

機関番号：15401
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591127
 研究課題名（和文） AML1点突然変異を有する骨髄異形成症候群におけるBMI-1高発現の分子機構
 研究課題名（英文） Molecular mechanism of enhanced BMI-1 expression in myelodysplastic syndrome with AML1 point mutation.
 研究代表者
 木村 昭郎 (KIMURA AKIRO)
 広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授
 研究者番号：70127645

研究成果の概要(和文)：

慢性骨髄性白血病(CML)の骨髄または末梢血 CD34 陽性細胞において、造血幹細胞や白血病幹細胞の自己複製に重要な役割を果たしている BMI-1 の発現は慢性期、加速期、芽球期の順に高値であり、CML における病勢進行に強く関与していることが明らかとなった。従ってBMI-1 は病勢移行の分子マーカーの一つとして有用であり、この蛋白を分子標的治療の標的として考えることが示唆された。次にリンパ腫では BMI-1 高発現細胞株はサーバイビンの発現亢進を介してエトポシド及びオキサリプラチンに対して耐性を示すことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：

BMI-1 plays an important role in selfrenewal of hematopoietic stem cells as well as leukemic stem cells. We investigated the expression in CD34⁺ cells from chronic myeloid leukemia (CML). BMI-1 expression was significantly higher in chronic phase compared to controls, and was further increased during the course of the disease progression, accelerated phase and blastic phase. These results suggest the usefulness of BMI-1 expression in CD34⁺ cells as a molecular marker for monitoring CML patients in addition to as a therapeutic molecular target. In Lymphoma, high BMI-1 expression was found resistant to both etoposide and oxaliplatin through enhanced expression of survivin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：AML1、BMI-1、骨髄異形成症候群、急性骨髄性白血病

1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群(MDS)の発症機構を遺伝子レベルで解明するため、造血細胞の増殖・分化にかかわる必須の転写因子である AML1 の特に点突然変異に注目して研究を行ってきた。被爆者及び化学療法、放射線治療関連の二次性 MDS では高頻度にN末領域のランドメインに集中するのに対して、一次性 MDS では低頻度ながら C 末領域にも存在することを見出した。AML1 変異は進行期の病型に集中している。

AML1 遺伝子変異を認めた例について、協調する遺伝子の検索を行ったところ、受容体チロシンキナーゼ(RTK)-RASシグナル伝達経路にあたる FLT-3, N-RAS, SHP-2, NF1 のいずれかの変異を高率に見出したことから、これらの例ではRTK-RASシグナル経路の活性化が、主として分化障害をきたす AML1 変異と協調して発症に至ると考えられた。

BMI-1 はポリコームグループの一つであり、最近造血幹細胞や白血病幹細胞の自己複製にきわめて重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。そこで MDS における骨髄 CD34 陽性細胞(芽球)中の BMI-1 の陽性率を解析したところ、RA/RARS、RAEB、RAEB-T、MDS-AML の順に高くなり、病期の進展につれ BMI-1 陽性の芽球が急激に骨髄中に増加してくると考えられた。また BMI-1 陽性率が高値の RA/RARS では RAEB に進展する確率が高いことから、BMI-1 は病期進展のマーカーとなることを示した。さらに、MDS-AML を含む AML においては、芽球 BMI-1 陽性率の高値群は低値群に比較し、生存率が有意に短縮しており、BMI-1 は年令とともに独立した予後不良因子であった。従って BMI-1 の発現は MDS-AML を含む AML の予後を予測する重要なバイオマー

カーと考えられた。

2. 研究の目的

AML1 点突然変異を有する MDS/AML において、AML1 点変異と RTK-RAS 経路の変異が協調的に作用して BMI-1 の発現を亢進させ、MDS/AML を発症させる分子機構を解明する。次に BMI-1 は造血幹細胞や germ cell に強く発現していることから、MDS/AML 以外の造血器腫瘍である慢性骨髄性白血病(CML)とリンパ腫における発現や自己複製能との関連性も明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

MDS/AML 症例からの BMI 高発現及び低発現骨髄 CD34⁺細胞(芽球)の採取に関して、AML1 変異とともに N-RAS、SHP-2、NF-1、FLT-3 のいずれかの変異を有する症例について、BMI-1 陽性 CD34⁺芽球比率の低い RAEB の時期と、BMI-1 陽性 CD34⁺芽球比率の高い RAEB-T~MDS-AML の時期にそれぞれ骨髄液を採取し、CD34⁺細胞を分離し、保存を進めている。

3種類の CML(芽球期)由来細胞株、リンパ腫系細胞株、HEK-293 細胞株、さらに CML 及びリンパ腫患者検体を使用した。CD34 陽性細胞はマイクロビーズにより CD34 陽性細胞を分取した。BMI-1 mRNA の解析には、定法に従い cDNA を作成し、リアルタイム PCR(RQ-PCR)法に適用した。BMI-1 の発現解析にはフローサイトメトリー法(FCM 法)を利用した。CML 患者では骨髄すなわち末梢血からの単核球分画を抗 CD34 抗体-PE で染色固定後、リンパ腫細胞と細胞株は直接固定後、マウス抗 Bmi-1 抗体に続いて抗マウス IgG 結合 FITC で染色し、フローサイトメーター

で解析した。ウェスタンブロッティング法(WB法)ではマウス抗 Bmi-1 抗体を用い、ECL で発現を確認した。*Bcr-Abl* と BMI-1 発現ベクターの遺伝子導入にはレトロウイルスを用いた。

4. 研究成果

CML は造血幹細胞の腫瘍であり、骨髄または末梢血 CD34 陽性細胞における BMI-1 の発現をフローサイトメトリー(FCM)により評価したところ、正常対照に対して慢性期、加速期、芽球期の順に高値であり、BMI-1 蛋白は CML における病勢進行に強く関与しているものと推測された。BMI-1 mRNA のレベルにおいては、対照に比し CML では有意に高値であったが病期間での差はなかったことから、mRNA の発現とその蛋白の発現の差異は病勢進行に伴う転写後修飾によるものであると考えられた。そこで CML 細胞株と BCR-ABL 導入 HEK-293 細胞をプロテアソーム阻害剤(LLnL あるいは MG132)の存在下で培養し、ウェスタンブロット法と FCM 法により、BMI-1 の発現を評価した。BMI-1 蛋白は 2 つのプロテアソーム阻害剤により発現強度が増強されたことから、CML では BMI-1 蛋白はユビキチン-プロテアソーム系により蛋白発現が制御され、特に芽球期において蛋白が分解抑制されていることが強く示唆された。以上の結果から、BMI-1 蛋白が病勢移行の分子マーカーの一つとして有用であり、またこの蛋白が分子治療標的として考えることが示唆された。

リンパ腫ではリンパ腫細胞が BMI-1 を高発現し化学療法に耐性となっていると考えられる症例があるため、リンパ腫における BMI-1 の発現と抗癌剤耐性の関連性を検討した。リンパ腫細胞株にレトロウイルスベクターを用いて BMI-1 を導入し、種々の抗癌剤に対する反応性を検討したところ、BMI-1 高発現細胞株はエトポシド及びオキサリプラチンに対して耐性

を示した。そこで BMI-1 が抗癌剤耐性を有するメカニズムについて検討した。まず、BMI-1 高発現株における遺伝子発現の網羅的解析を行ったが特異的に増減する遺伝子は認められなかった。そこで現在までにリンパ腫における抗癌剤耐性との関連性が報告されている数種類の蛋白について BMI-1 発現との関連性について検討を行い、BMI-1 のターゲット遺伝子を同定しつつある。

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 10 件)

1. Sugihara, S., Katsutani, S., Deckmyn, H., Fujimura, K., Kimura, A. : Roles of Src-like adaptor protein 2 (SLAP-2) in GPVI-mediated platelet activation SLAP-2 and GPVI signaling. *Thrombosis Research* 126: e276-e285, 2010.(査読有)
2. Nitta, H., Mihara, K., Sakai, A., Kimura, A. : Expansion of CD8⁺/perforin⁺ effector memory T cells in the bone marrow of patients with thymoma-associated pure red cell aplasia. *British Journal of Haematology* 150(6): 712-715, 2010.(査読有)
3. Imagawa, J., Harada, Y., Shimomura, T., Tanaka, H., Okikawa, Y., Hyodo, H., Kimura, A., Harada, H. : Clinical and genetic features of therapy-related myeloid neoplasms after chemotherapy for acute promyelocytic leukemia. *Blood* 116(26): 6018-6022, 2010.(査読有)
4. 木村昭郎: 1.治療関連骨髄異形成症候群(MDS)/白血病の疾患概念と疫学. 特集・治療関連骨髄異形成症候群(MDS)/白血病、医薬ジャーナル社、血液フロンティア 20(6): 21-29, 2010.(査読無)
5. Ding Y, Harada Y, Imagawa J, Kimura A,

Harada H: AML1/RUNX1 point mutation possibly promotes leukemic transformation in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 114(25): 5201–5205, 2009. (査読有)

6. Bhattacharyya, J., Mihara, K., Yasunaga, S., Tanaka, H., Hoshi, M., Takihara, Y., Kimura, A. : BMI-1 expression is enhanced through transcriptional and posttranscriptional regulation during the progression of chronic myeloid leukemia. *Annals of Hematology* 88(4): 333–340, 2009. (査読有)

7. Mihara K., Yanagihara K, Takigahira M, Imai C, Kitanaka A, Takihara Y, Kimura A.: Activated T-cell-mediated immunotherapy with a chimeric receptor against CD38 in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Journal of Immunotherapy* 32(7): 737–743, 2009. (査読有)

8. Zharlyganova, D., Harada, H., Harada, Y., Shinkarev, S., Zhumadilov, Z., Zhunusova, A., Tchaizhunusova, N.J., Apsalikov, K., Kemaikin, V., Zhumadilov, K., Kawano, N., Kimura, A., Hoshi, M.: High Frequency of AML1/RUNX1 point mutations in radiation-associated myelodysplastic syndrome around Semiplalatin nuclear test site. *J. Radiat. Res.* 49(5), 549–555, 2008. (査読有)

9. Tasaka, T., Tohyama, K., Kishimoto, M., Ohyashiki, K., Mitani, K., Hotta, T., Kanamaru, A., Okamoto, S., Karasawa, M., Kimura, A., Tomonaga, M., Uchiyama, T., Ozawa, K. on behalf of the Japanese Cooperative Study Group for Intractable Bone Marrow Diseases: Myelodysplastic syndrome with chromosome 5 abnormalities: a nationwide survey in Japan. *Leukemia* 22(10): 1874–1881, 2008. (査読有)

10. Kuroda, Y., Sakai, A., Tsuyama, N., Katayama, Y., Munemasa, S., Asaoku, H., Okikawa, Y., Nakaju, N., Mizuno, M., Ogawa, K.,

Nishisaka, T., Matsui, H., Tanaka, H., Kimura, A.: Ectopic cyclin D1 overexpression increases chemosensitivity but not cell proliferation in multiple myeloma. *International Journal of Oncology* 33: 1201–1213, 2008. (査読有)

[学会発表] (計 9 件)

1. Bhattacharyya, J., Mihara, K., Ohtsubo, M., Yasunaga, S., Takihara, Y., Hoshi, M., Kimura, A. : B-Cell Lymphoma Cells Overexpressing BMI-1 Are Correlated with Drug Resistance through Enhanced Expression of Survivin and Are Effectively Eliminated by T Cells with Anti-CD38 Chimeric Receptor. 52nd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Orlando, Florida, USA, 2010.12.5
2. Nitta, H., Mihara, K., Sakai, A., Kimura, A. : Expansion of CD8⁺/perforin⁺ effector memory T cells in the bone marrow with thymoma-associated PRCA. 第 72 回日本血液学会学術集会, 横浜, 2010.9.24
3. Harada, H., Harada, Y., Imagawa, J., Kimura, A. : Molecular mechanisms to produce MDS/AML by C-terminal truncated type of AML1/RUNX1 mutations. 第 72 回日本血液学会学術集会, 横浜, 2010.9.24
4. Bhattacharyya, J., Mihara, K., Ohtsubo, M., Yasunaga, S., Takihara, Y., Kimura, A., Hoshi, M. : BMI-1 is correlated with drug resistance in B-cell lymphomas through enhanced expression of survivin. 第 72 回日本血液学会学術集会, 横浜, 2010.9.24
5. 丁 曄、原田結花、今川 潤、木村昭郎、原田浩徳: 骨髄増殖性腫瘍からの白血病移行メカニズムの解明. 第 107 回日本内科学会講演会, 東京, 2010.4.10
6. Imagawa, J., Harada, H., Ding, Y., Kimura, A., Harada, H. : AML1/RUNX1 Point Mutation

Possibly Promotes Leukemic Transformation in Myeloproliferative Disorders. 51th Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, USA, 2009.12.5

7. Yoshida, N., Sakai, A., Okikawa, Y., Katayama, Y., Asaoku, H., Matsui, H., Arihiro, K., Fujihara, M., Nishisaka, T., Sasaki, N., Sadahira, Y., Kimura, A. : Levels of sIL-2R in Sera Depend On Number of CD25-Positive Lymphoma Cells and MMP-9-Positive Macrophages in DLBCL. 51th Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, USA, 2009.12.5
8. Harada H, Watanabe M, Suzuki K, Yanagita S, Suzuki T, Yoshida Y, Kimura A, Tsudo M, Takatoku M, Ozawa K: Results of Phase II Clinical Study of Lenalidomide in Japanese Patients with Myelodysplastic Syndrome (MDS). The 10th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes, Patras, Greece, 2009.5.7
9. Kimura, A. : BMI-1 and AML-1 Point Mutation in the Pathogenesis of MDS. The 10th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes, Patras, Greece, 2009.5.7

[図書](計 2 件)

1. 木村昭郎:第9版 新臨床内科学(Practice of Internal Medicine 9th Edition). 医学書院. pp899-901, 2009(総頁 1881)
2. 田中英夫、木村昭郎:血液疾患診療ハンドブックー診療の手引と臨床データ集ー.医薬ジャーナル社. pp308-339, 2009.(総頁 671)

6. 研究組織

(1)研究代表者

木村 昭郎 (KIMURA AKIRO)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号:70127645

(2) 研究分担者

三原 圭一郎(MIHARA KEICHIRO)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号:90363077

(3)連携研究者

()

研究者番号 :