

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2006～2009
 課題番号：18591086
 研究課題名 (和文)：
 Runx1 の標的遺伝子の網羅的スクリーニングおよび発生工学的機能解析

研究課題名 (英文)：
 Analysis of RUNX1-target genes and their functions
 研究代表者：山形 哲也 (YAMAGATA TETSUYA)
 獨協医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：30424047

研究成果の概要 (和文)：

われわれは RUNX1 のたんぱく翻訳を制御している microRNA の一つである mir-9 が約 15% の急性骨髄性白血病 (AML) 患者の骨髄細胞に発現していることを見出した。Mir-9 を発現している AML 患者は発現していない AML 患者に比較して寛解期が短く、また全生存期間も短かった。Mir-9 は RUNX1 のたんぱく翻訳を抑制することにより正常な RUNX1 の機能を阻害し、より悪性の高い AML の発症に関与している可能性が指摘された。

研究成果の概要 (英文)：

We have found that microRNA-9 (mir-9), one of miRNAs that regulates RUNX1 protein translation, is over-expressed in the bone marrow cells of nearly 15% of acute myelogenous leukemia (AML) patients. The mir-9-expressing AML patients show short remission-free survival and short overall survival than the non-expressing AML patients. Thus, the over-expression of mir-9 may cause aggressive form of AML through suppressing the translation of RUNX1 and hence its function, which leads to the aberrant expression of its target genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,700,000	660,000	4,360,000

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：血液内科学

1. 研究開始当初の背景

Runx1 は成体型造血において必須の遺伝子である。しかし転写因子としての Runx1 がどのような下流遺伝子の発現を制御しているのかについてはほとんど明らかにされていない。また Runx1 を制御する microRNA が白血

病発症にどのように関与しているのかについても研究があまり進んでいない。

2. 研究の目的

本研究は Runx1 がどのような遺伝子の発現を通して造血プログラムを制御しているのか

を明らかにし、その破綻 (Runx1 遺伝子を標的とする染色体転座や点突然変異による Haploinsufficiency) による白血病の発症機構を解明することを目的として研究を行う。特に近年注目されている microRNA の役割を中心に解析を行う。

3. 研究の方法

(1) AML 患者の骨髓検体を用い、microRNA の異常発現の有無について大規模にスクリーニングを行う、(2) 特定の microRNA についてその発現と疾患予後との関係について統計学的な解析を行う、(3) 特定の microRNA の発現が病気の予後と関係していると思われる場合はその microRNA を高発現させた動物モデル (トランスジェニックマウス) を作製する、(4) 特定の microRNA の発現が造血器細胞においてどのような遺伝子発現の変異をもたらすかを、マイクロアレイ法を用いて網羅的に解析する。

4. 研究成果

(1) 白血病患者検体を用いた microRNA の異常発現の有無の検索
急性骨髄性白血病 (AML) 患者の初発時骨髓 87 検体と正常人骨髓 23 検体中における miR-9 の発現を調べた。正常人骨髓では miR-9 はほとんど発現が見られなかったが、AML 骨髓では約 15% の症例で miR-9 の高発現が見られた。そこで、正常人骨髓で見られるレベルをカットオフ値として、miR-9 陽性・陰性の 2 群に分けたところ、16 例 (18%) が陽性、71 例 (82%) が陰性となった。これら 2 群についてその臨床的特徴を解析したところ、AML 予後不良を示すパラメーターに有意な差は見られなかった。また寛解導入率にも差を認めなかった。しかし全生存率を解析したところ、平均生存日数は miR-9 陰性群が 2091 日に対して、miR-9 陽性群では 1052 日であった (Log-Rank 検定 P 値 = 0.0472)。よって miR-9 陽性患者は明らかに生存率が悪いことが判明した。また完全寛解後の再発率を解析したところ、平均完全寛解持続日数は miR-9 陰性群が 2017 日なのに対して、miR-9 陽性群では 769 日であった (Log-Rank 検定 P 値 = 0.0091)。よって miR-9 陽性群では再発が早いことが判明した。これらのことから miR-9 の高発現は AML の予後不良をもたらす因子であることが判明した。

(2) 造血幹細胞分画に microRNA を発現させたトランスジェニック・マウスの作製
患者検体において異常発現が確認された miR-9 を、トランスジェニックの系を用いてマウスの血液細胞に高発現させ、実際にマウスが白血病を発症するかどうかを検証した。miR-9 を造血幹細胞に高発現させるために、

Tie2 プロモーターの下流に miR-9 を発現させたトランスジェニック・マウスを作製した。最も未熟な造血細胞分画とされる Lineage(-)cKit(+)*Sca1*(+)分画 (KSL 分画) に目的とする miR-9 を発現させることに成功した。

(3) miR-9 の高発現によって発現に影響を受ける遺伝子の検索
造血幹細胞における miR-9 の高発現による遺伝子発現の変化をマイクロアレイを用いて解析した。KSL 分画細胞で上昇している遺伝子としては cadherin-2, *Cadm2* などの細胞接着因子、IL-1b receptor) などの受容体がある。発現が低下している遺伝子としては *Srpk3* や *Wnk3* などの未知の protein kinase、などが同定された。

以上の研究より、miR-9 の過剰発現は RUNX1 遺伝子の染色体転座や点突然変異につぐ、新たな RUNX1 の機能抑制のメカニズムである可能性が明らかとなった。

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 9 件)

1. Arai H, Iso H, Arai Y, Tadokoro J, Nakamura Y, Yamagata T, Mitani K. Mediastinal large B-cell lymphoma associated with systemic sclerosis. *Rinsho Ketsueki*. 50:97-101, 2009.

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.

3. Maki K, Yamagata T, Mitani K. Role of the RUNX1-EVI1 fusion gene in leukemogenesis. *Cancer Sci*. 99: 1878- 1883, 2008.

4. 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.

5. Yamagata T, Nakamura Y, Mitani K. Low-level expression of ETV6/TEL in patients with Myelodysplastic syndrome. *Int J Hematol.* 86:282-285, 2007.
6. Arai Y, Arai H, Aoyagi A, Yamagata T, Mitani K, Kubota K, Kawamata H, Imai Y. A solid tumor of donor cell-origin after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Am J Transplant.* 6:3042-3043, 2006.
7. Maki K, Yamagata T, Yamazaki I, Oda H, Mitani K. Development of megakaryoblastic leukaemia in Runx1-Evil knock-in chimaeric mouse. *Leukemia.* 20:1458-1460, 2006.
8. Yamagata T, Maki K, Waga K, Mitani K. TEL/ETV6 induces apoptosis in 32D cells through p53-dependent pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 347:517-526, 2006.
9. Nakamura Y, Yamagata T, Maki K, Sasaki K, Kitabayashi I, Mitani K. TEL/ETV6 binds to corepressor KAP1 via the HLH domain. *Int J Hematol.* 84:377-380, 2006.

[学会発表] (計 17 件)

1. microRNA-9 の高発現は急性白血病において予後不良を示す。
山形哲也, 佐々木光, 牧和宏, 三谷絹子. 第 71 回日本血液総会 2009. 10. 10~12 (京都)
2. microRNA による TEL の発現制御機構の解析および MDS 発症への関与の検討。
佐々木光, 山形哲也, 牧和宏, 三谷絹子. 第 67 回日本癌学会学術総会 2008. 10. 28~30 (名古屋)
3. 白血病関連転写因子の microRNA による制御。
山形哲也, 三谷絹子. 第 67 回日本癌学会学術総会 2008. 10. 28~30 (名古屋)
4. ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を用いた Runx1/Evil の造腫瘍活性の抑制。
牧和宏, 佐々木光, 山形哲也, 三谷絹子. 第 70 回日本血液学会 2008. 10. 23~25 (京都)
5. 再発・難治性 CD33 陽性急性骨髄性白血病に対する CAG-GO 療法の安全性と有効性。
仲村祐子, 新井幸宏, 高橋渉, 鵜田勝哉, 新井ほのか, 半田智幸, 田所治朗, 磯桐子, 鶴

- 見茂治, 牧和宏, 佐々木光, 山形哲也, 三谷絹子. 第 70 回日本血液学会 2008. 10. 23~25 (京都)
6. microRNA による TEL の発現制御機構の解析および MDS 発症への関与の検討。
佐々木光, 山形哲也, 牧和宏, 三谷絹子. 第 70 回日本血液学会 2008. 10. 23~25 (京都)
7. MDS 症例における microRNA の発現解析。
山形哲也, 三谷絹子. 第 70 回日本血液学会 2008. 10. 23~25 (京都)
8. アセチル化による TEL の機能制御。
牧和宏, 山形哲也, 北林一生, 三谷絹子. 第 69 回日本血液学会 2007. 10. 11~13 (横浜)
9. inv(16) あるいは t(8;21) 型急性骨髄性白血病症例の KIT 変異の解析。
高橋渉, 山形哲也, 田所治朗, 新井幸宏, 三谷絹子. 第 69 回日本血液学会 2007. 10. 11~13 (横浜)
10. Runx1 キメラ型白血病細胞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。
佐々木光, 山形哲也, 三谷絹子. 第 69 回日本血液学会 2007. 10. 11~13 (横浜)
11. 中枢神経原発悪性リンパ腫治療の検討。
田所治朗, 新井幸宏, 鵜田勝哉, 高橋渉, 磯桐子, 新井ほのか, 半田智幸, 仲村祐子, 石前峰斉, 江口真理子, 佐々木光, 牧和宏, 山形哲也, 三谷絹子. 第 69 回日本血液学会 2007. 10. 11~13 (横浜)
12. MDS 症例における p53 関連経路の解析。
山形哲也, 中村由香, 三谷絹子. 第 69 回日本血液学会 2007. 10. 11~13 (横浜)
13. 多発性骨髄腫におけるビフォスフォネート投与と骨代謝マーカー。
半田智幸, 高橋渉, 新井ほのか, 田所治朗, 仲村祐子, 石前峰斉, 江口真理子, 佐々木光, 牧和宏, 新井幸宏, 山形哲也, 三谷絹子. 第 68 回日本血液学会 2006. 10. 6~8 (福岡)
14. AML1/Evil による C/EBPa の抑制効果。
鵜田勝哉, 牧和宏, 佐々木光, 山形哲也, 三谷絹子. 第 68 回日本血液学会 2006. 10. 6~8 (福岡)
15. 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。
牧和宏, 山形哲也, 山崎家春, 小田秀明, 三谷絹子. 第 68 回日本血液学会 2006. 10. 6~8 (福岡)
16. 新規 TEL 結合蛋白 KAP-1 の同定と機能解析。
中村由香, 山形哲也, 牧和宏, 佐々木光, 北林一生, 三谷絹子. 第 68 回日本血液学会 2006. 10. 6~8 (福岡)
17. AML1/Evil による C/EBPa の抑制効果。
鵜田勝哉, 牧和宏, 佐々木光, 山形哲也, 三谷絹子. 第 65 回日本癌学会 2006. 9. 28~30 (横浜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者：山形 哲也 (YAMAGATA TETSUYA)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30424047

(2) 研究分担者：牧 和宏 (MAKI KAZUHIRO)

獨協医科大学・医学部・講師

研究者番号：50337391

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

研究分担者：三谷 絹子 (MITANI KINUKO)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：50251244

研究分担者：江口 真理子 (MARIKO EGUCHI)

獨協医科大学・医学部・講師

研究者番号：40420781

研究分担者：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

()

研究者番号：