

平成22年 3月31日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005年～2009年

課題番号：17013091

研究課題名（和文）白血病関連因子 AML1 複合体の機能解析

研究課題名（英文）Functional study of leukemia-associated factor AML1

研究代表者

北林 一生 (KITABAYASHI ISSAY)

国立がんセンター（研究所及び東病院臨床開発センター）・分子腫瘍学部・部長

研究者番号：20261175

研究成果の概要（和文）：急性白血病において最も高頻度に変異を受ける AML1 複合体を精製し、CBF $\beta$  の他にヒストンアセチル化酵素 p300/CBP や MOZ、前骨髄性白血病タンパク質 PML、リン酸化酵素 HIPK2 が含まれることを見いだした。また、PML がユビキチンリガーゼ SCF 複合体の構成因子 Fbx3 と結合し、SCF<sup>Fbx3</sup> によるユビキチン-プロテアソーム経路を介する転写コアクチベーターの分解を阻害することを明らかにした。この結果より、PML は NB で転写因子複合体の形成の足場となるだけでなく、転写因子複合体に含まれる構成因子の安定化を誘導することで、AML1 や PU.1 などを経した転写を活性化し、顆粒球分化を誘導することが示唆された。一方、PML-RAR $\alpha$  は HIPK2 を著しく不安定化させ、PU.1 や AML1 を介した転写を抑制した。

研究成果の概要（英文）：The AML1 gene is the most frequent target of chromosome translocations and other mutations in acute myeloid leukemia. We purified AML1 complex and found that the complex contained p300/CBP, MOZ, PML, and HIPK2 as well as CBF $\beta$ . PML is a nuclear protein that functions as a regulator of transcription, cell proliferation, apoptosis, and myeloid cell differentiation. PML interacts with several transcription factors, such as AML1, PU.1, C/EBP and p53, as well as their co-activators, such as HIPK2 and p300, resulting in the activation of transcription. Although PML is thought to achieve transcription activation by stabilizing the transcription-factor complex, little is known about the underlying molecular mechanism. To clarify the role of PML in transcription regulation, PML complex was purified and Fbx3, Skp1, and Cullin1 were identified as novel components of this complex. Fbx3 formed SCFFbx3 ubiquitin ligase and promoted the degradation of HIPK2 and p300 by the ubiquitin-proteasome pathway. PML inhibited this degradation through a mechanism that unexpectedly did not involve inhibition of the ubiquitination of HIPK2. PML, Fbx3, and HIPK2 synergistically activated p53-induced transcription. Our findings suggest that PML stabilizes the transcription-factor complex by protecting HIPK2 and p300 from SCFFbx3-induced degradation until transcription is completed. In contrast, the leukemia-associated fusion PML-RAR $\alpha$  induced the degradation of HIPK2, suggesting that PML-RAR $\alpha$  degrade co-activators to block transcription by antagonizing PML.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	8,000,000	0	8,000,000
2006年度	7,700,000	0	7,700,000

2007年度	7,700,000	0	7,700,000
2008年度	8,300,000	0	8,300,000
2009年度	8,300,000	0	8,300,000
総計	40,000,000	0	40,000,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：① AML1 ② 白血病 ③ 造血 ④タンパク質複合体 ⑤転写制御

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト白血病では高頻度に特異的な染色体転座が見られ、その結果生じる融合遺伝子産物の発現やがん遺伝子の発現異常が発症に関与する。そのような遺伝子のなかで AML1 遺伝子は、最も高頻度に染色体転座の標的となる。AML1 は CBFb/PEBP2b と二量体を形成して特異的 DNA に結合する転写因子で、我々は、AML1 複合体を精製し、CBFb の他にヒストンアセチル化酵素 p300/CBP 及び MOZ、前骨髄性白血病タンパク質 PML、タンパク質リン酸化酵素 HIPK1/2 が AML1 複合体に含まれることを報告してきた。これらの AML1 と複合体を形成する CBFb、p300/CBP、MOZ、PML はいずれも急性骨髄性白血病で見られる染色体転座に関与するが、我々は HIPK2 遺伝子も急性骨髄性白血病及び骨髄異形成症候群で変異が見られることを新たに見出した。AML1 は、造血細胞に特異的な遺伝子群の発現制御に関与し、マウスモデルによる解析から AML1、CBFb 及び p300/CBP も造血に重要であることが明らかにされている。

### 2. 研究の目的

急性白血病における染色体転座の主要な標的である AML1 及びその複合体の機能を明らかにすることより、白血病発症の分子メカニズムを解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

AML1 複合体を構成する MOZ 及び AML1K/HIPK のノックアウトマウスを作成し、造血及び血管新生における役割を調べる。16年度までの解析から MOZ<sup>-/-</sup>マウスは胎生 15.5 日頃に致死であり、胎仔肝臓における造血能が低下していることが示唆されているので、試験管内におけるコロニー形成能や成体への骨髄移植により、どの系統の造血細胞に異常があるかを解析する。一方、HIPK<sup>-/-</sup>マウスは、これまでに胎生 10.5 日頃に致死であり、血管新生及び造血の両方に異常があることが観察されている。AGM 及び P-Sp 培養により、造血能及び血管形成

の異常について解析する。

PML のリン酸化は PML 及び PML を含む AML1 複合体の機能の制御に重要であると考えられることから、この制御メカニズムを明らかにする。これまでの解析から 2 種類の PML のリン酸化酵素を既に同定している。これらによるリン酸化と SUMO-1 化・新規修飾・細胞内局在・転写活性化能・細胞分化との関連性について解析する。2 つのキナーゼのうち、骨髄性細胞で発現するのは 1 つ (PML キナーゼ I) であることから、特に PML キナーゼ I の阻害剤の開発を中心に行う。これまでのスクリーニングからある化合物 B が PML キナーゼ I の活性を顕著に阻害することを見出している。さらにより特異性・活性の高い化合物を得るため、この化合物 B の誘導体を合成し、PML キナーゼ I に対する阻害効果を検討する。白血病由来培養細胞及び白血病モデルマウスを用いて、同定された化合物の細胞分化誘導能の有無について検討する。

AML1 キナーゼは、AML1 の他に AML1 の共役因子 (コアクチベーター) である p300 及び MOZ のリン酸化を促進して、AML1 複合体による転写を促進することから、AML1 キナーゼ活性の制御は AML1 複合体の制御及び造血細胞分化に非常に重要であることが示唆される。活性型 AML1 キナーゼは高度にリン酸化されていて、その不活性型変異体はリン酸化されていないことから、AML1 キナーゼの活性化には何らかのリン酸化カスケードが存在することが予想される。このリン酸化カスケードを明らかにする。これまでに M1 細胞を IL-6 で処理したときに AML1 のリン酸化が誘導されることを見いだしているので、まず IL-6 刺激により活性化されるカスケードを調べる。また、AML1 のリン酸化による AML1 複合体の構成やアセチル化酵素活性の変化等を検討する。

活性型 AML1 複合体の構成因子の多くは白血病において変異がみられることから、AML1K/HIPK 遺伝子の変異が見られる期待される。そこで、ヒト急性白血病及び骨髄

異形成症候群患者における変異を解析する。

#### 4. 研究成果

AML1 複合体を精製し、AML1 複合体には CBF  $\beta$  の他にヒストンアセチル化酵素 p300/CBP や MOZ、前骨髄性白血病タンパク質 PML-I、リン酸化酵素 HIPK2 が含まれることを見いだした。PML は急性骨髄性白血病で見られる t(15;17) 転座に関わる核内因子である。PML には多くのアイソフォームが知られているが、主要なアイソフォームである PML I-VI の中で PML I のみが AML1 と結合した。AML1 及び PML I の様々な欠失変異体を用いた解析から、両者の結合には AML1 の C 末端に近いアミノ酸 363-402 の領域と PML I の C 末端領域 (アミノ酸 593-851) が必要であることが示された。AML1 結合部位を持つレポーター遺伝子を用いた解析から PML I は AML1 に依存した転写を促進し、特に AML1 のコアクチベーターである p300 と共にトランスフェクションしたときにその効果は顕著であった。この結果から PML I は AML1 と p300 との協調作用を促進することが示唆された。PML は nuclear body と呼ばれる核内の斑点状の領域に局在することが知られているが、PML I は AML1 と p300 をこの nuclear body に共局在させることが明らかとなった。PML I の分化への影響を調べるため PML I をレトロウイルスベクターを用いて L-G 細胞に導入し、その細胞増殖能及び分化能の変化を調べたところ、PML I は AML1 と同様に L-G 細胞の G-CSF 存在下での増殖を抑制し好中球への分化を促進した。この活性には PML I の SUMO-1 化が必要であった。これらの結果から、PML I は AML1 とその転写共役因子である p300/CBP を nuclear body に集積させることにより複合体形成を促進し、AML1 を介した転写を活性化して分化を誘導すると考えられる。

AML1 のリン酸化修飾が AML1 複合体の制御に重要であることが示された。この AML1 のリン酸化部位はセリン 249 及び 276 であり、AML1 複合体に含まれる HIPK2 がこれらをリン酸化することを明らかにした。HIPK2 は AML1 のリン酸化に加えて AML1 存在下で MOZ 及び p300 のリン酸化も促進し、AML1 による転写を活性化した。p300 のリン酸化はそのヒストンアセチル化活性を増強し、Gal4-p300 キメラ転写因子による転写を活性化した。MOZ のリン酸化は AML1 との結合を増強させ AML1 複合体を安定化した。HIPK1/2 二重欠損マウスは、AGM 造血及び血管形成に異常が見られ、p300 や CBP 欠損マウスと類似の表現型を示すことから、HIPK1/2 によるリン酸化が p300/CBP の造血及び血管形成における機能に重要であることが示唆された。

PML は、急性前骨髄球性白血病の 90% 以上に見られる t(15;17) 染色体転座により RARa

と融合して PML-RARa キメラタンパク質を発現する。PML が関与する急性前骨髄球性白血病が顆粒球分化の異常を示すことに加え、PML ノックアウトマウスでも顆粒球分化異常が観察されることから、顆粒球分化における PML の機能の重要性が示唆されているが、PML の分子機構についてはこれまで不明な点が多かった。我々は、PML が顆粒球への終末分化に不可欠な転写因子である PU.1 及び C/EBP $\epsilon$  と結合してこれらの転写コアクチベーターとして機能することにより顆粒球分化を制御していることを明らかにした。顆粒球への終末分化に関与する転写因子の発現を調べたところ、PML 欠損マウスの骨髄細胞では C/EBP $\epsilon$  遺伝子の発現が低下していた。転写制御領域の解析から、C/EBP $\epsilon$  の発現は転写因子 PU.1 により直接誘導され、PML は PU.1 と結合することにより C/EBP $\epsilon$  の転写を活性化して顆粒球分化を促進することを明らかにした。対照的に PML-RARa は PU.1 による転写を抑制した。さらに、PML は C/EBP $\epsilon$  とも結合し、C/EBP $\epsilon$  による転写と顆粒球分化を促進した。一方、顆粒球系骨髄細胞株に発現する PML は高度にリン酸化修飾を受けていて、非リン酸化型 PML 変異体は PU.1 や C/EBP $\epsilon$  による転写の活性化および顆粒球分化を促進できないことから、PML によるこれらの転写活性化はリン酸化により制御されていることが示された。以上の結果により、PML は PU.1 と C/EBP $\epsilon$  による転写をリン酸化依存的に活性化することで、顆粒球分化を制御し、急性前骨髄球性白血病ではこれらの機能が阻害されることにより顆粒球の分化異常が見られると考えられる。

PML は、核内の PML body/Nuclear body (NB) と呼ばれる斑点状の領域に局在し、様々な転写因子や転写コアクチベーターと複合体を形成して転写を制御するが、その制御機構については不明な点が多い。我々は、PML 複合体を精製し、PML がユビキチンリガーゼ SCF 複合体の構成因子 Fbx3 と結合し、SCFFbx3 によるユビキチン-プロテアソーム経路を介する転写コアクチベーターの分解を阻害することを明らかにした。この結果より、PML は NB で転写因子複合体の形成の足場となるだけでなく、転写因子複合体に含まれる構成因子の安定化を誘導することで、AML1 や PU.1 などを介した転写を活性化し、顆粒球分化を誘導することが示唆された。一方、PML-RARa は野生型 PML の機能を抑制し、NB を拡散させることが知られているが、PML-RARa は HIPK2 を著しく不安定化させ、PU.1 や AML1 を介した転写を抑制した。また、急性骨髄性白血病ではしばしば PML と結合する AML1、HIPK2、p300、C/EBP $\alpha$  の変異が見られ、白血病発症にこれらの転写因子複合体の機能阻害が関与することが示唆される。

白血病の発症メカニズムを解析するため、マウス骨髄から単離した造血幹細胞に急性骨髄性白血病で見られる融合遺伝子 MOZ-TIF2 をレトロウイルスベクターにより導入し、これを放射線照射した野生型マウスに骨髄移植することにより白血病が発症する白血病モデル実験系を確立した。この白血病マウスの骨髄細胞からセルソーターを用いて細胞集団を分画して、野生型マウスに再移植することにより白血病誘導活性を調べたところ、M-CSF 受容体の発現が高い細胞に強い白血病誘導活性が見られ、発現が低い細胞にはその活性が殆どないことが示された。M-CSFR 遺伝子プロモーターに Fas 遺伝子を連結した融合遺伝子導入したトランスジェニックマウスを用いて、M-CSFR を高発現する細胞にアポトーシスを誘導すると白血病細胞が消失し、白血病発症が抑制された。これらの結果は、白血病幹細胞は M-CSFR 高発現細胞に含まれ、これらの細胞を除去することにより白血病が治癒出来ることを示している。免疫沈降実験およびレポーターアッセイにより MOZ 融合遺伝子産物が転写因子 PU.1 と結合して M-CSFR プロモーターを強く活性化することを見出した。PU.1 及び M-CSFR 遺伝子欠損マウスでは MOZ-TIF2 による白血病発症がみられないことから、PU.1/M-CSFR 経路は MOZ-TIF2 による白血病発症に必須であることが示された。MOZ-TIF2 による白血病モデルマウスシステムに M-CSFR 特異的チロシンキナーゼ阻害剤を投与したところ、白血病の発症が顕著に抑制された。これらの結果から M-CSF 受容体阻害剤が白血病治療に有効であることが強く示唆された。

#### 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] (計 26 件)

- 1) Nguyen LA, Pandolfi PP, Aikawa Y, Tagata Y, Ohki M, Kitabayashi I. Physical and functional link of the leukemia-associated factors AML1 and PML. *Blood*, 105, 292-300, 2005.
- 2) Katsumoto T, Aikawa Y, Iwama A, Ueda S, Ichikawa H, Ochiya T, Kitabayashi I. MOZ is essential for maintenance of hematopoietic stem cells. *Genes & Dev.*, 20, 1321-1330, 2006.
- 3) Aikawa Y, Nguyen LA, Isono K, Takakura N., Tagata Y, Schmitz ML, Koseki H, Kitabayashi I. Roles of HIPK1 and HIPK2 in AML1- and p300-dependent transcription, hematopoiesis and blood vessel formation. *EMBO J.*, 25, 3955-3965, 2006.
- 4) Ono M, Yaguchi H, Ohkura N, Kitabayashi I, Nagamura Y, Nomura T, Miyachi Y, Tsukada T, Sakaguchi, S. Foxp3 controls regulatory T cell function via interacting with AML1/Runx1. *Nature* 446, 685-689, 2007.
- 5) Li XL, Arai Y, Harada H, Shima Y, Yoshida H, Rokudai S, Aikawa Y, Kimura A, Kitabayashi I. Mutations of the HIPK2 gene in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome impair AML1- and p53-mediated transcription. *Oncogene*. 26, 7231-7239, 2007.
- 6) Yoshida H, Ichikawa H, Tagata Y, Katsumoto T, Ohnishi K, Akao Y, Naoe T, Pandolfi PP, Kitabayashi I. PML-RARA inhibits PML IV enhancement of PU.1-induced C/EBP $\epsilon$  induced-expression in myeloid differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 27, 5819-5834, 2007.
- 7) Tagata Y., Yoshida H, Nguyen LA, Kato H, Ichikawa H, Tashiro F, Kitabayashi I. Phosphorylation of PML is essential for activation of C/EBP $\epsilon$  and PU.1 to accelerate granulocytic differentiation. *Leukemia*, 22, 273-280. 2008.
- 8) Katsumoto T, Yoshida N, Kitabayashi I, Roles of the histone acetyltransferase MOZ in normal and malignant hematopoiesis. *Cancer Sci.*, 99:1523-7, 2008.
- 9) Shima Y, Shima T, Chiba T, Irimura T, Pandolfi PP, Kitabayashi I. PML activates transcription by protecting HIPK2 and p300 from SCF/Fbx3-mediated degradation. *Mol Cell Biol.*, 28, 7126-7138, 2008.
- 10) Rokudai S, Aikawa Y, Tagata Y, Tsuchida N, Taya Y, Kitabayashi I. MOZ interacts with p53 to induce p21 expression and cell-cycle arrest. *J Biol Chem.* 284, 237-244, 2009.
- 11) Yamagata K, Kitabayashi I. Sirt1 physically interacts with Tip60 and negatively regulates Tip60-mediated acetylation of H2AX. *Biochem Biophys Res Commun*, 390:1355-1360, 2009.
- 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.
- 13) 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.

[学会発表] (計 68 件)

USA-Japan Cooperative Cancer Workshop on Stem Cells in Normal and Malignant Hematopoiesis

Hilton waikoloa Village in Hawaii, USA ,  
March 27-29, 2009

Kitabayashi I.

MOZ leukemic stem cells

FASEB Summer Research Conference on Histone Deacetylases and Reversible Acetylation in Signaling and Disease

Il Ciocco Resort, August 9-14, 2009

Issay Kitabayashi

Roles of histone acetyltransferase MOZ in hematopoiesis and leukemia

Runx Meeting 2009

Oxford University, August 16-19, 2009

Kimiko Shimizu and Issay Kitabayashi

Hemizygosity of *AML1/RUNX1*, a target of p53, prevents T-cell malignancy induced by loss of p53

51th annual meeting of American Society of Hematology

Ernest N. Merial Convention Center New Orleans, December 5-8, 2009

Yukiko Aikawa, Takuo Katsumoto, Daniel G Tenen, and Issay Kitabayashi

PU.1-mediated upregulation of *M-CSFR* is critical for MOZ-leukemia stem cell potential

Runx Meeting 2009

Oxford University, August 16-19, 2009

Yukiko Aikawa, Takuo Katsumoto and Issay Kitabayashi

Roles of histone acetyltransferases MOZ/MORF in hematopoiesis and leukemia

2010 AACR/JCR Joint Conference

Hilton waikoloa Village in Hawaii, USA ,  
Feb 6-10, 2010

Yoko Ogawara, Takuo Katsumoto, Takeshi Uchiumi, Kimitoshi Kohno and Issay Kitabayashi

The role of YB-1, a binding partner of nucleophosmin, in hematopoiesis and nucleophosmin mutant (NPMc)-associated acute myeloid leukemia.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称 : M-CSF 受容体を分子標的とする MLL 白

血病及び MOZ 白血病治療剤、およびその利用  
発明者 : 北林一生

権利者 : 国立がんセンター総長

種類 : 特願

番号 : 2007-321256

出願年月日 : 2007 年 12 月 12 日

国内外の別 : 国内

名称 : (Therapeutic agent for MLL leukemia and MOZ leukemia of which molecular target is M-CSF receptor, and use thereof

発明者 : 北林一生

権利者 : 国立がんセンター総長

種類 : PCT

番号 : JP2008/072609

出願年月日 : 2008 年 12 月 12 日

国内外の別 : 国外

国際公開番号 : WO 2009/075344 A1 / 国際公

開日 : 2009 年 6 月 18 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北林 一生 (KITABAYASHI ISSAY)

国立がんセンター (研究所及び東病院臨床  
開発センター) 分子腫瘍学部・部長

研究者番号 : 20261175

### (2) 研究分担者

清水 喜美子 (SHIMIZU KIMIKO)

国立がんセンター (研究所及び東病院臨床  
開発センター) 分子腫瘍学部・主任研究官

研究者番号 : 00161414

六代 範 (ROKUDAI SUSUMU)

国立がんセンター (研究所及び東病院臨床  
開発センター) 分子腫瘍学部・研究員

研究者番号 : 20392334

吉田 均 (YOSHIDA HITOSHI)

国立がんセンター (研究所及び東病院臨床  
開発センター) 分子腫瘍学部・室長

研究者番号 : 30303548