

平成 22 年 4 月 23 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17016068

研究課題名（和文） 転座型白血病の分子機構と分子標的療法

研究課題名（英文） Molecular mechanism and molecular targeting therapy in translocation-related leukemia.

研究代表者

三谷 絹子 (MITANI KINUKO)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：50251244

研究成果の概要（和文）：多くの白血病は染色体転座によって形成されるキメラ型転写因子を原因として発症する。本研究においては、21q22 転座において形成される RUNX1 キメラ RUNX1/EVI1 の機能を分子生物学的・発生工学的に解析した。RUNX1 キメラはコリプレッサーを介してヒストン脱アセチル化酵素をリクルートすることにより白血病を発症させると考えられるため、RUNX1 転座型白血病におけるヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の有効性についても検討した。

研究成果の概要（英文）：Generation of chimeric transcription factor is one of major molecular mechanisms in leukemogenesis. In this study, we analyzed functions of a RUNX1 chimera, RUNX1/EVI1, with molecular and gene engineering approaches. Considering that RUNX1 chimera causes leukemia through recruiting histone deacetylase via co-repressor, we also evaluated effects of histone deacetylase inhibitors on leukemic growth induced by RUNX1 chimera.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	9,000,000	0	9,000,000
2006 年度	9,300,000	0	9,300,000
2007 年度	9,300,000	0	9,300,000
2008 年度	8,500,000	0	8,500,000
2009 年度	8,500,000	0	8,500,000
総計	44,600,000	0	44,600,000

研究分野：医歯薬学

科研究費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：白血病、染色体転座、転写因子、RUNX1、RUNX1/EVI1、ノックインマウス、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、TEL

1. 研究開始当初の背景

急性白血病においては、染色体相互転座によるキメラ遺伝子の形成が重要な発症機構のひとつであると考えられている。高頻度に観察される転座としては 21q22 転座及び 12p13 転座があり、それぞれの標的遺伝子は

RUNX1 遺伝子及び *TEL* 遺伝子である。これらの遺伝子は転写因子をコードしている。*RUNX1* 及び *TEL* は造血の発生及び分化制御に重要な役割を担っていることが細胞生物学的・発生工学的に示されて来た。一方、これらの染色体転座の結果形成されるキメラ遺

伝子は、キメラ型転写因子をコードする。RUNX1 キメラの代表は RUNX1/ETO、RUNX1/EVI1 及び TEL/RUNX1 であり、いずれもコリプレッサーを介してヒストン脱アセチル化酵素をリクルートすることにより野生型 RUNX1 の機能を失活させることが中心的分子病態であることが知られている。急性巨核芽球性白血病、慢性骨髄性白血病及び骨髄異形成症候群の急性白血病移行期に観察される t(3;21) の結果形成される RUNX1/EVI1 遺伝子は研究代表者が自らクローニングしたキメラ遺伝子であり、野生型 RUNX1 に対するドミナント・ネガティブ効果、TGF・シグナルの遮断効果、JNK の抑制効果、AP1 活性の刺激効果等の多彩な機能を発揮することを明らかにしてきた。最初のふたつの機能はヒストン脱アセチル化酵素のリクルートを介するものである。

2. 研究の目的

本研究は、野生型 TEL の正常造血制御に果たす役割を明らかにするとともに、RUNX1/EVI1 の機能解析を推進し、RUNX1 キメラ型白血病におけるヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の有効性について基礎的な検討を行なうことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) TEL の細胞生物学的機能の解析

TEL の発現ベクターをマウス骨髄細胞 32D に遺伝子導入し、サイトカインの存在下で分化能・増殖能への影響を検討した。また、PI(propidium iodide)/Annexin V の二重染色及びミトコンドリアの膜電位測定 (JC-1 染色) により、アポトーシスの誘導の有無を評価した。さらに、アポトーシス誘導の分子基盤を明らかにするために、p53 蛋白の発現をウェスタン解析、ゲルシフト・アッセイ及びレポーター・アッセイにより検討した。さらに、p53 の標的遺伝子 (*p21*, *Bax*, *Puma*, *Bid*, *Bak*) の発現を real-time PCR 法で解析した。最後に、TEL のアポトーシス誘導効果が p53 を介するものであるかどうかを、p53 抑制剤 pifithrin-1 の添加及び *Bcl-2* の共発現により検討した。

(2) TEL の発生工学的機能の解析

赤芽球特異的 *GATA1* プロモーター下に TEL を発現するトランスジェニックマウス及び ES 細胞を作製した。トランスジェニックマウスでは、末梢血の血算、骨髄細胞の赤芽球/巨核球への分化能、分化関連遺伝子の発現を解析した。ES 細胞は LIF 非存在下で EB (embryoid body) に分化させ、造血コロニー・アッセイを施行した。

(3) RUNX1/EVI1 の標的分子の検討

RUNX1/EVI1 の骨髄系細胞の分化に及ぼす

効果を検討する目的で、発現ベクターをマウス LG-3 細胞に導入した。G-CSF 存在下での分化を形態学的に評価するとともに、ペルオキシダーゼ染色により定量的にも評価した。C/EBP β は標的遺伝子の転写を活性化することにより顆粒球分化を促進するが、自らの遺伝子プロモーターも活性化することが知られている。そこで、RUNX1/EVI1 と C/EBP β の会合の有無を免疫沈降法で評価するとともに、*CEBPA* プロモーターを用いたレポーター・アッセイ及びゲルシフト・アッセイを用いて、RUNX1/EVI1 が C/EBP β の転写活性化能及び DNA 結合能に及ぼす影響を検討した。RUNX1/EVI1 の骨髄球に対する分化抑制効果が C/EBP β の抑制を介するものであるかどうかを、RUNX1/EVI1 発現細胞に C/EBP β を共発現させることで検討した。

(4) RUNX1/EVI1 の発生工学的機能の解析

RUNX1/EVI1 のノックインヘテロマウスは中枢神経系への出血と胎仔肝造血の廃絶により胎生致死となる。RUNX1/EVI1 ノックインキメラマウスの白血病発症の有無を観察するとともに、発症した白血病を組織学的・電子顕微鏡的に解析した。

(5) RUNX1 キメラ型白血病におけるヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の有効性の検討

RUNX1 キメラ型ヒト白血病細胞株 Kasumi-1 及び SKNO1 (RUNX1/ETO)、SKH1 (RUNX1/EVI1)、Reh (TEL/RUNX1) 及び K562 細胞 (BCR/ABL) の培養上清中にヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (トリコスタチン A、バルプロ酸) を添加し、PI 染色を用いて増殖及び生存に対する効果を検討した。また、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤添加時の細胞周期制御因子の遺伝子発現及びアポトーシス誘導酵素カススペースの活性化状態を定量 PCR 法及びウェスタン解析にて検討した。さらに、外因系アポトーシスシグナルを伝える TRAIL 受容体 DR5 の発現の変化を FACS で解析した。

4. 研究成果

(1) TEL の細胞生物学的機能の解析

TEL 発現 32D 細胞は IL-3 存在下では増殖速度がやや低下したが、G-CSF の存在下では急速に死滅した。この際に sub-G1 分画及び PI(-)/Annexin V(+) 分画が増加しており、ミトコンドリアの膜電位が低下していたことから、内因性のアポトーシスが誘導されていることが明らかになった。興味深いことに、TEL 発現細胞では p53 蛋白の発現レベルが高く、p53-DNA 複合体もより強く形成されており、p53 の転写活性化能が亢進していた。p53 の発現を負に制御する MDM2 の発現には変化がなかった。p53 の標的遺伝子の発現を検討した所、G-CSF の存在下で *Puma* の発現が経時

的に増加していくことが証明された。TEL のアポトーシスの誘導効果は pifithrin- α の添加により一時的に抑制されることから、p53 の発現亢進を介するものである可能性が示唆された。Bcl-2 を共発現させた場合には、TEL によるアポトーシス誘導効果が完全に抑制されたことから、少なくとも TEL のアポトーシス誘導効果はミトコンドリアを介する内因性経路の活性化によるものであることが明らかになった。

TEL は線維芽細胞において細胞周期の回転を止めアポトーシスを誘導することから、がん抑制因子として機能すると考えられていた。今回、TEL は造血細胞においてもがん抑制因子としての機能があること、しかも p53 の上位の制御因子であることが明らかにされた。

(2) TEL の発生工学的機能の解析

GATA1-TEL トランスジェニックマウスでは統計学的有意差をもって末梢血のヘモグロビン値の増加が観察された。骨髓細胞を EPO の存在下で培養すると CD71^{high}/TER119⁺ 分画が、TPO 存在下で培養すると c-kit⁺/CD41⁺ 分画が、GATA1-TEL トランスジェニックマウスでそれぞれより高率に増加した。赤芽球系細胞は骨髓内で、CD71⁺/TER119⁻ 細胞、CD71^{high}/TER119⁻ 細胞、CD71⁺/TER119⁺ 細胞の順に分化を遂げる。内因性の GATA1 は CD71^{high}/TER119⁺ 分画に最も強く発現していたが、これに伴いトランスジェニックマウスでは野生型同胞マウスに比して同分画での外来性+内因性 TEL の発現が亢進していた。さらに、GATA1-TEL トランスジェニックマウスの CD71^{high}/TER119⁺ 分画では、ALAS-E と α -major globin mRNA の発現レベルがより高かった。このことは、TEL がヘモグロビン合成遺伝子の転写を活性化させることを示唆している。一方、day 7 EB を用いた造血コロニー・アッセイでは、GATA1-TEL トランスジェニック細胞はより多くの BFU-E を産生した。CFU-GEMM の数には差がなかった。さらに、day 6 EB より c-kit⁺/CD71⁺ 細胞をソートして EPO 存在下に OP9 細胞上で培養した所、GATA1-TEL トランスジェニック細胞からはより高率に CD71^{high}/TER119⁺ 細胞への分化が観察された。以上の結果より、TEL には赤芽球系前駆細胞を増幅し、ヘモグロビン蓄積を促進する機能があると考えられた。

(3) RUNX1/EVI1 の標的分子の検討

RUNX1/EVI1 をマウス LG-3 細胞に遺伝子導入した所、G-CSF 存在下での好中球への終末分化が阻害された。COS7 細胞に過剰発現させた RUNX1/EVI1 と C/EBP β の会合が免疫沈降法で証明されたことから、両者は機能的に相互作用する可能性が示唆された。レポーター・

アッセイでは、RUNX1/EVI1 は C/EBP β の転写活性化能を抑制したが、EVI1 部分の CtBP 結合部位の変異体はその抑制能を失っていた。従って、RUNX1/EVI1 はヒストン脱アセチル化酵素のリクルートを介して C/EBP β の転写活性化能を抑制すると考えられた。さらに、ゲルシフト・アッセイにより、RUNX1/EVI1 は C/EBP β の DNA 結合能を抑制することも明らかになった。最後に、RUNX1/EVI1 発現 LG-3 細胞に C/EBP β を過剰発現させた所、分化能の回復が観察された。RUNX1/EVI1 は C/EBP β を標的として分化抑制効果を発揮し、造血幹細胞腫瘍を白血病化させる可能性が示唆された。

(4) RUNX1/EVI1 の発生工学的機能の解析

RUNX1/EVI1 キメラマウスに生後 5 ヶ月で急性巨核芽球性白血病の発症が観察された。白血病細胞は肝脾に浸潤しており、電子顕微鏡的血小板ペルオキシダーゼが陽性であった。このことは、RUNX1/EVI1 が腫瘍の表現型を決定するとともに、ワン・ヒットで白血病を発症させる可能性を示唆している。

(5) RUNX1 キメラ型白血病におけるヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の有効性の検討

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は Kasumi-1、SKN01、SKH1、Reh 細胞の増殖を抑制しアポトーシスを誘導したが、K562 細胞には同様の効果は示さなかった。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は RUNX1 キメラ型白血病に特異的な効果を発揮することが期待された。また、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤添加時にはこれらの白血病細胞株では細胞周期抑制因子 CDK2 mRNA の発現が増加し、内因系アポトーシス誘導酵素カスベース 9、外因系アポトーシス誘導酵素カスベース 8 及び共通アポトーシス誘導酵素カスベース 3 が活性化していた。さらに、細胞表面の DR5 の発現も亢進していた。以上のことから、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は遺伝子発現の制御を介して細胞周期を停止させ、内因系及び外因系の両アポトーシスシグナルを活性化することにより、RUNX1 キメラ型白血病細胞に細胞死を誘導すると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Maki K, Porcher C, Shimizu R, Yamamoto M, Mitani K: Leukaemia-related transcription factor TEL/ETV6 expands erythroid precursors and stimulates haemoglobin synthesis. *Cancer Sci* 100: 689-697, 2009. (査読有り)
2. Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Ohyashiki

- K, Yamagata T, Mitani K.: Enhanced expression of the EVI1 gene in NUP98/HOXA-expressing leukemia cells. *Int J Hematol* 89: 253-256, 2009. (査読有り)
3. Sasaki K, Yamagata T, Mitani K.: Histone deacetylase inhibitors trichostatin A and valproic acid circumvent apoptosis in human leukemic cells expressing the RUNX1 chimera. *Cancer Sci* 99: 414-422, 2008. (査読有り)
 4. Tokita K, Maki K, Mitani K.: RUNX1/EVI1 that blocks myeloid differentiation inhibits CCAAT-enhancer binding protein · function. *Cancer Sci* 98: 1752-1757, 2007. (査読有り)
 5. Yamagata T, Nakamura Y, Mitani K.: Low expression of ETV6/TEL found in patients with myelodysplastic syndrome. *Int J Hematol* 86: 282-285, 2007. (査読有り)
 6. Tokita K, Maki K, Tadokoro J, Nakamura Y, Arai Y, Sasaki K, Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Mitani K.: Chronic idiopathic myelofibrosis expressing a novel type of *TEL-PDGFRB* chimaera responded to imatinib mesylate therapy. *Leukemia* 21: 190-192, 2007. (査読有り)
 7. Nakamura Y, Maki K, Sasaki K, Kitabayashi I, Mitani K.: A novel TEL/ETV6 binding protein KAP1 does not contribute to its transcription-repressive activity. *Int J Hematol* 84: 377-380, 2006. (査読有り)
 8. Yamagata T, Maki K, Waga K, Mitani K.: TEL/ETV6 induces apoptosis in 32D cells through p53-dependent pathways. *Biochem Biophys Res Comm* 347: 517-526, 2006. (査読有り)
 9. Maki K, Yamagata T, Yamazaki I, Oda H, Mitani K.: Development of megakaryo-blastic leukemia in Runx1-Evil knock-in chimaeric mouse. *Leukemia* 20: 1458-1460, 2006. (査読有り)
 10. Nakamura F, Nakamura Y, Maki K, Sato Y, Mitani K.: Cloning and characterization of a novel chimeric gene *TEL/PTPRR* in acute myelogenous leukemia with inv(12)(p13q13). *Cancer Res* 65: 6612-6621, 2005. (査読有り)
 11. Maki K, Yamagata T, Asai T, Yamazaki I, Oda H, Hirai H, Mitani K.: Dysplastic definitive hematopoiesis in *AML1/Evi-1* knock-in embryos. *Blood* 106: 2147-2155, 2005. (査読有り)
 12. Takahashi W, Sasaki K, Komatsu N, Mitani K.: TEL/ETV6 accelerates erythroid differentiation and inhibits megakaryocytic maturation in a human leukemia cell line UT-7/GM. *Cancer Sci* 96: 340-348, 2005. (査読有り)
- [学会発表] (計 17 件)
1. Yamagata T: High expression of microRNA-9 is a hallmark for poor prognosis in acute leukemia patients. 第 71 回日本血液学会総会 2009. 10. 24 (京都)
 2. 佐々木光: microRNA による TEL の発現制御機構の解析および MDS 発症への関与 第 67 回日本癌学会総会 2008. 10. 29 (名古屋)
 3. 山形哲也: 白血病関連転写因子の microRNA による制御 第 67 回日本癌学会総会 2008. 10. 29 (名古屋)
 4. Mitani K: Roles of leukemia-related transcription factor TEL in erythropoiesis. 第 8 回国際ポルフィリン・ヘムシンポジウム 2008. 10. 16 (島根)
 5. 佐々木 光: RUNX1 キメラ型白血病に対するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の作用機序の解析 第 69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会 2007. 10. 12 (横浜)
 6. 石前峰斉: 7;11 転座における HOXA 遺伝子とその協調因子遺伝子の発現 第 69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会 2007. 10. 11 (横浜)
 7. 江口真理子: 白血病関連転写因子 TEL は赤芽球系前駆細胞を増加させる 第 69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会 2007. 10. 11 (横浜)
 8. 山形哲也: MDS 症例における p53 関連経路の解析 第 69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会 2007. 10. 11 (横浜)
 9. 牧 和宏: RUNX1 関連白血病発症の分子機構と新規治療法の開発 第 66 回日本癌学会総会 2007. 10. 5 (横浜)
 10. 石前峰斉: 白血病関連転写因子 TEL は赤芽球系前駆細胞を増加させる 第 66 回日本癌学会総会 2007. 10. 4 (横浜)
 11. Mitani K: Normal and abnormal hematopoiesis by leukemia-related transcription factor TEL. USA-Japan Cooperative Cancer Research Program 2007. 3. 21 (Kauai)
 12. 牧 和宏: Runx1-Evil ノックインキメラマウスの急性巨核芽球性白血病の発症 第 68 回日本血液学会総会・第 48 回日本

臨床血液学会総会 2006. 10. 7 (福岡)

13. 佐々木光：ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤のAML1キメラ型白血病に対する有用性の検討 第 67 回血液学会総会・第 47 回日本臨床血液学会総会 2005. 9. 18 (横浜)
14. Mitani K: Dysplastic definitive hematopoiesis in AML1/Evi-1 knock-in mice. The 8th International symposium on myelodysplastic syndrome. 2005. 5. 13 (Nagasaki)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三谷 絹子 (MITANI KINUKO)
獨協医科大学・医学部・教授
研究者番号：50251244

(2) 研究分担者

佐々木 光 (SASAKI KO)
獨協医科大学・医学部・講師
研究者番号：60282638
牧 和宏 (MAKI KAZUHIRO)
獨協医科大学・医学部・講師
研究者番号：50337391
山形 哲也 (TETSUYA YAMAGATA)
獨協医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30424047
江口 真理子 (MARIKO EGUCHI)
獨協医科大学・医学部・講師
研究者番号：40420781
江口 峰斉 (MINENORI EGUCHI)
獨協医科大学・医学部・講師
研究者番号：50420782

(3) 連携研究者

なし