

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2010

課題番号：19591135

研究課題名(和文) 12p13転座型白血病の原因遺伝子TELの発生工学的機能解析

研究課題名(英文) Functional and biological study of leukemia-associated TEL gene

研究代表者

江口 峰斉 (EGUCHI MINENORI)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50420782

研究代表者の専門分野：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：TEL/ETV6、ES細胞、造血細胞分化

### 1. 研究計画の概要

白血病の発症には様々な染色体転座・融合遺伝子が関与し、融合遺伝子による白血病化のメカニズムを理解することはその治療法の開発にも必要である。また染色体転座により形成される異常な融合蛋白は、多くの場合転座を起こした元の野生型蛋白の正常な働きを阻害することが知られており、融合蛋白の機能のみならず、正常蛋白の機能の解明も重要である。TELは造血器腫瘍で高頻度に染色体転座に関わり、様々な融合遺伝子を形成する遺伝子の一つである。またTEL遺伝子の存在する12番染色体短腕の欠失は造血器腫瘍でしばしば認められ、TEL遺伝子の機能喪失が造血細胞の腫瘍化に果たす役割が推測される。これまでの解析によりTELは骨髓造血に必須な転写因子であることが分かっているが、その詳細な細胞生物学的機能は未だ不明である。本研究では野生型TELが造血制御に果たす役割を明らかにするとともに、TELの欠失や変異が正常造血制御に与える影響、および白血病化、腫瘍化への関わりについて明らかにすることを目的とする。TEL機能の失活と白血病化の関連性を明確にすることにより、TEL関連融合遺伝子による白血病化の機構もより明らかにされる。

### 2. 研究の進捗状況

(1) 転写因子 TEL の正常な血液細胞の発生・分化に関わる機能、特に赤芽球分化における TEL の役割を検討するために、血液細胞特異的な GATA1 の遺伝子発現制御領域(IE3.9int)下に TEL を発現する ES 細胞を作製した(GATA1-TEL ES)。コントロールの野生型 ES 細胞は血液への分化開始 5 日後より

GATA1 の発現が認められ、以降分化の進行にともない上昇した。一方 TEL の発現は分化開始前に既に発現しており、以降比較的発現は保たれていた。GATA1 遺伝子発現制御領域下に TEL を発現させた ES 細胞は血液細胞への分化にともないコントロール ES 細胞と同様に分化開始 5 日後より GATA1 の発現上昇が認められ、同時に TEL の発現も誘導された。内因性および誘導された TEL の発現量は分化開始 6 日後以降コントロール ES 細胞と比較して有意に増加していた。TEL の発現増加に関わらず GATA1-TEL ES 細胞の赤芽球への分化能は野生型の ES 細胞と比較して変化はなく、細胞表面マーカー解析では CD71 陽性細胞群の割合は対照群と比較して明らかな差は認めなかった。分化開始 7 日後の細胞を用いてコロニーアッセイを行うと GATA1-TEL ES 細胞ではコントロールと比較して BFU-E が有意に高値であった。また分化開始 7 日後の細胞を EPO 存在下で培養すると対照群に比較して CD71<sup>+</sup>TER119<sup>+</sup>分画の有意な増加が認められた。これらの結果より ES 細胞から赤芽球への分化系では TEL の過剰発現は赤芽球系前駆細胞を増加させる効果があることが示された。また GATA1-TEL ES 細胞では成熟赤芽球である CD71<sup>+</sup>TER119<sup>+</sup>分画において、Alas-E や  $\beta$ -major globin 遺伝子の発現が上昇しており、ヘモグロビン合成が亢進している可能性が示唆された。以上の結果より、TEL は未分化な段階で赤芽球系前駆細胞を維持する作用を有するとともに、赤芽球の成熟を促進する働きを有していることが明らかになった。

(2) Chicken  $\beta$ -actin (CAG) promoter 下に TEL 遺伝子を発現するマウス ES 細胞を作製

し、造血細胞へ分化させる実験系を用いて、TEL 遺伝子の造血分化における役割に関して検討した。EGFP を TEL の N 末に融合させた発現ベクターを用いて、TEL を過剰発現する細胞を FACS 等にて識別可能とした。またコントロールとしては、EGFP のみを発現する ES 細胞を用いた。RNA を用いた定量 PCR による検討では、造血細胞への分化開始 6、7 日後の段階で TEL の発現量はコントロール ES 細胞の 5~10 倍程度に増加していた。TEL を過剰発現する ES 細胞は、コロニーアッセイにてコントロールと同じ程度の造血コロニーを形成し、TEL の過剰発現により造血細胞の産生自体は影響されないと考えられた。FACS 解析により、造血分化開始 6、7 日後の embryoid body を詳細に解析すると、TEL を過剰発現する ES 細胞では、EGFP 発現 ES 細胞と比較して、CD31<sup>+</sup>/c-kit<sup>high</sup> の細胞群が減少し、c-kit の発現が低い CD31<sup>+</sup>/c-kit<sup>low</sup> の細胞群が相対的に増加していた。また高い造血細胞コロニー形成能を有する Tie2<sup>+</sup>/c-kit<sup>high</sup> の細胞群にも軽度ながら減少傾向を認め、その前段階と思われる Tie2<sup>+</sup>/c-kit<sup>low</sup> の細胞群がやや増加していた。この細胞群は Aml1 や Scl、Gata2 などの造血細胞特異的な転写因子を発現しているが、Tie2<sup>+</sup>/c-kit<sup>high</sup> の細胞群と比較して細胞周期制御因子である CDKN1C (p57<sup>KIP2</sup>) の発現が高く、そのコロニー形成能はより低かった。これらの結果から、マウス ES 細胞の血液分化系において、TEL は細胞の未分化性を維持する働きを有する可能性が示唆された。

### 3. 現在までの達成度

予定よりやや遅れており、当初研究計画の一部は実施できていない。研究代表者の異動により研究環境の再整備の必要性が生じたことがもっとも影響していると考えられる。しかし現在までの結果で、TEL は造血幹細胞、前駆細胞の維持、増殖に関与していることを解明し、当初の目的であった成果を上げることが出来た。その詳細なメカニズムについては今後の研究課題として興味深い点である。

### 4. 今後の研究の推進方策

現在までの成果で、TEL の正常造血における意義を解明することができた。この成果を基に、TEL の白血病化における役割に関して今後は研究を進展させていきたい。当初研究計画により確立したマウス ES 細胞を用いた実験系は、白血病特異的融合遺伝子の機能解析のために非常に有用であることが示された。TEL 関連融合遺伝子で最も高頻度である TEL-AML1 は小児急性リンパ性白血病で最も頻度の高い融合遺伝子であり、TEL 遺伝子の欠失を高率に伴うことから、TEL の機能喪失が白血病化に関与している可能性が高く、

マウス ES 細胞を用いた実験系を応用し、このメカニズムを解明することにより、新たな分子標的療法の開発に向けて重要な知見を得ることが期待できる。

### 5. 代表的な研究成果

(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 4 件)

- ① M. Eguchi-Ishimae, M. Eguchi, K. Maki, C. Porcher, R. Shimizu, M. Yamamoto, K. Mitani, "Leukemia-related transcription factor TEL/ETV6 expands erythroid precursors and stimulates hemoglobin synthesis.", *Cancer Sci*, 査読あり, 100 巻 4 号, 689-697 頁, 2009 年
- ② M. Eguchi-Ishimae, M. Eguchi, K. Ohyashiki, T. Yamagata, K. Mitani, "Enhanced expression of the EVI1 gene in NUP98/HOXA-expressing leukemia cells.", *Int J Hematol*, 査読あり, 89 巻 2 号, 253-256 頁, 2009 年
- ③ M. Eguchi-Ishimae, M. Eguchi, H. Kempfski, M. Greaves. NOTCH1 mutation can be an early, prenatal genetic event in T-ALL. *Blood*, 査読あり, 111 巻 1 号, 376-378 頁, 2008 年
- ④ K. Tokita, K. Maki, J. Tadokoro, Y. Nakamura, Y. Arai, K. Sasaki, M. Eguchi-Ishimae, M. Eguchi, K. Mitani, "Chronic idiopathic myelofibrosis expressing a novel type of TEL-PDGFRB chimaera responded to imatinib mesylate therapy.", *Leukemia*, 査読あり, 21 巻 1 号, 190-192 頁, 2007 年

[学会発表] (計 2 件)

- ① Minenori Eguchi-Ishimae, Mariko Eguchi, Kazuhiro Maki, Ritsuko Shimizu, Masayuki Yamamoto, Kinuko Mitani. Leukemia-related transcription factor TEL expands erythroid precursors. 第 66 回日本癌学会総会, 2007 年 10 月 4 日, 横浜
- ② 江口真理子, 石前峰斎, 牧和宏, 清水律子, 山本雅之, 三谷絹子. 白血病関連転写因子 TEL は赤芽球前駆細胞を増加させる. 第 69 回日本血液学会総会・第 49 回臨床血液学会総会, 2007 年 10 月 11 日, 横浜

[図書] (計 2 件)

- ① 江口真理子, 石前(江口)峰斎, 石井榮一, 「特集 小児疾患における臨床遺伝学の進歩 各論Ⅲ. 話題の疾患遺伝子 乳児白血病」、小児科, 査読なし, 50 巻 7 号, 1093-1099 頁, 2009 年
- ② 江口真理子, 石前(江口)峰斎, 「特集・慢性骨髄増殖疾患と後天性遺伝子異常～真性赤血球増加症と Jak2 を中心に～ 4. 慢性骨髄増殖疾患と TEL-チロシンキナーゼ異常」、血液フロンティア, 査読なし, 16 巻, 397-407 頁, 2006 年