

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25年 6月21日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390197

研究課題名（和文） 白血病幹細胞を標的とする新たな急性骨髄性白血病治療法の開発

研究課題名（英文） Development of the novel AML treatments by targeting leukemia stem cells

研究代表者

北林 一生 (KITABAYASHI ISSAY)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：20261175

研究成果の概要（和文）：正常核型急性骨髄性白血病で高頻度に変異が見られる核小体タンパク質 Nucleophosmin(NPM)遺伝子の変異体をマウス骨髄から採取した造血系前駆細胞に発現させると、細胞のコロニー形成能が長期間維持され、Hoxa 遺伝子の発現量が増加することを明らかにした。NPM 変異体は核小体ではなく細胞質に局在するが、オリゴメリゼーションドメインを介して野生型 NPM も細胞質へと移行させる。NPM 変異体から核外移行シグナルもしくはオリゴメリゼーションドメインを欠損させると、造血系前駆細胞に対するトランスフォーム能が失われることから、NPM 変異体は野生型 NPM を細胞質へ連れ出すことにより機能している可能性が示唆された。さらに、NPM 複合体を精製することにより、YB-1 というタンパク質が NPM に結合することを見いだした。そして、YB-1 ノックアウトマウス由来の細胞では、NPM 変異体のトランスフォーム能が著しく阻害されることを示した。すなわち、YB-1 は NPM 変異体のトランスフォーム能に必須な因子であることが明らかになった。YB-1 複合体の精製を行ったところ、mRNA の制御に関与するタンパク質が多く取れてきたため、YB-1 は mRNA レベルでトランスフォーム能を制御している可能性が示唆された。これまで、NPM 変異体の機能は不明であったが、その機能に YB-1 が関与することを初めて明らかにしたことは重要である。

研究成果の概要（英文）：Nucleophosmin (NPM) is frequently mutated in acute myeloid leukemia (AML), which results in changes of its localization from nucleolus to cytoplasm. The cytoplasmic NPM (NPMc) is thought to be important for leukemogenesis, but the molecular mechanism by which NPMc exerts its leukemogenic potential has never been established. Here we show that ectopic expression of NPMc, but not wild type (WT) NPM, in mouse bone marrow progenitor cells enhanced their colony formation activity, which is associated with increased expression of HoxA9 gene. These data suggest that up-regulation of HoxA9 gene is involved in NPMc-mediated leukemogenesis. By using a set of NPMc mutant, we found that nuclear export signal and oligomerization domain is required for NPMc-mediated transformation activity. This result suggests that NPMc act as an oncogene by sequestering wild type NPM from nucleolus into cytoplasm. To clarify the roles of NPMc in leukemogenesis, we purified the NPM complex and identified YB-1 as a binding partner for NPM. The colony formation activity and expression of Hoxa9 gene, which were increased by NPMc, were impaired in YB-1 null cells. YB-1 was associated with a protein complex, which regulates mRNA stability including Hoxa9 mRNA. These results suggest that YB-1 is required for NPMc-mediated transformation of hematopoietic progenitor cells possibly through stabilization of Hoxa9 mRNA.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2010年度 | 5,400,000 | 1,620,000 | 7,020,000 |
| 2011年度 | 4,500,000 | 1,350,000 | 5,850,000 |
| 2012年度 | 4,500,000 | 1,350,000 | 5,850,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,400,000 | 4,320,000 | 18,720,000 |

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：血液腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

ヒト白血病では高頻度に染色体転座が見られ、その結果2つの異なる遺伝子の融合遺伝子が形成される。急性骨髄性白血病でみられる染色体転座の標的には、AML1、PML、MLL、MOZなどの造血に関わる転写制御因子や転写共役因子が多い。また、AML1やC/EBPaなどの転写因子、FLT3やc-KITやRasなどのチロシンキナーゼやその活性化因子、核小体タンパク質ヌクレオフォスミンNPMなどの微小変異が知られ、このような変異の蓄積が白血病発症の原因と考えられる。MOZやMLLの変異が関与する急性白血病では再発率が高く、予後不良であることが知られている。染色体異常の見られない正常核型AMLでは、高頻度に核小体タンパク質Nucleophosmin(NPM)遺伝子に変異が見られる。その結果生じるNPM変異体は細胞質に局在するが、その機能は不明である。

2. 研究の目的

急性白血病の治療には化学療法が広く用いられ、緩解を維持できないことや再発することがしばしば見られ、再発の有無が生存率を大きく左右する。そのため、治療成績の向上には再発のない新たな治療法の開発が強く望まれる。再発の原因として考えられるのは化学療法に抵抗性を示す白血病幹細胞である。白血病幹細胞は自己複製能を有し、無限に白血病細胞を造り出すため、治療後に白血病幹細胞が残存すると、これが白血病細胞を無限に供給すると考えられる。再発のない根治療法の確立には白血病幹細胞を完全に除去することが必要であると予想され、白血病幹細胞を標的とした治療法の開発が切望される。そこで本研究では、急性骨髄性白血病におけるがん幹細胞の性質を明らかにすることにより、がん幹細胞を標的とした新しい治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) マウス AML モデルの確立

マウス骨髄細胞にNPMcを導入するとメチルセルロース培地で培養する。C57BL6野生型マウス骨髄から造血幹細胞及び前駆細胞を含むc-Kit陽性細胞を採取し、これにNPMcを導入してメチルセルロース培地で培養する。また、NPMcと共にAML患者において同時に変異が高頻度で見られるFLT3-TIDおよびIDH1変異をレトロウイルスベクターを用いて導入し、この感染細胞を放射線照射した同系マウスに移植することにより、マウスに白血病が誘導されるかどうかを調べる。白血病が誘導されれば、このモデル実験系を用いて様々な細胞表面マーカーを解析し、白血病幹細胞特異的に発現する因子を同定する。

(2) NPMc 陽性白血病における YB-1 の役割の解析

これまでNPM複合体を精製することにより、NPMと結合する因子の1つとしてYB-1を同定した。NPMc陽性白血病におけるYB-1の役割を明らかにするため、YB-1欠損マウスの胎仔肝臓細胞にNPMcを導入し、メチルセルロース培地でのコロニー形成能を調べる。YB-1とNPMの欠失変異体を用いた免疫沈降実験により、結合に必要な領域を同定し、相互作用の様式を解析する。

4. 研究成果

NPM変異体をマウスの骨髄細胞に発現させるとそのコロニー形成能が増加し、さらに白血病誘導能を持つ造血系の制御因子HoxA遺伝子の発現が増加することを明らかにした。HoxA遺伝子はNPM変異を持つAML患者のサンプルで発現が高いことが報告されている因子である。今までNPM変異体による細胞の白血病化をモニターする系は作られていなかったが、この系を用いてNPM変異体の機能を

解析することが可能となった。NPM 変異体は核小体ではなく細胞質に局在するという特徴を持ち、また、オリゴメリゼーションドメインを介して野生型 NPM も細胞質へと移行させる。NPM 変異体から核外移行シグナルもしくはオリゴメリゼーションドメインを欠損させると、造血系前駆細胞に対するトランスフォーム能が失われることから、NPM 変異体は野生型 NPM を細胞質へ連れ出すことにより機能している可能性が示唆された。また、NPM 複合体を精製し YB-1 が野生型 NPM と結合する事を見いだした。この複合体に対する NPM 変異体の影響を調べたところ、NPM 変異体は YB-1 と野生型 NPM の結合を阻害することがわかった。一方、YB-1 ノックアウトマウスでは胎児期の造血の場である胎児肝臓の発生が阻害されることが報告されているため、YB-1 が造血系で機能している可能性が考えられた。そこで YB-1 ノックアウトマウスを用いて YB-1 の造血系における機能解析を行ったところ、YB-1 が胎児期の初期の造血の場である卵黄嚢と AGM 領域の細胞のコロニー形成能に必要な因子であり、また HoxA9 遺伝子の発現を正に制御していることがわかった。NPM 変異が関与する白血病における YB-1 の役割を明らかにするため、YB-1 ノックアウトマウス由来の胎仔肝臓細胞に NPM 変異体を発現させたところ、コロニー形成能の増加と HoxA 遺伝子発現の誘導が著しく阻害された。したがって、NPM 変異体による AML 誘導能には YB-1 が必要である可能性が示唆された。

ヒト及びマウス急性骨髄性白血病の幹細胞では M-CSF 受容体の発現が高いことを発見した。マウス白血病モデルを用いて、遺伝子工学的にこの細胞集団にアポトーシスを誘導すると白血病が治癒することから、がん幹細胞を除去することにより白血病が治癒できることを証明した。M-CSF 受容体の発現上昇は、転写因子 PU.1 を介した転写誘導によるものであり、この経路が遮断された PU.1 欠損マウスや M-CSF 受容体欠損マウスでは発症が阻害されることを明らかにした。また、治療抵抗性と関連すると予想される薬剤排出能力の高い SP 細胞は M-CSF 受容体の発現が高かった。これらの結果は、M-CSF 受容体が白血病幹細胞根絶のための優れた標的であることを示唆している。実際、マウス白血病モデルでは M-CSF 受容体特異的抗体やチロシンキナーゼ阻害剤の投与により発症が抑制されることが示された。

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] (12 件)

1. Shima Y, Honma Y, Kitabayashi I.

PML-RAR α and its phosphorylation regulate PML oligomerization and HIPK2 stability. *Cancer Res.* in press. 査読有

2. Shimizu K, Yamagata K, Kurokawa M, Mizutani S, Tsunematsu Y, Kitabayashi I. Roles of AML1/RUNX1 in T-cell malignancy induced by loss of p53. *Cancer Sci.* in press 査読有

3. Haga A, Ogawara Y, Kubota D, Kitabayashi I, Murakami Y, Kondo T. Interactomic approach for evaluating nucleophosmin-binding proteins as biomarkers for Ewing's sarcoma. *Electrophoresis*, 34:1670-1678, 2013. 査読有

4. Iwanami A, Gini B, Zanca C, Matsutani T, Assuncao A, Nael A, Dang J, Yang H, Zhu S, Kohyama J, Kitabayashi I, Cavenee WK, Cloughesy TF, Furnari FB, Nakamura M, Toyama Y, Okano H, Mischel PS. PML mediates glioblastoma resistance to mammalian target of rapamycin (mTOR)-targeted therapies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110:4339-4344, 2013. 査読有

5. Rokudai S, Laptenko O, Arnal SM, Taya Y, Kitabayashi I, Prives C. MOZ increases p53 acetylation and premature senescence through its complex formation with PML. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110:3895-3900, 2013. 査読有

6. Satow R, Shitashige M, Jigami T, Fukami K, Honda K, Kitabayashi I, Yamada T. β -catenin inhibits promyelocytic leukemia protein tumor suppressor function in colorectal cancer cells. *Gastroenterology.* 142:572-581, 2012. 査読有

7. Ozeki C, Sawai Y, Shibata T, Kohno T, Okamoto K, Yokota J, Tashiro F, Tanuma SI, Sakai R, Kawase T, Kitabayashi I, Taya Y, Ohki R. Cancer susceptibility polymorphism of p53 at codon 72 affects phosphorylation and degradation of p53 protein. *J Biol Chem.*, 286:18251-18260, 2011. 査読有

8. Yokoyama A, Ficara F, Murphy MJ, Meisel C, Naresh A, Kitabayashi I, Cleary ML.

Proteolytically cleaved MLL subunits are susceptible to distinct degradation pathways. *J Cell Sci.*, 124:2208-2219, 2011. 査読有

9. Shima Y, Kitabayashi I. Deregulated transcription factors in leukemia. *Int J Hematol.* 94:134-41, 2011. 査読有
10. Mishima Y, Miyagi S, Saraya A, Negishi M, Endoh M, Endo TA, Toyoda T, Shinga J, Katsumoto T, Chiba T, Yamaguchi N, Kitabayashi I, Koseki H, Iwama A. The Hbo1-Brd1/Brpf2 complex is responsible for global acetylation of H3K14 and required for fetal liver erythropoiesis. *Blood.* 118:2443-53, 2011. 査読有
11. Aikawa Y, Katsumoto K, Zhang P, Shima H, Shino M, Terui K, Ito E, Ohno H, Stanley ER, Singh H, Tenen DG, Kitabayashi I. PU.1-mediated upregulation of M-CSFR is critical for leukemia stem cell potential induced by MOZ-TIF2. *Nat Med*, 16: 580-585, 2010. 査読有
12. Yokoyama A, Lin M, Naresh A, Kitabayashi I, Cleary ML. A Higher-Order Complex Containing AF4 and ENL Family Proteins with P-TEFb Facilitates Oncogenic and Physiologic MLL-Dependent Transcription. *Cancer Cell*, 17: 198-212, 2010. 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北林 一生(KITABAYASHI ISSAY)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：20261175

(3) 連携研究者

横山明彦(YOKOYAMA AKIHIKO)

京都大学・メディカルイノベーションセンター・特定准教授

研究者番号：10506710

山形和恒(YAMAGATA KAZUTSUNE)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：70311412

勝本拓夫(KATSUMOTO TAKUO)

独立行政法人国立がん研究センター・研究

所・研究員

研究者番号：50469970