

平成22年 3月31日現在

研究種目：基盤研究 B

研究期間：2007～2009

課題番号：19390268

研究課題名（和文） 転写制御因子を介した造血幹細胞と白血病幹細胞の制御機構の解析

研究課題名（英文） Study for regulatory mechanism of normal and leukemic stem cells through transcription factors

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）：ヒストンアセチル化酵素をコードする MOZ 遺伝子及びそのファミリー遺伝子である MORF 遺伝子は、ヒト急性骨髄性白血病でみられる染色体転座により分断され、融合遺伝子を生じる。MOZ 遺伝子欠損マウス及び MORF 遺伝子欠損マウスを作成し、造血におけるこれらの役割を調べ、MOZ が造血幹細胞の自己複製に必須であること、転写因子 PU.1 や AML1 と結合して M-CSFR 遺伝子や MPO 遺伝子などの標的遺伝子の転写を促進することを見出した。また、MORF も MOZ と同様に PU.1 や AML1 の転写共役因子として標的遺伝子の発現を制御し、造血幹細胞の自己複製において重要な役割を担っていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：MOZ (MONocytic leukemia Zinc finger protein) and MORF (MOZ Related Factor), Myst-type histone acetyltransferases, are involved in chromosome translocations associated with FAB-M4/5 subtypes of acute myeloid leukemia. We have reported that MOZ is essential for hematopoietic cell development and self-renewal of hematopoietic stem cells. To elucidate the roles of MORF in normal and malignant hematopoiesis, we generated Morf-deficient mice. Morf^{-/-} mice were smaller than their wild-type littermates and died within 4 weeks after birth. In Morf^{-/-} fetal liver, Flt3-negative KSL (c-Kit⁺, Sca-1⁺, Lineage⁻) cells containing hematopoietic stem cells are decreased. When fetal liver cells were transplanted into irradiated recipient mice, MORF^{-/-} cells less efficiently reconstituted hematopoiesis than wild-type cells. Additionally, bone marrow cells reconstituted with MORF^{-/-} cells rarely contributed to hematopoiesis in secondary transplants. To reveal interaction between MORF and MOZ, we generated double heterozygous (Moz^{+/-} Morf^{+/-}) mouse. Double heterozygous mouse was also smaller than wild-type littermates and died at least 4 weeks after birth. Numbers of KSL cells, especially Flt3⁻ KSL cells and common myeloid progenitors were decreased in the double heterozygous fetal liver. The double heterozygous fetal liver cells also displayed less activity to reconstitute hematopoiesis than MOZ^{+/-} or MORF^{+/-} cells. These results suggest that MORF as well as MOZ plays important roles in self-renewal of hematopoietic stem cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2008年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2009年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			

年度			
総計	13,700,000	4,110,000	13,700,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：①幹細胞 ②白血病 ③転写制御

1. 研究開始当初の背景

全ての血液細胞は骨髄に存在する造血幹細胞から様々な分化過程をへて生成される。造血幹細胞は多分化能と自己複製能を併せ持つ高い増殖能力を有する細胞である。骨髄移植など造血幹細胞移植は、造血疾患・白血病を含むがん・免疫疾患・代謝疾患などの治療に広く応用され、臨床では欠くことの出来ない非常に重要な技術となっている。しかしながら、造血幹細胞の形成・自己複製・分化の制御機構については未だ不明な点が多く残されている。遺伝子欠損マウスなどを用いた解析から、AML1・PU.1・c-Myb・GATA-2・C/EBPalphaなどの転写因子とこれらの転写コアクチベーターとしてヒストンアセチル化酵素 MOZ や p300、HIPK2、PML などをが造血幹細胞の形成・自己複製・分化に関与することが示されてきた。一方で、これらの因子の多くは急性骨髄性白血病の発症に関与することも明らかにされつつあり、白血病幹細胞の形成・自己複製にも関与することが予想される。

AML1 遺伝子は、造血幹細胞の形成に必須な転写因子をコードし、急性白血病や骨髄異形成症候群 (MDS) で高頻度に変異が見られ、t(8;21)、t(3;21)、t(12;21)、t(16;21) 転座など様々な染色体転座に関与するほか、急性骨髄性白血病 (AML) や骨髄異形成症候群 (MDS) 及び家族性血小板減少症 (FPD) などにおいて突然変異がみられることが報告されている。PU.1 (Spi1) は造血幹細胞の維持及び骨髄球の分化に必須な転写因子である。PU.1 は、フレンドウイルスによって生じる急性赤白血病 (acute erythroleukemia) で過剰発現し、PU.1 の過剰発現マウスは急性赤白血病を発症することが報告されている。また、t(8;21) 転座型 AML では PU.1 の発現は抑制されていて、PU.1 の発現を抑制したマウスでは高頻度に AML が発症することが報告されている。CCAAT/enhancer-binding protein-alpha (C/EBPα) は骨髄性前駆細胞の増殖分化に重要な転写因子である。AML の 8%前後に変異が見られる。AML で高頻度に見られる t(8;21) 転座により生じる AML1-ETO により C/EBPα の発現が抑制されることが報告されている。

2. 研究の目的

造血幹細胞の形成・自己複製・分化の制御機構については未だ不明な点が多く残されている。遺伝子欠損マウスなどを用いた解析から、AML1・PU.1・c-Myb・GATA-2・C/EBPalphaなどの転写因子とこれらの転写コアクチベーターとしてヒストンアセチル化酵素 MOZ や p300、HIPK2、PML などをが造血幹細胞の形成・自己複製・分化に関与することが示されてきた。一方で、これらの因子の多くは急性骨髄性白血病の発症に関与することも明らかにされつつあり、白血病幹細胞の形成・自己複製にも関与することが予想される。本研究では、第1に、これらの因子による遺伝子発現の制御機構を明らかにすることにより、造血幹細胞の自己複製や増殖の分子メカニズムを理解することを目指す。また、AML1 や PU.1 や C/EBP の機能障害や AML1 と複合体を形成する CBFβ、p300/CBP、MOZ、PML が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ことなどから、これらの因子の機能障害が白血病発症と深く関与することが示唆される。本研究では、第2に、造血幹細胞の制御異常と白血病の発症メカニズムの関連性について明らかにする。

3. 研究の方法

MOZ 欠損マウスでは、マイクロアレイを用いた網羅的な発現解析、フローサイトメトリー及び半定量的 RT-PCR 解析の結果から、HoxA9、c-Kit、c-Mpl 遺伝子の発現が顕著に低下していた。HoxA9、c-Mpl 及び c-Kit の欠損マウスでは造血能の障害が報告されていることから、MOZ 欠損マウスでの造血能障害は、これらの遺伝子の発現低下が深く関与していることが示唆された。これらの遺伝子の 5' 上流領域の DNA 配列を調べると c-Kit 遺伝子上流には c-Myb の結合配列が c-Mpl 遺伝子と HoxA9 遺伝子上流には AML1 と PU.1 の結合配列が存在することから、MOZ はこれらの転写因子を介して HoxA9、c-Mpl 及び c-Kit の発現を制御している可能性が予想された。実際、c-Myb 欠損マウス胎仔肝臓での発現を解析すると、c-Kit の発現が著しく低下して

いた。そこで、これらの仮説を証明するため、クロマチン免疫沈降法、それぞれの 5' 上流領域をルシフェラーゼ遺伝子に連結したレポーターを用いた解析により、これらの協調作用について検討する。また、MOZ 欠損マウスと c-Myb 欠損マウス・AML1 欠損マウス又は PU.1 欠損マウスとの 2 重欠損マウスを作製して、それぞれの表現型を比較する。さらに MOZ 欠損マウスに誘導的に活性化できる PU.1-ER や AML1, c-Myb を発現させて、これらの転写因子の作用が MOZ を必要とするかどうか、HoxA9, c-Mpl 及び c-Kit の発現を誘導するかどうかについて検討する。

MOZ のファミリー遺伝子である MORF の欠損マウスを作成し、造血における機能を解析する。また、MOZ と MORF の二重欠損マウスを作成し、その表現型を解析する。MOZ 欠損マウスでは HoxA9, c-Kit, c-Mpl 遺伝子の発現が顕著に低下していた。これらの遺伝子の 5' 上流領域の DNA 配列を調べると c-Kit 遺伝子上流には c-Myb の結合配列が c-Mpl 遺伝子と HoxA9 遺伝子上流には AML1 と PU.1 の結合配列が存在することから、MOZ はこれらの転写因子を介して HoxA9, c-Mpl 及び c-Kit の発現を制御している可能性が予想された。実際、c-Myb 欠損マウス胎仔肝臓での発現を解析すると、c-Kit の発現が著しく低下していた。そこで、これらの仮説を証明するため、クロマチン免疫沈降法、それぞれの 5' 上流領域をルシフェラーゼ遺伝子に連結したレポーターを用いた解析により、これらの協調作用について検討する。

MOZ-TIF2 などの白血病で見られる融合遺伝子による白血病の発症機構について、マウス白血病モデルシステムを用いて解析する。MOZ-TIF2 を発現するレトロウイルスをマウス骨髓性前駆細胞に導入し、これを放射線照射した野生型マウスに骨髓移植することにより急性骨髓性白血病が生じる。これまでに MOZ や MOZ 融合遺伝子産物が PU.1, AML1, c-Myb などの転写因子と結合して転写を制御することを明らかにしてきた。これらの転写因子を介した作用の白血病発症における役割を明らかにするため、これらの遺伝子欠損マウスの骨髓細胞又は胎仔肝臓細胞に MOZ-TIF2 を発現するレトロウイルスを感染させて、移植することにより白血病が発症するかどうかを検討する。M-CSF 受容体の発現制御が白血病幹細胞の自己複製に重要であるかどうかを検討するため、M-CSF 受容体遺伝子欠損マウスの胎仔肝臓細胞に MOZ-TIF2 を発現するレトロウイルスを感染させて野生型マウスに骨髓移植し、白血病が発症するかどうかを検討する。

HIPK1/2 が p300 をリン酸化して、p300 の持つヒストンアセチル化酵素活性を促進することにより標的遺伝子の転写を促進する

ことを見出した。HIPK1 欠損マウス及び HIPK2 欠損マウスを作製したところ、それぞれ単独の欠損マウスは正常であったが、これらの二重欠損マウスを作製したところ、胎生 11.5 日頃に致死であった。胎仔卵黄嚢における造血と P-Sp 領域を OP9 ストロマ細胞上で組織培養することにより生じる造血細胞の発生もいずれにも障害が見られたことから、HIPK1/2 は胎仔型造血及び成体型造血に共に必要であることが示された。HIPK1/2 欠損マウスでは、HIPK1/2 のリン酸化の基質である p300 や AML1 のリン酸化が著しく低下していた。また、HIPK1/2 二重欠損マウスでは血管形成不全も観察され、造血障害を含めこれらの表現型は p300 や CBP の表現型と類似していた。これらの結果から、HIPK1/2 は p300/CBP をリン酸化して活性化していることが示唆されるが、この機能的な関連性を証明するため、HIPK1/2 欠損マウスに p300 や CBP を導入して造血が回復できるかどうかについて検討する。また、これまでに p300 及び HIPK2 が新規 F-box 蛋白質 Fbx3 を含む SCF 複合体によりユビキチン化され、ユビキチン-プロテアソーム経路により分解されることを見出した。転写や細胞分化における p300 及び HIPK2 の機能制御に Fbx3/SCF 複合体がどう関与するかについて検討する。

4. 研究成果

MOZ 欠損マウスを作製し、MOZ ホモ欠損マウスは胎生 15.5 日までに致死で、胎仔肝臓における成体型造血に顕著な異常が見られることを見出した。胎生 14.5 日の MOZ ホモ欠損マウス胎仔肝臓では、造血幹細胞及び造血前駆細胞の広範な減少が見られ、赤血球の最終分化障害、B リンパ球の減少、骨髓性細胞の増加も見られた。造血幹細胞での MOZ の機能を解析するために、MOZ ホモ欠損マウスの胎仔肝臓細胞を放射線照射したマウスに移植したところ、MOZ ホモ欠損マウス由来細胞は、移植後のマウスの末梢血及び胸腺、脾臓、骨髓のどの造血組織にも全く見られなかった。これらの結果から、MOZ は造血幹細胞の形成・維持に必須であることが示された。免疫沈降実験及びレポーター遺伝子を用いた解析から MOZ は PU.1 及び c-Myb と強く結合し、MOZ は PU.1 及び c-Myb による転写活性化を促進することが明らかとなった。PU.1 及び c-Myb は造血幹細胞の維持に重要であることから、MOZ は AML1 に加えて PU.1 及び c-Myb の転写コアクチベーターとして作用して造血幹細胞の形成・維持に関与することが示唆された。マイクロアレイ解析の結果、MOZ ホモ欠損マウスでは TPO 受容体 c-Mpl, SCF 受容体 c-Kit 及び HoxA9 の発現の低下が見られた。c-Mpl 及び c-Kit を介したシグナルは造血幹細胞の維持に必須であることが示され

ていることから、これらの発現低下が MOZ 欠損マウスで見られた造血異常の原因である可能性が示唆された。以上の結果から、MOZ は AML1・PU.1・c-Myb の転写コアクチベーターとして作用して、c-Mpl 及び c-Kit の発現を制御することにより、造血幹細胞の形成・維持に重要な作用をすることが示唆された。

MORF 遺伝子欠損マウスを作製し、造血における役割を調べた。MORF ヘテロ欠損マウスは正常であったが、ホモ欠損マウスは出生後 4 週間までに致死であった。胎仔期の肝臓細胞を調べたところ、MORF 欠損マウスでは造血幹細胞数が低下していた。骨髄造血の再建能を調べたところ、MORF 欠損マウス胎仔肝臓由来の細胞は骨髄再建能が低下していた。MORF 欠損マウスと MOZ 欠損マウスと交配したところ、それぞれ単独の欠損マウスは正常なのに対して、MOZ 遺伝子と MORF 遺伝子の 2 重ヘテロ欠損マウスは出生後 4 週間までに致死であった。また、2 重ヘテロ欠損マウスの胎仔肝臓では骨髄再建能はそれぞれ単独の欠損マウスに比べて、顕著に低下していた。また、MORF も MOZ と同様に PU.1 や AML1 と結合して M-CSFR 遺伝子や MPO 遺伝子などの標的遺伝子の転写を促進することを明らかにした。これらの結果から、MORF は MOZ と同様に PU.1 や AML1 の転写共役因子として標的遺伝子の発現を制御し、造血幹細胞の自己複製において重要な役割を担っていることが示された。

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 17 件)

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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 α expression in myeloid differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 27, 5819-5834, 2007.
- 4) Tagata Y., Yoshida H, Nguyen LA, Kato H, Ichikawa H, Tashiro F, Kitabayashi I. Phosphorylation of PML is essential for activation of C/EBP α and PU.1 to accelerate granulocytic differentiation. *Leukemia*, 22, 273-280. 2008.
- 5) Katsumoto T, Yoshida N, Kitabayashi I, Roles of the histone acetyltransferase MOZ in normal and malignant hematopoiesis. *Cancer Sci.*, 99:1523-7, 2008.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.

10) 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 41 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

山形 和恒 (YAMAGATA KAZUTSUNE)

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: 70311412

勝本 拓夫 (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: 50469970

横山 明彦 (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: 10506710

渡邊 利雄 (WATANABE TOSHIO)

奈良女子大学大学院人間文化研究科・教授

研究者番号: 60201208

