

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 年度 ～ 2010 年度

課題番号：20591110

研究課題名（和文）新規に同定した *TEL-Lyn* 融合遺伝子による骨髄増殖性疾患発症機構の解析研究課題名（英文） Mechanism of myelofibrosis by a novel *TEL-Lyn* fusion gene.

研究代表者

中世古 知昭 (NAKASEKO CHIAKI)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：30323398

研究成果の概要（和文）：骨髄増殖性疾患(MPN)は造血幹細胞の異常による疾患群であり、しばしば二次性に骨髄線維症を発症する。我々は *ins(12;8)(p13;q11q21)* の染色体異常を有する原発性骨髄線維症患者末梢血単核球から新たに *TEL-Lyn* 融合遺伝子を同定した。*TEL-Lyn* 融合遺伝子をマウス造血幹細胞に導入し移植すると、短期間に著明な骨髄線維症を来し、MPN を発症して死亡したが、STAT5 欠損マウスではその効果は認めなかった。*TEL-Lyn* タンパクは自己リン酸化により活性化され、STAT5 に直接結合し、Jak2 非依存性に STAT5 を活性化した。以上から、*TEL-Lyn* 融合遺伝子は直接 STAT5 と結合して活性化し、骨髄線維症を有する MPN を発症することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Myeloproliferative neoplasms (MPN), a group of hematopoietic stem cell (HSC) disorders, are often accompanied by myelofibrosis. We previously identified the *TEL-Lyn* fusion gene in idiopathic myelofibrosis with *ins(12;8)(p13;q11q21)*. The introduction of *TEL-Lyn* into HSCs resulted in fatal MPN with massive myelofibrosis in mice, implicating the rearranged *Lyn* kinase in the pathogenesis of MPN with myelofibrosis. In this study, we demonstrated that the direct activation of STAT5 by *TEL-Lyn* is crucial for the development of MPN. *TEL-Lyn* was constitutively active as a kinase through autophosphorylation. In *TEL-Lyn*-expressing cells, STAT5 was activated in a JAK2-independent manner. *TEL-Lyn* interacted with STAT5 and directly activated STAT5 both in vitro and in vivo. Of note, *TEL-Lyn* did not support the formation of colonies by *Stat5*-deficient HSCs under cytokine-free conditions and the capacity of *TEL-Lyn* to induce MPN with myelofibrosis was profoundly attenuated in a *Stat5*-null background. These findings define STAT5 as a direct target of *TEL-Lyn* and unveil the *Lyn*-STAT5 axis as a novel pathway to augment proliferative signals in MPN and leukemia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000 円	450,000 円	1,950,000 円
2009 年度	1,000,000 円	300,000 円	1,300,000 円
2010 年度	1,000,000 円	300,000 円	1,300,000 円
年度			
年度			
総計	3,500,000 円	1,050,000 円	4,550,000 円

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：血液腫瘍学、慢性骨髄増殖性疾患、骨髄線維症、*TEL-Lyn*、チロシンキナーゼ阻害剤、白血病、STAT5

1. 研究開始当初の背景

造血器悪性腫瘍発症には様々な遺伝子異常が関与しているが、中でもチロシンキナーゼとの融合遺伝子を含む様々な遺伝子異常が関与していることが明らかになっている。近年ある種の骨髄増殖性疾患において、*TEL* (*Etv6*) 遺伝子と種々のチロシンキナーゼ遺伝子による融合蛋白がその発症に関与していることが明らかになってきた。*TEL* 遺伝子は 12p13 染色体に位置し、ETS ファミリーに属する転写因子である。*TEL* は C 末端側に ETS ファミリーで高度に保存された DNA 結合ドメインを有し、配列特異的に DNA に結合する。また N 末端側には PNT (HLH) ドメインを有し、*TEL* 同士、あるいは他の転写因子との結合、多量体形成に関わっている。*TEL* 遺伝子は 20 以上にわたる多彩な転座相手と融合遺伝子を形成し、その転座相手はチロシンキナーゼ、フォスファターゼと多岐にわたるが、*TEL* と結合するチロシンキナーゼは *PDGFRβ*、*ABL*、*Jak2*、*Syk*、*FGFR3* などが報告されている。慢性骨髄増殖性疾患 (CMPD) においては *TEL-PDGFRβ*、*TEL-ABL*、*TEL-Jak2* の 3 者の融合遺伝子異常が知られている。*TEL*-チロシンキナーゼキメラ蛋白では *TEL* の PNT ドメインを介したチロシンキナーゼの異常会合が生じ、その結果リガンドないしは上位シグナル非依存性に自己リン酸化が生じ、活性化される。自己リン酸化されたキメラタンパクはそれらのチロシンキナーゼの下流に存在する *Ras*-*MAPK*、*PI3K*-*Akt*、*PLCγ* 経路などを介して細胞増殖に働き、CMPD の発症に関与していると考えられる。

Lyn は 8p13 染色体に位置する *Src* ファミリーチロシンキナーゼである。*Lyn* は各種サイトカインシグナル伝達や造血細胞の増殖・アポトーシスの制御に重要な役割を果たしている。最近イマチニブ耐性慢性骨髄性白血病では恒常的に *Lyn* が活性化していることが報告され、*Lyn* の活性コントロールが新たな分子標的療法のターゲットとなりうることが示されている。しかしこれまでのところ、*Lyn* が他の遺伝子と融合遺伝子を形成することによって恒常的に活性化し、白血病や CMPD の発症に関与しているという報告はない。

我々は著しい脾腫と骨髄線維化を伴い、好酸球増多症を来した症例を経験した。本症例はイマチニブ、化学療法、同種造血幹細胞移植等の種々の治療に抵抗性であり、短期間に急性転化を来し死亡した。本症例では *FIP1L1-PDGFRα* 融合遺伝子は検出されなかったが、46XY, ins(12;8)(p13;q11q21) の染色体異常を有していた。我々はこの特徴的な染色体異常に着目し、その遺伝子座から本症例の病態に *TEL* 遺伝子と *Lyn* 遺伝子が関与しているのではないかと推測し、両遺伝子に特異的なプライマーを用いて融合遺伝子の検出を

おこなったところ、本症例は *TEL-Lyn* 融合遺伝子を有していたことが判明した。この *TEL* 遺伝子と *Lyn* 遺伝子の融合遺伝子は過去に報告のない、新たな融合遺伝子異常である。切断点の解析からは *TEL* では PNT ドメインが保存されており、*Lyn* は SH2、キナーゼドメインが保存されていることが判明した。DNA シーケンスを詳細に検討したところ、他の部位に欠失や挿入、点突然変異などは認めなかった。

我々はまず Ba/F3 細胞に *TEL-Lyn* 融合遺伝子を導入し、*TEL-Lyn* 融合蛋白が形成されることを Western blotting 法によって確認した。この *TEL-Lyn* 融合遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて、IL-3 依存性である Ba/F3 細胞に遺伝子導入したところ、IL-3 非依存性に自律的な増殖能を得ることが確認された。

さらに C57BL/6 マウス骨髄細胞から FACS sorting にて造血幹細胞 (HSC) (*CD34-c-Kit+Sca-1+Lin-:CD34KSL*) を分離し、*TEL-Lyn* 融合遺伝子を導入してコロニーアッセイを行ったところ、*TEL-Lyn* 融合遺伝子導入 HSC では、各種サイトカイン無添加にてもコロニー形成能が見られ、巨核球まで分化能を有するコロニーが形成されることが確認された。これらの *TEL-Lyn* 融合遺伝子導入による Ba/F3 細胞の IL-3 非依存性増殖や、HSC のサイトカイン非依存性コロニー形成能は、*imatinib* によっては全く抑制されず、比較的 low 濃度の *dasatinib* で完全に抑制された。すなわち、*TEL-Lyn* 融合遺伝子による *Lyn* の恒常的活性化により、これらのサイトカイン非依存性増殖能・コロニー形成能が獲得されることを示唆する。

次に、我々は *TEL-Lyn* 融合遺伝子導入 HSC を放射線照射した congenic mouse に移植した。*TEL-Lyn* 融合遺伝子導入 HSC 移植マウス (*TEL-Lyn* マウス) は移植後約 20 日頃より死に始め、50 日までに 60% のマウスが死亡した。これらのマウスでは末梢血白血球数が著しく増加し、著明な好中球増加、肝脾腫が認められた。さらに *TEL-Lyn* マウスでは、著しい骨髄の線維化が生じることが観察された。すなわち、*TEL-Lyn* 融合遺伝子導入 HSC から、骨髄増殖性疾患、骨髄線維症を引き起こされることが確認された。

2. 研究の目的

今回の研究では我々が新規に同定した *TEL-Lyn* 融合遺伝子をマウス造血幹細胞、ヒト白血病細胞株に遺伝子導入して、造血幹細胞に対する増殖作用、CMPD 発症、特に骨髄線維症発症機構について、詳細に分子生物学的に解析を行うことを目的とする。特に骨髄線維症発症機構について、*TEL-Lyn* 融合遺伝子導入 HSC の骨髄での増殖過程における、骨髄

線維芽細胞の活性化機構を STAT5^{-/-}マウス等を用いて解析する。また、*TEL-Lyn* 融合遺伝子において *TEL*、*Lyn* 遺伝子の種々の変異体を遺伝子導入することにより、より詳細に *TEL*、*Lyn* の働きを分子レベルで解析する。

3. 研究の方法

新規に同定した *TEL-Lyn* 融合遺伝子による CMPD 発症機構の解析のため、*TEL-Lyn* 融合遺伝子及びその変異体を造血幹細胞、白血病細胞株に導入し、増殖能、形質転換能、CMPD 発症機構について解析し、チロシンキナーゼ阻害剤の効果について解析する。骨髄線維症の発症機構については、免疫・組織化学的にその機序を解析するとともに、STAT5^{-/-}マウスを用いた解析を行い、骨髄線維症発症における STAT5 の役割を明らかにする。

(1) *TEL-Lyn* 融合遺伝子の cloning と各種変異体の作成

RACE 法により *TEL-Lyn* 融合遺伝子の全長をクローニングし、DNA シークエンスにより塩基配列を確認した。これをもとに *TEL* の重合化に必要な PNT ドメインや、*Lyn* の SH2 ドメイン、キナーゼドメイン等における各種の変異体を作成し、また各種の truncated form 変異体を作成する。

(2) 造血幹細胞への遺伝子導入と in vitro での解析

レトロウイルスベクター (MIGR1 vector 及び pMX puro vector) へ *TEL-Lyn* 融合遺伝子を組み替えた後、パッケージング細胞 (293gp 細胞) を用いてレトロウイルスを作成する。C57BL/6 マウス骨髄から造血幹細胞 CD34KSL、および顆粒球・マクロファージ前駆細胞 (GMP: Lin-IL-7-Sca-1-c-Kit+CD34+FcgR II/III^{hi}) を純化し、*TEL-Lyn* の遺伝子導入を行う。GFP 陽性細胞を目安に FACS sorting を行い、*TEL-Lyn* 高発現細胞を得る。同様に各種変異体の *TEL-Lyn* 融合遺伝子も遺伝子導入を行う。これらの細胞を用いて colony forming assay, replating assay を行い、血球分化能、増殖能、白血病芽球コロニー形成能の解析を通して *TEL-Lyn* の transforming 活性及びその標的細胞を明らかにする。またヒト臍帯血 CD34+CD38⁻細胞を用いた解析も同様に行う。

(3) *TEL-Lyn* 融合遺伝子の in vivo における CMPD、骨髄線維症発症機構の解析

前述のように、*TEL-Lyn* 融合遺伝子を導入したマウス HSC を放射線照射した congenic mouse に移植したところ、著しい骨髄線維症を伴う骨髄増殖性疾患を発症することが確認された。そこで、骨髄線維症の発症機構における Jak2, STAT5 の関与について詳細に解析するため、STAT5^{-/-}マウスを用いた解析を

行う。

(4) *TEL-Lyn* 融合遺伝子導入細胞における細胞内シグナルの解析

IL-3 依存性ヒト白血病細胞株である Ba/F3 細胞に上記と同様の手法を用いて *TEL-Lyn* 融合遺伝子、各種変異体遺伝子を遺伝子導入し、これらを恒常的に発現する細胞を樹立する。IL-3 非存在下における増殖能、Ras-MAPK, PI3K-Akt, PLC β 経路のシグナル伝達系について解析する。さらにイマチニブ感受性である K562 細胞に同様に遺伝子導入を行い、*Lyn* への効果の異なる選択的チロシンキナーゼ阻害剤 (imatinib, dasatinib, NS-187 など) への感受性の変化について解析する。

4. 研究成果

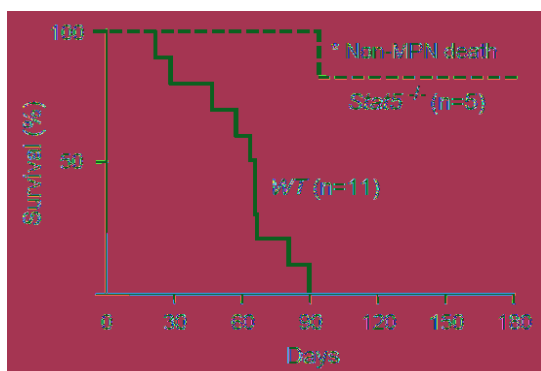
(1) 原発性骨髄線維症患者から新規に同定した *TEL-Lyn* 融合遺伝子は、IL-3 依存性である Ba/F3 細胞に遺伝子導入すると、IL-3 非依存性の自律的な増殖能をもたらし、さらに C57BL/6 マウス骨髄 HSC (CD34KSL) に *TEL-Lyn* 融合遺伝子を導入するとサイトカイン無添加に巨核球まで分化能を有するコロニーが形成されることを確認した。これらの *TEL-Lyn* 融合遺伝子導入による Ba/F3 細胞の IL-3 非依存性増殖や、HSC のサイトカイン非依存性コロニー形成能は、imatinib によっては全く抑制されず、比較的低濃度の dasatinib で完全に抑制された。

(2) *TEL-Lyn* 融合遺伝子を導入した BaF3 細胞および UT-7/TPO 細胞では、STAT5 の恒常的なリン酸化が認められた。さらに *TEL-Lyn* 融合遺伝子導入 HSC を放射線照射した congenic mouse に移植した。これらのマウスは著明な好中球増加、肝脾腫、著しい骨髄の線維化が生じ、移植後 50 日までに全てのマウスが死亡した。

(3) STAT5^{-/-}マウス胎児肝の c-kit 陽性細胞 図 1. *TEL-Lyn* 融合遺伝子による骨髄線維症発症における STAT5 の関与

に同様に *TEL-Lyn* 融合遺伝子を導入すると、SCF、TPO 非存在下のコロニー形成能は消失した。また放射線照射マウスへの移植では、6 ヶ月の時点で骨髄線維症の発症は観察されず、*TEL-Lyn* 融合遺伝子による骨髄線維症発症には、STAT5 が必要であることが明らかとなった (図 1)。

(4) *TEL-Lyn* 融合遺伝子における *Lyn* キナーゼドメイン変異遺伝子を作成したところ、これらの活性化は認めなかった。免疫沈降にて *TEL-Lyn* 融合蛋白に STAT5 蛋白が共沈するこ



とを確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

① Takeda Y, Nakaseko C, Tanaka H, Takeuchi M, Yui M, Saraya A, Miyagi S, Ohwada C, Sakaida E, Yamaguchi N, Yokote K, Hennighausen L, and Iwama A. Direct activation of Stat5 by TEL-Lyn fusion protein promotes induction of myeloproliferative disease with myelofibrosis. *Brit J Haematol* 2011 Apr 15 [Epub ahead of print] 査読あり

② Tanaka H, Takeuchi M, Takeda Y, Sakai S, Abe D, Ohwada C, Sakaida E, Shimizu N, Saito Y, Miyagi S, Iwama A, Nakaseko C. Identification of a novel TEL-Lyn fusion gene in primary myelofibrosis. *Leukemia* 24(1): 197-200, 2010. 査読あり

③ Takeuchi M, Nakaseko C, Miyagi S, Takeda Y, Ozawa S, Ohwada C, Cho R, Nishimura M, Saito Y, Iwama A. Clonal expansion of non-leukemic cells expressing two novel MLL-ELL variants with distinct transforming activity. *Leukemia* 22(4):861-864, 2008 査読有り

〔学会発表〕 (計 2 件)

① Takeda Y, Nakaseko C, Tanaka H, Takeuchi M, Yui M, Saraya A, Miyagi S, Ohwada C, Sakaida E, Yokote K, Iwama A. Direct Activation of STAT5 by TEL-Lyn Fusion Protein Promotes Induction of Myeloproliferative Neoplasms with Myelofibrosis. The 52th American Society of Hematology, Orlando, 2010/12/7

② 竹田勇輔, 中世古知昭, 田中宏明, 武内正博, 由井麻紀子, 更家敦則, 宮城聡, 大和田千桂子, 堺田恵美子, 山口直人, 横手幸太郎, Lothar Hennighausen, 岩間厚志 TEL-Lyn 融合タンパクは Stat5 を活性化し骨髄線維症を誘発する. 第 72 回日本血液学会総会、横

浜、2010/9/24

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/hematology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中世古 知昭 (NAKASEKO CHIAKI)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：30323398