

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871159

研究課題名(和文) NPM変異体による急性骨髄性白血病発症の分子メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of NPM mutant-mediated acute myeloid leukemia

研究代表者

小川原 陽子 (Ogawara, Yoko)

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：30599626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：正常核型の急性骨髄性白血病(AML)では、核小体タンパク質NPMとIDH、DNMT3A、FLT3の変異が高頻度に重複して起こる。我々はこれらの4変異遺伝子依存的にAMLを発症するマウスモデルを作製した。このAML発症マウスを用いた解析から、変異型IDHは細胞の分化を阻害し、白血病幹細胞性の維持に必要であることを明らかにした。本研究により、変異型IDHは癌の治療標的として妥当な因子であることが初めて示された。

研究成果の概要(英文)：In normal karyotype acute myeloid leukemia (AML), simultaneous mutations in NPM, IDH, DNMT3A and FLT3 occur frequently. We generated AML mouse model, the onset of which depends on these four mutant genes. By using these AML model mice, we showed that IDH mutant inhibits differentiation of cells and is necessary for the maintenance of leukemia stem cells. This study is the first to demonstrate that IDH mutant is a reasonable therapeutic target for cancer.

研究分野：生物学

キーワード：NPM IDH AML 2HG 5hmC

1. 研究開始当初の背景

(1) 正常核型急性骨髄性白血病(AML)では、核小体タンパク質 NPM が細胞質に局在するようになる変異(cytoplasmic NPM: NPMc)を高い割合で発現する。NPMc-AML は発症を担うドライバー変異であると考えられているものの、その作用機序はほとんど解明されていない。

(2) NPMc の作用機序の解明が進まない一因として、発症モデル系が確立していないことがあげられる。我々は既に NPM、IDH2、DNMT3A、FLT3 の変異体を4つ同時に造血系前駆細胞に感染させると高頻度に AML を発症することを見出していた。

(3) NPMc が機能する分子メカニズムについては、まだ殆ど報告がなされていない。我々は既に、マウスの造血系前駆細胞に NPMc を発現させると Hoxa9 の発現量が増加して細胞がトランスフォームすることを明らかにしていた。そして、NPM 複合体を精製することにより、YB-1 という核酸結合タンパク質が NPM と結合しており、NPMc の持つトランスフォーム能には YB-1 が必要であるということを見出していた。YB-1 は mRNA の安定性を制御する複合体に含まれており、NPMc は Hoxa9 mRNA を安定化することを我々は既に明らかにしていた。

2. 研究の目的

(1) 正常核型 AML では、NPM の変異に加えて、IDH1/2、DNMT3A、FLT3 の変異が高頻度に重複して見られる。我々は既に NPM、IDH2、DNMT3A、FLT3 の4変異遺伝子を発現することにより AML を発症することを明らかにしていた。そこで、NPMc 以外の3遺伝子のうちどれが AML 発症に必要なのかを検討し、NPMc-AML 発症モデルマウスを確立する。

(2) 発症マウスから AML 細胞を採取し、遺伝子発現や DNA の修飾状態等の解析を行う。また、NPMc-AML 発症を誘導した遺伝子を cre-loxp システムを用いてノックアウトすることにより、発症維持に必要な遺伝子の解明を行う。

(3) 我々は NPMc の活性に YB-1 という因子が必要であることを既に示しているため、YB-1 の機能解析を行う。

以上のアプローチにより、治療薬の標的となる因子を同定する。

3. 研究の方法

(1) NPMc-AML 発症モデルマウスの作成

NPM^{+/-}マウスの造血系前駆細胞にレトロウイルスを用いて[NPM、IDH2、DNMT3A、FLT3]変異体を4個、もしくは3個の組み合わせで感染させた。感染させた細胞を半致死量放射線照射したマウスに移植した。半年～一年経過観察を行い、発症したマウスから骨髄細胞を採取して解析を行った。

(2) 遺伝子発現解析

マウスの骨髄細胞から RNA を回収し、リア

ルタイム PCR およびマイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイ解析のデータを用いて、GSEA 解析を行った。

(3) cre-loxp による IDH 変異体除去

NPM^{+/-}ERT2Cre⁺マウスの造血系前駆細胞に[NPM、DNMT3A、FLT3]の3変異遺伝子と共に loxp 配列で挟み込んだ IDH2 変異体を感染させて、NPMc-AML を発症させた。この NPMc-AML 細胞を用いて2次移植を行い、マウスにタモキシフェンを投与することにより IDH2 変異体を除去して、その影響を解析した。

(4) AML 幹細胞性の解析

NPMc-AML マウスと、IDH2 変異体を除去した NPMc-AML マウスから骨髄細胞を回収した。AML 幹細胞マーカー(L-GMP 等)で染色を行い、フローサイトメトリーを用いて解析した。また、この骨髄細胞を用いて3次移植を行い、AML を発症出来るかどうか(AML 幹細胞性を維持しているかどうか)を調べた。

(5) 5hmC 修飾の網羅的解析

マウスの骨髄細胞からゲノムを精製し、超音波処理で断片化した後に 5hmC を含む DNA を濃縮した。この濃縮サンプルを次世代シーケンサーにかけ、5hmC 修飾がコントロールサンプルに比べて減少している遺伝子領域を同定した。

4. 研究成果

(1) NPMc-AML 発症モデルマウスの確立

NPM^{+/-}の造血系前駆細胞にレトロウイルスを用いて NPM、IDH2、DNMT3A、FLT3 の4変異遺伝子を感染させてマウスに移植すると、全マウスで AML を発症する。このうち、どれか一つを欠く3変異遺伝子の組み合わせでは、いずれの場合も発症が著しく遅延した。また、発症した場合でも骨髄中の未分化な芽球の割合は低く、骨髄増殖性疾患様の表現型を示して AML には至らなかった。つまり、この NPMc-AML 発症マウスは NPMc、IDH2 変異体、DNMT3A 変異体および FLT3 変異体依存的である。以上の結果から、4変異遺伝子全ての発現が効率的に AML を発症させるために必要であることが明らかになった。本研究により、NPMc、IDH2 変異体および DNMT3A 変異体依存的な AML 発症マウスを世界に先駆けて開発することに成功した。

(2) NPMc-AML 細胞の遺伝子発現解析

NPMc-AML を発症したマウスの骨髄細胞から RNA を精製し、マイクロアレイにより網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、白血病発症を協調的に誘導することがよく知られている Hoxa9 と Meis1 の発現量が増加していることが明らかになった。In vitro でそれぞれの変異遺伝子を造血系前駆細胞に感染させたところ、NPMc と IDH2 変異体がそれぞれ Hoxa9 と Meis1 の発現量を増加させていることが明らかになった。従って、この NPMc-AML の系において NPMc と IDH2 変異体が発症に特に重要な役割を果たしていることが示唆された。

NPMcのみを感染させた造血系前駆細胞は骨髄中で増殖することが出来なかった。一方で、IDH2変異体を感染させた細胞は骨髄中で増殖した。NPMcと共にIDH2変異体を感染させると、NPMcとIDH2変異体を両方発現する細胞が骨髄中で増殖し、骨髄増殖性疾患様の表現型を示した。以上の結果から、IDH2変異体はNPMcを発現している細胞の生体への生着・生存に寄与することが明らかになった。

マイクロアレイ解析のデータを用いてGSEA(gene set enrichment analysis)を行い、低酸素状態および造血系前駆細胞で発現が高い遺伝子群の発現がNPMc-AML細胞で増加していることを見出した。IDH2変異体を発現させるだけでも低酸素シグナルが活性化していたことから、IDH2変異体の下流で低酸素シグナルが制御されているのだと考えられる。低酸素シグナルは正常造血幹細胞の維持に、ストレス条件下で特に必要であることが報告されているが、AML発症にも関与している可能性が示唆された。

(3) IDH2変異体はAML幹細胞性の維持に必要である

IDH2変異体がNPMc-AML発症において特に重要な役割を果たすことが(2)の結果から示唆された。変異型IDHはAMLのみならずグリオーマや様々な癌で高頻度に変異していることが報告されている。変異型IDHは2HG(2-hydroxyglutarate)という癌代謝物を産生するようになる機能獲得型の変異である。細胞内には複数の α -KG依存性の二原子酸素添加酵素が存在しており、2HGはそれらの酵素活性を阻害することが報告されている。この2HGの機能は正常な細胞には必要ないため、変異型IDHに対する阻害剤は副作用のない癌治療薬となることが期待されている。そして現在、多くの製薬会社がIDH変異体に対する阻害剤の開発に鎬を削っている。その一方で、IDH変異体を阻害することが本当に癌治療につながるのかどうかの証明はなされていなかった。そこで、変異型IDHが治療標的となるのかどうかを明らかにすることを試みた。NPMc-AMLマウスにおいて変異型IDHをあらかじめloxP配列で挟み込んでおき、Creの発現を誘導してIDH2変異体を除去しその影響を調べた。その結果、白血病幹細胞性が失われており、マウスの生存期間が著しく伸長することが明らかになった。以上の結果から、IDH変異体に対する阻害剤は抗がん剤になりうるということが初めて明確に示された。この知見に基づき、現在製薬会社と共同研究を行いIDH変異体に対する阻害剤の開発に取り組んでいる。

(4) IDH変異体は分化誘導因子の発現を抑制する

AMLにおいてIDH変異とTET変異は相互排他的に起こる。IDH変異体は α -KG依存性の二原子酸素添加酵素であるTETの機能を阻害するため、AMLにおけるIDH変異体の主要な機能はTETを阻害することであると考えられて

いる。TETは5mC(5-methylcytosine)から5hmC(5-hydroxymethylcytosine)を産生する酵素で、5hmCはDNA脱メチル化の中間産物でありまた転写制御にも関与することが知られている。次世代シーケンサーを用いて5hmC修飾部位を網羅的に解析すると、分化誘導因子(Ebf1, Spib等)の5hmC修飾および発現が変異型IDHにより阻害されていることが明らかになった。以上の結果は、IDH変異体による細胞分化の阻害がAML幹細胞性に寄与していることを示唆している。

(5) 当初の計画では、NPMc-AMLにおけるYB-1の機能解析を行う予定であった。しかし、IDH2変異体の重要性が明らかになったため、世界的に競争が激しいIDH変異体の解析を先に行うことになった。そのためYB-1の機能解析は今後行う予定である。

(6) 今後の展望

本研究により、IDH変異体の機能の一端(Meis1の発現誘導、骨髄への細胞生着の促進、低酸素シグナルの活性化、分化誘導因子の阻害等)が明らかになった。しかし、これらの機能がAMLの発症や維持にどの程度寄与しているのかはまだ明らかになっていない。また、細胞内にはTET以外にも重要な働きをする α -KG依存性の二原子酸素添加酵素が複数存在するため、IDH変異体は広範なシグナルに作用を及ぼしていると考えられる。NPMc-AMLモデルマウスを用いて、IDH変異体の機能をより詳細に解析する予定である。

また、NPMcの機能の解明は、研究開始から2年以上経過した現在でも世界的に殆ど進んでいない。この解析もNPMc-AMLモデルマウスを用いて今後有利に進めることが出来ると考えている。

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 6件)

Ogawara Y, Katsumoto T, Aikawa Y, Shima Y, Kagiya Y, Soga T, Matsunaga H, Seki T, Araki K, Kitabayashi I, IDH2 and NPM1 Mutations Cooperate to Activate Hoxa9/Meis1 and Hypoxia Pathways in Acute Myeloid Leukemia., *Cancer Research*, 査読有, 75(10)巻, 2015, 2005-16

DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2200

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, 査読有, 34(11)巻, 2013, 1670-8

DOI: 10.1002/elps.201200661.

〔学会発表〕(計 12件)

Yoko Ogawara, Takuo Katsumoto, Yutaka Shima, Tomoyoshi Soga, Issay Kitabayashi, IDH mutant and cancer., 第73回日本癌学会学術集会, 2014年9月25日, 「パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)」

Yoko Ogawara, Takuo Katsumoto, Yukiko Aikawa, Yutaka Shima, Yuki Kagiya, Hironori Matsunaga, Takahiko Seki, Kazushi Araki, Issay Kitabayashi, Critical roles of the IDH2 mutation in development and maintenance of acute myeloid leukemia., 2014 Keystone Symposia Conference (X6: Tumor Metabolism), 2014年3月18日, 「ウイスラー(カナダ)」

Yoko Ogawara, Takuo Katsumoto, Yukiko Aikawa, Yutaka Shima, Yuki Kagiya, Hironori Matsunaga, Takahiko Seki and Issay Kitabayashi, Critical roles of the IDH2 mutation in development and maintenance of acute myeloid leukemia., 55th American Society of Hematology, Annual Meeting and Exposition, 2013年12月9日, 「ニューオーリンズ(アメリカ)」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川原 陽子 (OGAWARA, Yoko)

国立がん研究センター研究所・造血器腫瘍研究分野・研究員

研究者番号: 30599626