現の臨床的意義が注目されるようになった。一方、骨髄球系細胞の

CD33 発現には転写因子 PU.1 が中心的な役割を果たすことが報告されているが、ALL における CD33 の発現機序は不明である。我々は、小児 ALL の中でも著しく予後不良である 17;19 転座型 ALL では高頻度に CD33 が陽性であり、17;19 転座に由来する E2A-HLF 融合遺伝子が CD33 の発現を誘導することを報告してきた。この知見は、ALL における CD33 の発現機序の一つとして、転座に由来する融合遺伝子の関与を初めて明らかにするとともに、小児 ALL の予後不良因子としての CD33 の意義を解明するための大きな手掛かりになると考えられる。

2. 研究の目的

ALL において、E2A-HLF をはじめとする転座由来の融合遺伝子産物が、CD33 の発現を誘導する具体的な機序を解明し、これらの発現が白血病細胞の増殖や生存、薬剤感受性へ与える影響を解析する。

3. 研究の方法

(1)~(3) 17;19 転座由来 E2A-HLF による CD33 発現誘導の機序の解明

17;19 転座型 ALL 細胞株や E2A-HLF を遺伝子導入した CD33 陰性 B 前駆細胞型 ALL 細胞株を用いて、E2A-HLF や PU.1 の DNA 結合能をゲルシフト・アッセイで解析した。

また、E2A-HLF による CD33 の発現誘導に重要な領域を同定するために、前記の細胞株を用いて、ルシフェラーゼによるレポーター・アッセイを行った

(4) 11q23 転座型 ALL や Philadelphia 染色体陽性 ALL における CD33 発現誘導機序の解明

代表的な小児難治性 ALL である 11q23 転座型 ALL と Philadelphia 染色体 (Ph1) 陽性 ALL においても、CD33 が高頻度に発現されることが知られている。そこで、これらの細胞の CD33 の発現誘導に重要な領域を同定するために、(1)~(3) と同様にルシフェラーゼによるレポーター・アッセイを行った。

4. 研究成果



図1. CD33 遺伝子プロモーター領域の模式図

(1) CD33 遺伝子プロモーターの転写開始点上

流には E2A-HLF が結合する配列と類似した塩基配列 (E2A-HLF 結合候補配列) が複数存在するが (図 1. ①)、この配列に E2A-HLF が直接結合する可能性は、ゲルシフト・アッセイによる解析で否定された。また、E2A-HLF 導入細胞で CD33 遺伝子のプロモーター活性を解析したところ、E2A-HLF 発現によるプロモーターの活性化は、E2A-HLF 結合候補配列を欠失させても維持された。

これらの結果から、E2A-HLF が直接 CD33 遺伝子プロモーターに結合して CD33 の発現を誘導する可能性は否定された。

(2) CD33 遺伝子の転写開始点から約 400bp 下流には、前述した PU.1 の結合配列が存在する (図 1. ②)。CD33 遺伝子 exon1 の上流で PU.1 結合配列を含む約 200 塩基の領域 (+296/+508) のプロモーター活性を、E2A-HLF を遺伝子導入した 697 細胞で検討したところ、Zn の添加により E2A-HLF が発現されると、-839/+508 と同様に +296/+508 のプロモーター活性が誘導されることが確認された (図 2)。このことから、E2A-HLF による CD33 の発現誘導には、PU.1 結合配列を含む +296/+508 領域が重要であることが示唆された。

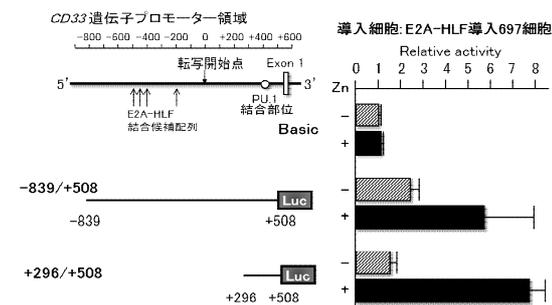


図2. E2A-HLF による CD33 遺伝子プロモーターの活性化 (ルシフェラーゼによるレポーターアッセイ)

そこで、E2A-HLF が PU.1 の活性化を介して CD33 の発現を誘導する可能性について E2A-HLF 導入細胞で検討したところ、E2A-HLF によって CD33 の発現が誘導されても、PU.1 の遺伝子発現や DNA 結合能は誘導されなかった。また、+296/+508 領域のうち PU.1 結合配列を変異させると、骨髄球系細胞株ではプロモーター活性が低下したのに対して、17;19 転座型 ALL 細胞株では活性が維持されていた。以上の結果から、骨髄球系細胞とは異なり、E2A-HLF による CD33 遺伝子プロモーターの活性化において、PU.1 の関与は低いことが示唆された。

(3) 前述した+296/+508領域には、PU.1結合配列をはさんで5'側にSP-1結合配列が、3'側に3か所のPEA3結合配列が存在する。そこで、E2A-HLFによるCD33発現誘導に重要な部位を同定するために、5'側の領域のみを含むレポーターと3'側の領域のみを含むレポーターの活性を17;19転座型ALL細胞株で検討したところ、PEA3結合配列を含む3'側の領域(+426/+508)でのみ活性が維持された(図3)。

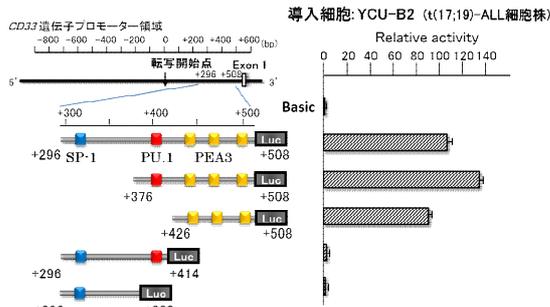


図3. +296/+508領域におけるプロモーター活性 (ルシフェラーゼによるレポーターアッセイ)

次に、3カ所のPEA3結合配列の変異導入によるプロモーター活性の変化を解析したところ、図4に示す配列のAまたはBに変異を導入すると、17;19転座型ALL細胞株ではCD33のプロモーター活性は約1/3に低下し、2ヶ所に変異を導入すると10%以下にまで低下した(図4)。

これらの結果から、E2A-HLFによるCD33遺伝子の発現誘導には、転写開始点下流のPEA3結合配列が重要であることが確認された。

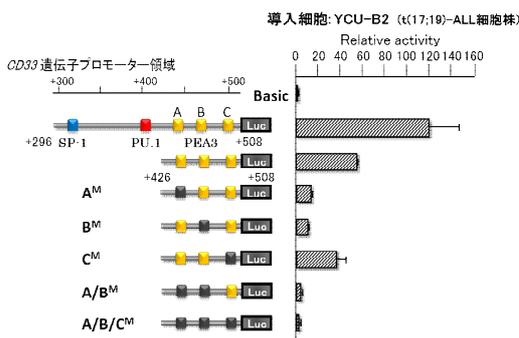


図4. PEA3結合配列の変異導入によるプロモーター活性の変化 (ルシフェラーゼによるレポーターアッセイ)

(4) CD33を発現している11q23転座型ALL細胞株(KOPB26, KOCL50)とPhiladelphia染色体(Ph1)陽性ALL細胞株(YAMN73)でCD33遺伝子のプロモーター活性を解析したところ、17;19転座型ALL細胞株と同様に+426/+508

領域のプロモーター活性が確認され、PEA3結合配列の変異導入により活性は著しく低下した(図5)。

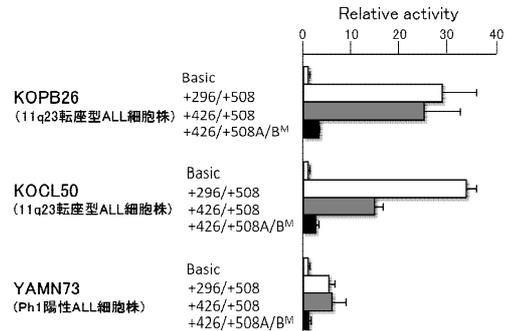


図5. 11q23転座型およびPh1陽性ALLにおけるCD33遺伝子プロモーター活性 (ルシフェラーゼによるレポーターアッセイ)

このように、11q23転座型ALLやPh1陽性ALLのCD33発現においても、プロモーター上のPEA3結合配列が重要であることが確認された。

以上の結果から、小児難治性ALLにおけるCD33の発現誘導において、プロモーター上のPEA3結合配列が重要であることが確認された。PEA3結合配列に結合する転写因子としては、ETV1, ETV4, ETV5などが知られているが、これらの転写因子は、Ewing肉腫における転座でEWS遺伝子とfusionを形成して腫瘍発生に関与していることが報告されている。こうしたことから、E2A-HLFをはじめとする転座由来の融合遺伝子は、PEA3結合配列に作用する転写因子の活性化を介してCD33の発現を誘導すると推測されるが、これらの転写因子は白血病の発症や進展にも関与して、その結果としてCD33の発現が予後不良のマーカーになっている可能性も考えられる(図6)。

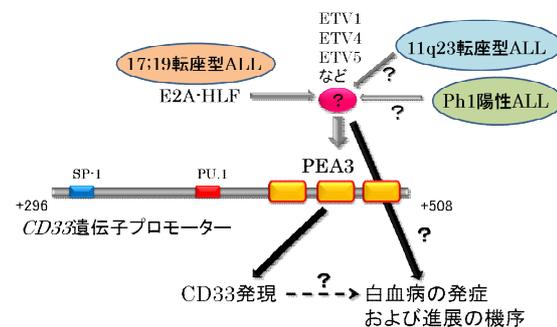


図6. 結果のまとめ

ALLにおけるCD33発現機序の解明は、難治性ALLに対する新たな治療戦略の糸口になると期待されるため、現在はPEA3結合配列を認識する転写因子群に着目して解析を続けている。

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1件)

(1) Akahane K, Inukai T, Inaba T, et al: Specific induction of CD33 expression by E2A-HLF: the first evidence for aberrant myeloid antigen expression in ALL by a fusion transcription factor. Leukemia 査読有 24, 2010, 865-869

[学会発表] (計2件)

(1) 柚津晋平、赤羽弘資、加賀美恵子、本名浩子、渡邊敦、根本篤、宇野佳奈子、合井久美子、杉田完爾、犬飼岳史：“急性リンパ性白血病におけるCD33遺伝子プロモーターの解析”、第52回日本小児血液学会、平成22年12月17日(大阪)

(2) 赤羽弘資、犬飼岳史、廣瀬衣子、黒田格、根本篤、加賀美恵子、合井久美子、杉田完爾：“17;19転座に由来するE2A-HLF融合転写因子による急性リンパ性白血病でのCD33発現誘導の機序”、第51回日本小児血液学会、平成21年11月28日(浦安)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/pediatr/fpe/fpe100819.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤羽 弘資 (AKAHANE KOSHI)
山梨大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90377531

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし