

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24249055

研究課題名(和文)統合的病態パスウェイ解析に基づく白血病の発症機構と治療基盤の確立

研究課題名(英文) Establishment of a platform for elucidation of molecular pathogenesis of leukemia and antileukemia therapy based on integrated pathway analysis

研究代表者

黒川 峰夫 (KUROKAWA, MINEO)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：80312320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Evi-1、BAALCといったAMLの予後不良関連因子の下流パスウェイと特異的な治療標的、Evi-1による急性白血病発症における重要な協調因子、治療抵抗性を示す白血病幹細胞分画の維持機構を明らかにした。またEvi-1の発現を可視化したマウスにおいて、Evi-1陽性細胞が白血病幹細胞をマークし、治療抵抗性と関連することを示した。さらに白血病の進展機序、周囲環境と白血病細胞の相互作用、エピゲノム異常が難治性白血病発症に果たす役割から、白血病の病態を統合的に明らかにした。これらは、難治性造血器腫瘍の治療耐性を克服し、根治に向けた新たな分子標的療法を開発する上で貴重な成果である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we elucidated the down-stream pathway and specific therapeutic target of molecules associated with poor prognosis in acute myeloid leukemia, such as Evi-1 and BAALC, as well as a collaborative factor for Evi-1 induced leukemogenesis and a maintenance mechanism of resistant leukemia initiating cells. By using Evi-1-IRES-GFP knock-in mice, we also showed that Evi-1 marks leukemia initiating cells and Evi-1 is associated with chemoresistance in chronic myeloid leukemia. In addition, we revealed pathogenesis of myeloid malignancies in an integrated manner by demonstrating a mechanisms of leukemia progression, interaction between leukemia cells and surrounding cells and an essential role epigenetic abnormalities play in leukemogenesis. These results provide a foundation to develop novel molecular targeted therapies for refractory hematological malignancies.

研究分野：血液内科学

キーワード：Refractory leukemia Signaling pathway EVI-1 BAALC DNMT3A NF-kB JAK2V617F

### 1. 研究開始当初の背景

現在、白血病の5年生存率は30%程度であり、難治性白血病に対する新しい効果的な治療法が切望されている。難治性白血病の多くを占める急性骨髄性白血病(AML)では、染色体転座が予後を決める重要な指標であるが、実際には急性白血病の約半数は明らかな染色体異常を持たない。しかもこのタイプの白血病は多くの難治性白血病を含んでいる。最近になって、AML1, NPM1, C/EBP $\alpha$ , TET2, ASXL1, IDH1/2, DNMT3A 遺伝子の変異、Evi-1, MN1, BAALC, ERG の活性化など、難治性白血病と関連する新たな遺伝子異常が明らかとなってきた。一つの白血病変異遺伝子が引き起こす細胞内外の病態パスウェイは多岐にわたり、治療標的としての重要性もさまざまである。また多くの急性白血病は、複数の遺伝子異常が協調することにより発症する。したがってその全容解明には、単なる遺伝子異常の同定だけでは不十分であり、複数のシグナルパスウェイや遺伝子異常が絡み合う複雑系の病態解析が必要である。本研究では、遺伝子機能を自由自在にオン・オフできる疾患モデル動物、ゲノムワイドの遺伝子・蛋白質・シグナル解析、臨床情報とリンクしたヒト症例検体解析を、一つの拠点で統合して駆使することにより、複雑系の病態解明に取り組み、治療標的となる病態鍵分子の同定をめざす。

### 2. 研究の目的

本研究では、重要な白血病遺伝子について注目しながら、白血病を遺伝子異常、細胞内病態パスウェイ、細胞間相互作用、個体の各レベルで捉えることにより、その発症・難治化のメカニズムを解明し、そこから治療標的化可能な病態鍵分子を同定する。具体的には(1)難治性遺伝子による分子病態・シグナル異常、(2)前白血病から白血病への進展の機序、(3)細胞間シグナルによる造血と白血病制御、(4)白血病におけるエピゲノム異常に重点を置き、これらを統合しながら白血病病態の全容解明をめざし、得られた知見を制御化合物の創出へと展開することにより、新規治療の基盤を確立する。

### 3. 研究の方法

#### (1)難治性遺伝子による分子病態・シグナル異常

Evi-1 は難治性白血病で高発現する転写因子である。レトロウイルスを用いて Evi-1 マウス造血幹細胞に発現させ、同系マウスに移植することで Evi-1 高発現白血病マウスモデルを作製し、レトロウイルスの挿入部位解析を行うことで、白血病発症において Evi-1 と協調する因子を探索し、C/EBP $\beta$  を同定した。さらに C/EBP $\beta$  の Evi-1 の白血病発症における協調作用について、遺伝学的方法を用いてマウスで検証した。

Evi-1 高発現白血病の治療標的を発見するために、網羅的遺伝子発現解析を用いて

マウス Evi-1 高発現白血病細胞に特異的に高発現する細胞膜タンパク質を検索し、integrin  $\alpha$ 2b CD41 を同定した。CD41 の Evi-1 高発現白血病における機能・下流シグナルを解析するとともに、CD41 および下流シグナル分子の阻害が Evi-1 高発現白血病に治療効果をもたらすかどうかをマウスモデルを用いて検証した。

我々は Evi-1 遺伝子座に GFP をノックインしたマウス(Evi-1/GFP マウス)を作製したが、このマウスを用いてリアルタイムで Evi-1 を発現する細胞をトレースすることが可能である。チロシンキナーゼ阻害薬中止後の再発、急性転化後の治療抵抗性が問題となる、慢性骨髄性白血病(CML)の慢性期(CML-CP)、急性転化期(CML-BC)それぞれのモデルマウスを Evi-1/GFP バックグラウンドで作製することで、Evi-1 発現細胞の、leukemia initiating cell (LIC)としての機能およびチロシンキナーゼ治療抵抗性に与える影響を解析した。さらに Evi-1 ノックアウトマウス、レトロウイルスによる Evi-1 の発現により、Evi-1 が Bcr-Abl による白血病発症に与える影響を解析した。

AML の予後不良因子として知られる BAALC 高発現が白血病の病態に与える影響を解析するため、ヒト白血病細胞に BAALC を発現させ、あるいはノックダウンし、下流のパスウェイを網羅的に解析し、MEK-ERK 経路が特異的に活性化されていることを明らかにした。さらに MEK-ERK 経路を抑制することで、BAALC 高発現白血病細胞に対して治療効果を有するかどうかを、in vitro あるいは免疫不全マウスを用いて作製したヒト白血病異種移植モデルを用いて検証した。

予後不良であることが知られている MLL 融合遺伝子陽性白血病(MLL 白血病)のマウスモデルを用いて、その治療抵抗性に関わる LIC の維持機構を解析した。遺伝子網羅的解析を用いて、MLL 白血病 LIC において NF- $\kappa$ B シグナルが活性化されていることを明らかにし、その NF- $\kappa$ B を含むパスウェイが MLL 白血病 LIC の維持に果たす役割を明らかにし、そのパスウェイを阻害することが MLL 白血病に対して治療効果を持ちうるかどうかを in vitro あるいはマウスモデルを用いて検証した。

#### (2) 前白血病から白血病への進展の機序

真性多血症は JAK2 の活性化型変異をもつ骨髄増殖性腫瘍の一種型であり、白血病への進展が主要な死因のひとつである。我々は JAK2 活性化型変異と p53 の不活性化を共存させることでマウス白血病モデルを作製することが可能であるか検討した。

#### (3)細胞間シグナルによる造血と白血病制御

白血病の成立・進展を助長する要素の一つ

にゲノム不安定性がある。このメカニズムの一端を解明するため、骨髄増殖性腫瘍(MPN)の代表的なモデルであるレトロウイルス JAK2V617F 発現マウスモデルを用いて、腫瘍細胞が周囲の正常細胞の DNA 傷害を惹起することを証明し、網羅的遺伝子発現解析を用いて腫瘍細胞から分泌され DNA 傷害を誘導する分子 Lcn2 を同定し、MPN におけるゲノム不安定性の分子基盤を明らかにした。

骨髄においては脂肪細胞が正常造血細胞・白血病細胞に何らかの影響を与えることが示唆されているが、その詳細は明らかになっていない。我々は脂肪細胞特異的に発現する重要な液性因子 adiponectin に注目し、ノックアウトマウスを用いて正常造血細胞・白血病細胞における作用を解析した。

#### (4)白血病におけるエピゲノム異常

AML 患者の約 20%で de novo DNA methylation に関わる遺伝子である DNMT3A の変異が認められ、この変異を伴っている症例は予後不良であることが報告されているが、その機能的意義は明らかでない。そこで我々は DNMT3A 遺伝子変異が DNA メチル基転移酵素としての機能やヒストンメチル基転移酵素との結合、それに伴うヒストン修飾や転写制御等における機能にどのような影響を与えるかを検討し、AML の発症・維持において DNMT3A 変異がきたすエピゲノム異常について検討した。

### 4. 研究成果

#### (1)難治性遺伝子による分子病態・シグナル異常

Evi-1 白血病の協調因子として、骨髄球系細胞の分化に関わる C/EBPbeta を同定した。C/EBPbeta の short isoform である LIP を Evi-1 と同時にマウス造血幹細胞に発現させることで、LIP が Evi-1 の白血病発症を促進することを明らかにした(Watanabe-Okochi et al. Blood 2011)。

Evi-1 高発現白血病細胞では thrombopoietin(THPO)シグナルが重要な役割を果たしていることを示した。Evi-1 高発現白血病細胞の中でも THPO の受容体である MPL を発現している分画には LIC が多く含まれており、THPO-MPL を遮断することにより Evi-1 高発現白血病の発症が抑制された。MPL 高発現分画はフィーダー細胞との共培養において THPO 依存性に抗アポトーシス分子である BCL-xL の過剰発現を示し、高い生存・増殖活性を示した。このことから THPO-MPL シグナル経路が Evi-1 高発現白血病の治療抵抗性の一因を担っていることを明らかにした(Nishikawa et al. Blood 2014)。

CML-CP、CML-BC いずれのモデルにおいても、LIC 活性を持つ細胞は Evi-1 陽性分画

に濃縮されていた。チロシンキナーゼ阻害剤治療により Evi-1 陽性細胞が残存し、Evi-1 高発現は治療抵抗性とも関連していることが明らかになった。さらに Evi-1 を共発現することで Bcr-Abl による白血病発症が促進し、Evi-1 の heterozygosity により白血病発症が遅延したことから、Evi-1 は CML の発症に関与していることが示唆された(Sato et al. Oncogene 2014)。

BAALC 高発現 AML 細胞では MEK-ERK 細胞が特異的に活性化されていることを明らかにしたが、分子レベルでは BAALC が MEK-ERK 経路に必須の足場タンパク質である MEKK1(MAP3K1)と結合して、ERK 脱リン酸化酵素である MKP3 と ERK との結合を競合的に阻害することを示した。さらに BAALC が単球系細胞の分化成熟に重要な転写因子である KLF4 と結合して細胞質に隔離することでその作用を阻害することを明らかにした。MEK-ERK 経路の阻害、KLF4 の作用回復が、BAALC 高発現白血病の治療として有望であることを、in vitro およびマウスモデルを用いた in vivo の系で証明した(Morita et al. Leukemia. In Press)。

MLL 白血病マウスモデルにおいて、白血病細胞の中でも LIC を多く含む分画において NF- $\kappa$ B が活性化していることを示し、その他のマウス AML モデル、あるいはヒト AML においても同様に、LIC を多く含む分画では NF- $\kappa$ B が活性化されていることを示した。さらにこの機構の重要性を、マウス in vivo 白血病モデルにおいて、bortezomib の投与、あるいは構成要素のノックアウトによって NF- $\kappa$ B パスウェイを阻害することで、AML の発症が抑制されることによって証明した。さらにこのシグナルの活性化には、自身の産生する TNFalpha によるポジティブフィードバックが重要であることを示した(Kagoya et al. J Clin Invest 2014)。

#### (2)前白血病から白血病への進展の機序

JAK2 活性化型変異と p53 の不活性化を共存させることでマウス赤白血病モデルを作製することに成功し、真性多血症が白血病へ進展するメカニズムとして p53 の不活性化が関与していることを突き止めた。また白血病細胞の中でも、CD71 陽性細胞および c-kit 陽性、Sca1 陽性、Lineage マーカー陰性の細胞に白血病幹細胞が多く存在することを明らかにした。(Kishino et al. 投稿中)

#### (3)細胞間シグナルによる造血と白血病制御

JAK2V617F MPN モデルにおいて、腫瘍細胞の産生する液性因子 Lcn2 によって隣接する正常造血細胞の活性酸素が増加し、ゲノム DNA の損傷が亢進することを見出した。細胞内の活性酸素増加には、細胞内への鉄の蓄積が関与していた(Kagoya

et al. Blood 2014).

Adiponectin を欠く造血環境では骨髄マクロファージからの炎症性サイトカインの分泌が慢性的に亢進し、造血幹・前駆細胞分画において増殖シグナルの細胞内抑制因子である Socs3 が異常に高発現する結果、サイトカインや感染など顆粒球増殖刺激に対する増殖応答が減弱することを明らかにした(Masamoto et al. 投稿中)。

#### (4)白血病におけるエピゲノム異常

変異型 DNMT3A を過剰発現した造血幹細胞において網羅的に遺伝子発現プロファイリングを行ったところ、Hoxb 群の遺伝子発現が亢進し、また骨髄球系分化関連遺伝子(PU.1, Cebpa)の遺伝子発現が低下していることが明らかとなった。Hoxb 群ではプロモーター領域において低メチル化状態を認め、発現の変化と相関を認めた。一方分化関連遺伝子ではプロモーター領域のメチル化に変化を認めなかった。また DNMT3A がポリコム抑制複合体 1 (PRC1)と結合すること、および変異によりその結合能が亢進することを見出し、DNMT3A の変異によって分化関連遺伝子の制御領域に PRC1 複合体構成蛋白がより多くリクルートされることを明らかにした。(Koya et al. 投稿中)

#### 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 111 件)

黒川峰夫 (他 6 名, 7 番目). Thrombopoietin/MPL signaling confers growth and survival capacity to CD41-positive cells in a mouse model of Evi1 leukemia. Blood. 124:3587-96. 2014 査読有

doi: 10.1182/blood-2013-12-546275.

黒川峰夫 (他 6 名, 7 番目) JAK2V617F+ myeloproliferative neoplasm clones evoke paracrine DNA damage to adjacent normal cells through secretion of lipocalin-2. Blood. 124:2996-3006. 2014 査読有

doi: 10.1182/blood-2014-04-570572.

黒川峰夫 (他 14 名, 15 番目). Evi1 defines leukemia-initiating capacity and tyrosine kinase inhibitor resistance in chronic myeloid leukemia. Oncogene. 33:5028-38. 2014 査読有

doi: 10.1038/onc.2014.108.

黒川峰夫 (他 11 名, 12 番目) Generation of induced pluripotent stem cells derived from primary and secondary myelofibrosis patient samples. Experimental Hematology. 42:816-25.

2014. 査読有

doi: 10.1016/j.exphem.2014.03.010.

黒川峰夫 (他 17 名, 18 番目). Recurrent CDC25C mutations drive malignant transformation in FPD/AML. Nature Communications. 5:4770. 2014 査読有

doi: 10.1038/ncomms5770.

黒川峰夫 (他 7 名, 8 番目). Single-cell gene expression analysis reveals clonal architecture of blast-phase chronic myeloid leukaemia. British Journal of Haematol. 165:414-6. 2014 査読有

doi: 10.1111/bjh.12726.

黒川峰夫 (他 6 名, 7 番目). Inhibition of histone methyltransferase EZH2 depletes leukemia stem cell of mixed lineage leukemia fusion leukemia through upregulation of p16. Cancer Science. 105:512-9. 2014 査読有

doi: 10.1111/cas.12386.

黒川峰夫 (他 10 名, 10 番目). The IL-2/CD25 axis maintains distinct subsets of chronic myeloid leukemia-initiating cells. Blood. 123:2540-9. 2014 査読有

doi: 10.1182/blood-2013-07-517847.

黒川峰夫 (他 8 名, 7 番目). Prdm16 is required for the maintenance of brown adipocyte identity and function in adult mice. Cell Metabolism. 19:593-604. 2014 査読有

doi: 10.1016/j.cmet.2014.03.007.

黒川峰夫 (他 19 名, 17 番目). The role of alloantibodies against human platelet antigen-15 in multiply platelet transfused patients. Transfusion. 54:1093-9. 2014 査読有

doi: 10.1111/trf.12455.

黒川峰夫 (他 6 名, 6 番目). Cas adaptor proteins organize the retinal ganglion cell layer downstream of integrin signaling. Neuron. 81:779-86. 2014 査読有

doi: 10.1016/j.neuron.2014.01.036

黒川峰夫 (他 9 名, 10 番目). Positive feedback between NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  promotes leukemia-initiating cell capacity. Journal of Clinical Investigation. 124:528-42. 2014 査読有

doi: 10.1172/JCI68101.

黒川峰夫 (他 5 名, 6 番目). Intracellular reactive oxygen species mark and influence the megakaryocyte-erythrocyte progenitor fate of common myeloid progenitors. Stem Cells. 32:548-57. 2014 査読有

doi: 10.1002/stem.1588.

黒川峰夫 (他 15 名, 13 番目). Transcription factor RUNX1 promotes survival of acute myeloid

leukemia cells. *Journal of Clinical Investigation*. 123:3876-88. 2013 査読有

doi: 10.1172/JCI68557.

黒川峰夫 (他 5 名, 3 番目). Roles of AML1/RUNX1 in T-cell malignancy induced by loss of p53. *Cancer Science*. 104:1033-8. 2013 査読有

doi: 10.1111/cas.12199.

黒川峰夫 (他 15 名, 16 番目). The shortest isoform of C/EBP $\beta$ , liver inhibitory protein (LIP), collaborates with Evi1 to induce AML in a mouse BMT model. *Blood*. 121:4142-55. 2013 査読有

doi: 10.1182/blood-2011-07-368654.

黒川峰夫 (他 13 名, 10 番目). Prdm3 and Prdm16 are H3K9me1 methyltransferases required for mammalian heterochromatin integrity. *Cell*. 150:948-60. 2012 査読有

doi: 10.1016/j.cell.2012.06.048.

黒川峰夫 (他 13 名, 14 番目). Generation of induced pluripotent stem cells from primary chronic myelogenous leukemia patient samples. *Blood*. 119:6234-42. 2012 査読有

doi: 10.1182/blood-2011-07-367441.

黒川峰夫 (他 12 名, 13 番目). Multiple phosphorylation sites are important for RUNX1 activity in early hematopoiesis and T-cell differentiation. *European journal of immunology*. 42:1044-50. 2012 査読有

doi: 10.1002/eji.201040746.

[学会発表] (計 16 件)

Regulation of chronic myeloid leukemia stem cells by leukemia oncogene Evi1. 第 10 回幹細胞シンポジウム, 2012 年 5 月 31 日 ~ 6 月 2 日, 淡路 (口演)

難治性白血病関連因子 Evi1 による慢性骨髄性白血病幹細胞制御, 第 16 回日本がん分子標的治療学会, 2012 年 6 月 7 日, 小倉 (口演)

黒川峰夫. Regulation of chronic myeloid leukemia stem cells by leukemia oncogene Evi1. 17th Congress of EHA, 2012 年 6 月 13~16 日, オランダ (口演)

黒川峰夫. 血液疾患と iPS 細胞, 第 74 回日本血液学会学術集会, 2012 年 10 月 20 日, 京都 (口演)

黒川峰夫. NF- $\kappa$ B/TNF- $\alpha$  positive feedback loop with active proteasome machinery supports myeloid leukemia initiating cell capacity. 54th ASH Annual Meeting and Exposition, 2012 年 12 月 8~11 日, アメリカ (口演)

黒川峰夫. Modeling Chronic Myelomonocytic Leukemia Through Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells, 55<sup>th</sup> ASH Annual Meeting and Exposition, 2013 年 12 月 7 日 ~ 10 日, アメリカ

黒川峰夫. The Genetic Landscape of FPD/AML Revealed CDC25C Mutation as a Driver That promotes Malignant Transformation, 55<sup>th</sup> ASH Annual Meeting and Exposition, 2013 年 12 月 7 日 ~ 10 日, アメリカ

黒川峰夫. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells recapitulate The Pathophysiology of Familial Platelet Disorder with Predisposition to Acute Myelogenous Leukemia, 55<sup>th</sup> ASH Annual Meeting and Exposition, 2013 年 12 月 7 日 ~ 10 日, アメリカ

黒川峰夫. Anti-Obese Hormone Adiponectin Regulates Emergency Hematopoiesis and Antibacterial Response Through Downregulation of Socs3 in Hematopoietic progenitor Cells, 55<sup>th</sup> ASH Annual Meeting and Exposition, 2013 年 12 月 7 日 ~ 10 日, アメリカ

黒川峰夫. Leukemia-Associated Mutations of DNMT3A Inhibit Differentiation of Hematopoietic Stem Cells and Promote Leukemic Transformation Through Abberant Recruitment of Bmi1, 55<sup>th</sup> ASH Annual Meeting and Exposition, 2013 年 12 月 7 日 ~ 10 日, アメリカ

黒川峰夫. Loss of p53 Induces Leukemic Transformation in a Murine Model of JAK2V617F-Induced Polycythemia Vera, 55<sup>th</sup> ASH Annual Meeting and Exposition, 2013 年 12 月 7 日 ~ 10 日, アメリカ

黒川峰夫. JAK2V617F Mutation Evokes Paracrine DNA Damage to Adjacent Normal Cells Via Secretion of Lipocalin-2, 55<sup>th</sup> ASH Annual Meeting and Exposition, 2013 年 12 月 7 日 ~ 10 日, アメリカ

黒川峰夫. BAALC Acts as a Scaffold-Like Protein in the ERK Signaling Pathway and Promotes Leukemogenesis by Facilitating MEK-Mediated ERK Activation, 55<sup>th</sup> ASH Annual Meeting and Exposition, 2013 年 12 月 7 日 ~ 10 日, アメリカ

黒川峰夫. Enhanced Autophagy Promotes Survival of Peripheral Blast Cells from Murine Acute Myeloid Leukemia, 56<sup>th</sup> ASH Annual Meeting and Exposition, 2014 年 12 月 6 日 ~ 9 日, アメリカ

黒川 峰夫. BAALC Promotes Leukemogenesis by MAPK-dependent Proliferation and KLF4-derived Differentiation Block, 76<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, 2014年10月31日～11月2日, 大阪(口演)

黒川峰夫. iPS細胞を用いた白血病の病態解析, 76<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, 2014年10月31日～11月2日, 大阪(教育講演)

〔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〕

ホームページ等

<http://u-tokyo-hemat.com/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

黒川 峰夫 (KUROKAWA MINEO)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：80312320