

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20249051

研究課題名（和文） 造血器腫瘍発症の分子メカニズムの統合的理解にむけて

研究課題名（英文） Toward the comprehensive understanding of molecular mechanisms of hematopoietic malignancies

研究代表者

北村 俊雄 (Toshio Kitamura)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：20282527

研究成果の概要（和文）：急性白血病、骨髄異形成症候群、骨髄増殖性疾患発症の分子メカニズムについて主にマウス BMT モデルを利用した実験系で研究した。白血病発症に関与する遺伝子変異は大きく分けて増殖誘導・細胞死阻害を誘導するクラス I 変異と細胞分化を阻害するクラス II 変異に分類される。本研究においては、クラス I 変異では種々の分化段階の細胞が増殖する MPN が、クラス II 変異では分化が阻害される MDS が発症し、クラス I 変異とクラス II 変異が両方存在すると分化阻害された未熟な細胞が無限増殖する急性白血病が発症することをマウス BMT モデルによって示した。MDS に FLT3-ITD などのクラス I 変異が加わると白血病に移行し、CML など MPN にクラス II 変異が加わると急性転化などで急性白血病化する。このように考えると、MDS や MPN も最終的に白血病に移行する場合はクラス I とクラス II が関与するという意味において急性白血病と本質的には同じであると言える。

研究成果の概要（英文）： We studied the molecular mechanisms of etiology of leukemia, myelodysplastic syndromes (MDS) and myeloproliferative neoplasms (MPN) mainly through the usage of mouse bone marrow transplant (BMT) model. Mutations involved in leukemogenesis are classified into two major groups: class I mutations induced proliferation or block apoptosis while class II mutations hamper differentiation of hemopoietic cells. In this research project, we have shown using a mouse BMT model that class I mutations induce MPN, that class II mutations induce MDS and that combination of class I and class II mutations induce acute leukemia. We have also indicated that additional class I mutations such as FLT3-ITD or overexpression of Evi1 could lead to progression of MDS to overt leukemia and that additional class mutations such as overexpression of Hes1 could result in progression of MPN to acute leukemia, blast crisis of CML. Thus, the combinations of mutations and the timing of each mutation will determine the disease course of MDS/overt leukemia, MPN/overt leukemia and acute leukemia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	15,800,000	4,740,000	20,540,000
2009年度	10,800,000	3,240,000	14,040,000
2010年度	10,800,000	3,240,000	14,040,000
年度			
年度			
総計	37,400,000	11,220,000	48,620,000

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：発現クローニング、レトロウイルスベクター、AML1、MDS、遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

(1) 白血病発症の原因としてさまざまな染色体転座が知られている。最初に同定された染色体転座は慢性骨髄性白血病 (CML) における Ph1 染色体と呼ばれる転座 t(9;21)であり、約50年前にフィラデルフィアで発見された。その後、転座点から融合蛋白質 Bcr-Abl が同定された。この融合によって恒常的にチロシンキナーゼ Abl が活性化されることが CML 発症の原因である。現在ではグリベックなどの Bcr-Abl 阻害剤が CML の標準的治療法となり、CML の予後を改善するに至った。Bcr-Abl は単独でマウスに CML 様病態を誘導することが実験的に示された。しかしながら Bcr-Abl 以外の染色体転座だけでは白血病発症に至らないこともマウスを利用した実験で明らかになった。

(2) 近年、白血病の発症にも固形がんと同じように、複数の遺伝子変異が関与することが明らかとなってきた。研究代表者のグループを含む、いくつかのグループが2種類の遺伝子変異が共同して白血病発症を誘導することを示した。白血病の原因となる遺伝子異常は大きくクラス I とクラス II に分類される。クラス I 変異にはチロシンキナーゼや癌遺伝子の活性化型変異が含まれ、細胞増殖の誘導あるいは細胞死の抑制を引き起こす。一方、クラス II 変異は染色体修飾因子や転写因子の不活性化型変異が多く、細胞分化を阻害すると考えられている。

(3) 骨髄増殖性疾患 (MPN) の原因としてチロシンキナーゼ JAK2 の活性化型変異が知られている。染色体転座による PDGF レセプターや FGF レセプターの活性化も MPN の原因として知られている。これらの結果はクラス I 変異によって MPN が発症することを示唆している。一方、MDS に関しては疾患の不均一性もあり発症メカニズムには不明の点が多かったが、広島大学の原田らが転写因子 AML-1 の点突然変異を MDS の 15-30% の症例において、また C/EBP α の変異を MDS の数パーセントの症例において見いだした。これらの結果は MDS が均一の疾患ではないこと、転写因子などクラス II 変異によって細胞分化の阻害や異常が起こることが MDS の

本態であることを示唆している。

2. 研究の目的

本研究計画の目的は白血病、骨髄増殖性疾患 (MPN)、骨髄異形成症候群 (MDS) 発症の分子メカニズムを解明することである。

3. 研究の方法

研究代表者のグループは平成10-12年度科学研究費補助金 基盤研究 B 展開研究「レトロウイルスライブラリーを利用した新しい発現クローニング法の開発とその応用」によって開発した高効率レトロウイルスベクター系と発現クローニングを利用して多くの成果を上げてきた。またその効率の良さから研究代表者が樹立したレトロウイルスベクター系は国内外で3,000以上の研究室で使用され、iPS 細胞樹立を含む数多くの成果が報告されている。本研究計画では主に以下の2つの方法を利用してさまざまな角度から研究を行った。

(1) マウス骨髄移植実験を行い in vivo において白血病モデルの樹立とその解析。

(2) 造血器腫瘍患者の腫瘍細胞の cDNA ライブラリーのスクリーニングによる、白血病発症に関与しうる遺伝子変異の発現クローニング。

4. 研究成果

(1) 転写因子 AML1/Runx1 の突然変異体を利用したマウス MDS モデルの樹立と解析

MDS患者由来の AML1/Runx1 の突然変異体を発現させたマウス骨髄細胞を照射マウスに移植すると5-12ヶ月でヒト MDS に似た病態を呈することを示した

(Watanabe-Okochi et al. Blood, 2008)。興味深いことに、いくつか調べた MDS 患者由来 AML1 変異体のうち、Runt ホモロジドメインの変異体 D171N を発現させた骨髄細胞を移植したマウスの半数以上で、5ヶ月以降に白血病に進展した。このような経過をたどったマウスでは、レトロウイルスベクターが Evi1 という遺伝子の近傍に挿入され Evi1 の発現が亢進していた。このことは Evi1 過剰発現がクラス I 遺伝子変異様の役割を果たし MDS から MDS/over leukemia への進展

を誘導したことを示唆している。実際、AML1-D171N と Evi1 を過剰発現させた骨髓細胞を照射マウスに移植すると3-5ヶ月で全例に急性白血病が発症した。

最近、MDS に対して DNA メチル化阻害剤投与が臨床的に有効であることが報告され注目されている。我々のマウス MDS モデルにおいてプロモーター領域がメチル化されている遺伝子群を同定したところ、p57Kip2, Gata5, Myod1, Sall1 など癌で高メチル化が報告されている遺伝子群が含まれていた (Maegawa et al. 論文投稿中)。我々の MDS モデルを利用すれば、DNA メチル化阻害剤による治療モデルを構築し、遺伝子の脱メチル化と治療効果の関係を解析できる。

(2) CML-BC モデルの樹立と解析

Bcr-Abl を過剰発現させた骨髓細胞を移植することによってマウ CML モデルを作製した。既報の通り、CML 発症のためには Bcr-Abl を最も未熟な造血幹細胞 (HSC) に導入する必要がある、前駆細胞 CMP (共通骨髓前駆細胞) や GMP (顆粒球/単球前駆細胞) に導入した場合は CML を発症しない。Hes1 は未熟な細胞に発現する転写因子であり、骨髓系細胞分化を抑制し、リンパ系細胞の分化を促進することが知られている。我々は HSC、CMP および GMP においてレトロウイルスベクターによって Hes1 を発現させると、GMP レベルで分化がブロックされ、HSC だけではなく、CMP および GMP も自己複製能を獲得することを見いだした。ただし、これらの細胞は不死化しているが IL-3 依存性であり、マウスに移植しても白血病は誘導しない。Hes1 と Bcr-Abl を同時に発現させると HSC だけではなく、前駆細胞 CMP や GMP の移植でも白血病を誘導することが明らかとなった。興味深いことに、これらのマウスは CML ではなく、CML の急性転化 (chronic myelogenous leukemia in blast crisis: CML-BC) 様の病態を呈した。さらに患者サンプルにおける Hes1 発現を調べることによって、実際の CML-BC 患者でも 40% (20 例中 8 例) で Hes1 の過剰発現が認められることを明らかにした。慢性期の CML 患者 (chronic myelogenous leukemia in chronic phase: CML-CP) 20 例では Hes1 の過剰発現は一例もなかった (Nakahara et al. Blood, 2010)。これらの結果は少なくとも

一部の CML 急性転化に Hes1 過剰発現が関与していることを示唆している。今後は臨床症例で Hes1 発現が上昇する原因を明らかにする必要がある。

(3) 転写因子 C/EBP α の 2 種類の変異は協調して働き白血病発症を誘導する

転写因子 C/EBP α には N 末と C 末の 2 種類の変異があり、患者白血病細胞ではそれぞれの変異を別の遺伝子座に有する症例が多い。我々は 2 つの変異体が協調して白血病発症を誘導することを in vitro および on vivo の実験で明らかにした (Kato et al. Blood, 2011)。またクラス I 遺伝子変異として知られている FLT3-ITD は C/EBP α の C 末変異体と協調して 2 週間以内に白血病を誘導すること、および培養細胞においても C 末変異体は造血細胞分化を抑制することから、C 末変異体はクラス II 変異様の働きをすることが示唆された。

(4) AID 導入によるマウス白血病モデルの樹立と解析

AID を導入すると遺伝子突然変異が誘導される。そこで骨髓細胞に AID を過剰発現し突然変異を誘導することによって、造血器腫瘍発症と遺伝子変異の関係を明らかにすることを目的とした。AID を過剰発現した骨髓細胞を致死量照射したマウスに移植すると胸腺腫あるいは B 細胞腫瘍を発症した。腫瘍における変異を調べたところ、胸腺腫では c-myc や Notch に、一方 B 細胞腫瘍では Ebf1 と Pax5 に変異が導入されており、これらの変異がリンパ系腫瘍の発症に関与したことを示唆した (Komeno et al. Leukemia, 2010)。興味深いことに AID を過剰発現させた骨髓細胞をヌードマウスに移植した場合は、全例 B 細胞腫瘍を発症した。このことは、骨髓で不死化した細胞が胸腺で T 細胞へと教育される過程で分化阻害などのために胸腺腫を発症することを示唆している。これらの実験結果は、共通リンパ前駆細胞 (common lymphoid progenitor: CLP) が AID の標的になり、そこから B 細胞性腫瘍と T 細胞性腫瘍が発症することを示唆している。マウスによっては B 細胞腫瘍と T 細胞腫瘍 (胸腺腫) を同時に発症する場合もあった。ただし、共通の CLP クローンから B 細胞腫瘍と T 細胞性腫瘍が同時に発症した例はまだない。

(5) クラス I 遺伝子変異の同定方法の確立
 最近、固形がんと同じように白血病でも複数の変異が発症に関与することが認識されてきた。我々は以前に融合遺伝子 MLL-Sept6 をマウス骨髄細胞に導入することによって不死化した HF6 細胞を樹立した。HF6 細胞は分化が抑制された未分化細胞であるがその増殖に IL-3 を必要としている (Ono et al. *J Clin Invest*, 2005)。Ras や Raf を活性化すると HF6 細胞が自律増殖性を獲得することを見いだした (Ono et al. *Leukemia*, 2009)。つまり HF6 細胞はクラス II 変異で不死化された細胞株であるが、完全なトランスフォーメーションには Ras の活性型変異などクラス I 変異が必要と考えた。そこで急性白血病および骨髄増殖性疾患の患者サンプルからレトロウイルスベクターを利用した発現型ライブラリーを作製し、スクリーニングすることによってクラス I 変異を同定する実験を行った。標的細胞としては HF6 以外に Ba/F3 細胞を利用した。HF6 細胞が Ras 活性化で自律増殖を獲得するのに対して、Ba/F3 細胞は STAT5 の活性化で自律増殖を獲得する。7 例の患者サンプル由来のライブラリーをスクリーニングすることによって活性型変異 FLT3-ITD と RasGRP4 を同定した。FLT3-ITD はこれまでに発表された配列とは異なる重複変異を有していた。一方、RasGRP4 に関しては変異はなく、過剰発現で Ras が活性化されることが HF6 細胞に自律増殖性を付与した原因と考えられる。このようにクラス II 変異により分化がブロックされた細胞を利用すれば、患者白血病細胞から新たなクラス I 変異を同定しうるということが判明した (Watanabe-Okochi et al. *Int J Hematol*, 2009)。

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 3 5 件)

(1) 学会誌など

1. Kato, N., Kitaura, J., Doki, N., Komeno, Y., Watanabe-Okochi N., Togami, K., Nakahara, F., Oki, T., Enomoto, Y., Fukuchi, Y., Nakajima, H., Harada, Y., Harada, H., and Kitamura, T. (2011) Two types of C/EBPα mutations play distinct roles in leukemogenesis: Lessons from clinical data and BMT models. *Blood* 117:221-233.
2. Nakahara, F., Sakata-Yanagimoto, M., Komeno, Y., Kato, N., Uchida, T., Haraguchi, K., Kumano, K., Harada, Y., Harada, H.,

Kitaura, J., Ogawa, S., Kurokawa, M., *Kitamura, T., and *Chiba, S. (2010) Hes1 immortalizes committed progenitors and plays a role in blast crisis transition in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 115: 2872-2881.

3. Komeno, Y., Kitaura, J., Watanabe-Okochi, N., Kato, N., Oki, T., Nakahara, F., Harada, Y., Harada, H., Shinkura, R., Nagaoka, H., Hayashi, Y., Honjo, T., and Kitamura, T. (2010) AID-induced T-lymphoma or B-leukemia/lymphoma in a mouse BMT model. *Leukemia* 24:1018-1024.
4. Watanabe-Okochi, N., Oki, T., Komeno, Y., Kato, N., Yuji, K., Ono, R., Harada, Y., Harada, H., Hayashi, Y., Nakajima, H., Nosaka, T., Kitaura, J., and Kitamura, T. (2009) Possible involvement of RasGRP4 in leukemogenesis. *Int J. Hematology* 89: 470-481.
5. Watanabe-Okochi, N., Kitaura, J., Ono, R., Harada, H., Harada, Y., Nakajima, H., Nosaka, T., Inaba, T., and Kitamura, T. (2008) AML1 mutations induced MDS and MDS/AML in a mouse BMT model. *Blood* 111: 4297-4308.

(2) 学会発表 (計 4 7 件)

1. 榎本豊、島貫栄弥、畠山金太、谷脇雅史、麻生範雄、中熊秀喜、北村俊雄、園木孝志 MiR125 induces hematological malignancies in vivo PL-3 第 72 回日本血液学会学術集会 (2010 年 9 月 24-26 日横浜)
2. Kitamura, T., Nakahara, F., Kato, N., Watanabe-Okochi, N., Komeno, Y., Doki, N., Togami, K., Uchida, T., Kagiya, Y., Inoue, D., Enomoto, Y., Oki, T., Harada, H., and Kitaura, J. Molecular Basis for AML, MDS and MPN 第 3 9 回国際実験血液学会招待講演 (2010 年 9 月 15-18 日メルボルン)
3. 中原史雄 Hairy enhancer of split1 (Hes1) による造血前駆細胞の不死化と慢性骨髄性白血病の急性転化誘導 第 23 回幹細胞治療研究フォーラム (2010 年 2 月東京)
4. 加藤菜穂子、米野由希子、渡辺直子、中原史雄、土岐典子、原田浩徳、原田結花、北浦次郎、北村俊雄 Analysis of C/EBPα mutations in AML, MDS by a mouse BMT model. 第 7 1 回日本血液学会学術集会、口演 (2009 年 10 月 14-16 日京都)
5. 中原史雄、北浦次郎、坂田-柳本麻美子、米野由希子、加藤菜穂子、黒川峰夫、千葉滋、北村俊雄 Hes1 confers self-renewal capability on committed progenitors and

induces CML BC-like disease. 第71回日本血液学会学術集会、口演（2009年10月14～16日京都）

6. Kitamura, T. “Learning from mouse BMT models for MDS and MPD” MDS/MPD シンポジウム 招待講演（2009年4月23～30日ヒューストン）

7. 北村俊雄 Lessons from mouse BMT models for leukemia, MDS and MPD. 日米血液腫瘍ワークショップ、招待口演（2009年3月26～30日ハワイ）

8. 北村俊雄 白血病、骨髄増殖性疾患、骨髄異形成症候群発症の分子メカニズム. 第70回日本血液学会総会、シンポジウム（2008年10月10～12日京都）

9. 渡辺(大河内)直子、北浦次郎、原田浩徳、米野由希子、加藤菜穂子、小埜良一、野阪哲哉、中島秀明、北村俊雄 マウス骨髄移植モデルにおいて、Evi1 は MDS/AML を誘発する. 第70回日本血液学会総会、口演（2008年10月10～12日京都）

10. 米野由希子、北浦次郎、渡辺(大河内)直子、加藤菜穂子、沖俊彦、本庶佑、北村俊雄 BMTモデルを用いた AID 高発現による白血病・リンパ腫の解析. 第70回日本血液学会総会、口演（2008年10月10～12日京都）

11. 米野由希子、加藤菜穂子、北村俊雄 BMTモデルを用いた AID 高発現による白血病・リンパ腫の解析. 第67回日本癌学会学術総会、口演（2008年10月10～12日京都）

12. Komeno, Y., Kitaura, J., Watanabe-Okochi, N., Kato, N., Oki, T., Honjo, T. and Kitamura, T. Overexpression of AID causes both T and B lymphoma in a mouse BMT model. ISEH 37th Annual Scientific Meeting, Poster (2008年7月9～12日ボストン)

(3) 総説、出版物 (計8件)

1. 北村俊雄、渡辺直子、米野由希子、加藤菜穂子、中原史雄、土岐典子、沖俊彦、北浦次郎 (2009) 白血病、骨髄増殖性疾患、骨髄異形成症候群発症の分子メカニズム 臨床血液 50:174-181.

(4) 研究成果による工業所有権の出願・取得状況

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北村 俊雄 (Toshio Kitamura)
東京大学・医科学研究所・教授
研究者番号：20282527

(2) 研究分担者

北浦 次郎 (Jiro Kitaura)
東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：30282651

(3) 連携研究者

- 湯地晃一郎 (Koichiro Yuji)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号：50396868
- 東條 有伸 (Arinobu Tojo)
東京大学・医科学研究所・教授
研究者番号：00211681