

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20599009

研究課題名 (和文) AML 1 点突然変異体による骨髄異形成症候群発症の病態解析

研究課題名 (英文) Roles of AML1 mutants in the development of myelodysplastic syndromes

研究代表者

佐藤 友亮 (SATO YUSUKE)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20506307

研究成果の概要 (和文)：

野生型 AML1 の抑制型変異体である AML1C 端欠失変異体(AML1dC)の機能解析を行った。その結果以下の二点を見出した。①AML1dC は造血幹/前駆細胞(HSPC)の増殖活性を促進することで前白血球状態を形成する。②HSPC の DNA 修復能を低下させることで、付加的遺伝子変異の発生を促す。これらの機序により AML1 点突然変異は、骨髄異形成症候群の発症および、それに引き続く急性骨髄性白血病への進展を導くと考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

We performed the functional analysis of AML1dC, which is a dominant negative mutant of AML1. As a result, we found that AML1dC enhances proliferating ability of hematopoietic stem/progenitor cells (HSPC) and attenuates DNA repair ability of HSPC. Through these mechanisms, AML1dC promotes the development of myelodysplastic syndromes (MDS) and the transition from MDS to acute myeloid 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	0	1,500,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	570,000	3,970,000

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：骨髄異形成症候群、急性骨髄性白血病、AML1/RUNX1、DNA 修復

1. 研究開始当初の背景

AML1 点突然変異が骨髄異形成症候群 (MDS) 発症の原因となることがこれまでに分かっているが、その分子機序は不明である。申請者らは、AML1 点突然変異が MDS/AML (MDS と、

MDS から病型移行した急性骨髄性白血病 (AML) を引き起こす機序を明らかにすることを目的に本研究を行った。

2. 研究の目的

(1) AML1 点突然変異による造血幹細胞の増殖機構の解明

AML1 変異体が造血幹細胞の増殖を促すシグナル伝達経路を明らかにする。

(2) 造血幹細胞の分化系統決定における AML1 変異体の役割

造血器悪性腫瘍を引き起こす AML1 変異の役割を造血幹細胞の分化制御の観点から明らかにする。

3. 研究の方法

(1) AML1 点突然変異による造血幹細胞の増殖機構の解析

AML1 変異体が造血幹細胞の増殖を促すシグナル伝達経路を明らかにする。

(2) AML1 点突然変異が起こる HSPC の分化段階と、MDS/AML 発症の関係

AML1 変異体が、どの分化段階の造血細胞に導入されることで MDS/AML 発症を発症するのかを検討する。

(3) AML1 変異体が多能性造血幹細胞の運命決定におよぼす影響

多能性造血幹細胞からリンパ球前駆細胞への分化に、AML1 の変異体が及ぼす影響を検討する。

(4) AML1 変異体に起因する遺伝子発現変化の網羅的解析

遺伝子発現変化の網羅的解析により、AML1 変異体による MDS/AML 発症機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) AML1 点突然変異による造血幹細胞の増殖機構の解析

HSPC へ導入した AML1dC はトロンボポエチンの刺激によって、ERK1/2 や STAT3 を活性化することはなく、STAT5 を特異的に活性化することが分かった。

(2) AML1 点突然変異が起こる HSPC の分化段階と、MDS/AML 発症の関係

AML1dC 導入細胞を用いたマウス骨髄移植実験により、HSPC レベル (Lin⁻Scal⁺c-Kit⁺) での AML1 変異が細胞増殖を促進し、前白血病状態を形成することが分かった。

(3) AML1 変異体が多能性造血幹細胞の運命決定におよぼす影響

前述の AML1dC 導入 HSPC を用いた骨髄移植実験および、AML1dC 過剰発現 ES 細胞から造血細胞を分化させる実験により、AML1dC は、造血幹細胞から骨髓球系前駆細胞への分化を強く促すことが分かった。また、AML1dC は造血幹細胞から赤芽球系への分化を阻害することも明らかとなった。

(4) AML1 変異体に起因する遺伝子発現変化の網羅的解析

AML1dC 導入 32D 細胞を用いた遺伝子発現変

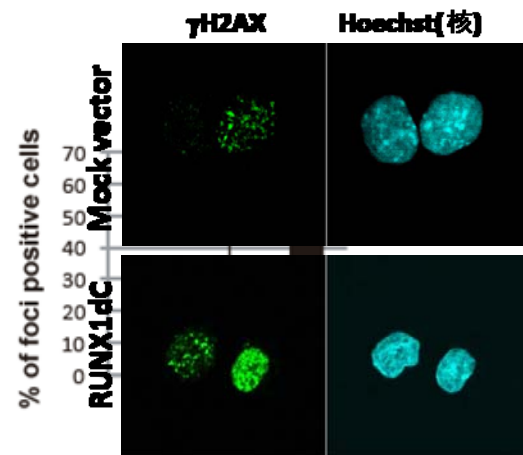
化の網羅的解析により、AML1dC がストレス応答制御分子である Gadd45a の発現を抑制していることが分かった。

過去の報告により、Gadd45a の発現は p53 により直接的に制御されていることが分かっている。我々は、Gadd45a のイントロン 3 内にある、p53 結合部位の近傍に RUNX 1 が結合することを明らかにした。ルシフェラーゼアッセイおよび、クロマチン免疫沈降実験によって、RUNX1 は、Gadd45a のイントロン 3 内にある RUNX 結合配列を介してその転写を直接的に調節していることが明らかとなった。また、RUNX1 と p53 は Gadd45a の転写を協調的に活性化することもわかった。

Gadd45a は DNA 修復反応に関わっていることから、AML1 点突然変異は、Gadd45a の機能抑制を通して HSPC の DNA 修復能を低下させ、MDS/AML 発症につながる付加的遺伝子異常の発生を惹起する可能性が考えられた。さらに、AML1 変異と DNA 修復応答についての解析を進めたところ、AML1dC 導入 HSPC では、DNA 二重鎖切断マーカーである γ H2AX の蓄積が対照細胞と比較して有意に亢進していることが分かった。AML1dC 導入 HSPC における γ H2AX の蓄積亢進は、定常状態および放射線照射による DNA 損傷誘導後の両条件において観察された (図: DNA 損傷負荷後の、造血幹/前駆細胞における γ H2AX の蓄積)。

DNA 損傷の蓄積の亢進は、遺伝子変異の発生を惹起することで悪性腫瘍の発症を導くことが知られている。本研究において得られた結果より、AML1 の機能欠失型変異体は HSPC における DNA 損傷応答を低下させることで付加的遺伝子変異の発生を誘導し、MDS や AML の発症へと導く可能性が考えられた。

図: RUNX1dC 導入造血幹細胞では、ガンマ線照射 6 時間後の DNA 二重鎖切断 (γ H2AX) の蓄積が増強している。



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 8 件)

- ① Shibata M, Ezoe S, Oritani K, Matsui K, Tokunaga M, Fujita N, Saito Y, Takahashi T, Hino M, Matsumura I, and Kanakura Y. Predictability of the response to tyrosine kinase inhibitors via in vitro analysis of Bcr-Abl phosphorylation. Leuk. Res. In press. (査読あり)
- ② Fujita J, Mizuki M, Otsuka M, Ezoe S, Tanaka H, Satoh Y, Fukushima K, Tokunaga M, Matsumura I, and Kanakura Y. Myeloid neoplasm-related gene abnormalities differentially affect dendritic cell differentiation from murine hematopoietic stem/progenitor cells. Immunol. Lett. 136:61-73,2011. (査読あり)
- ③ Tokunaga M, Ezoe S, Tanaka H, Satoh Y, Fukushima K, Matsui K, Shibata M, Tanimura A, Oritani K, Matsumura I, and Kanakura Y. BCR-ABL but not JAK2 V617F inhibits erythropoiesis through the Ras signal by inducing p21CIP1/WAF1. J. Biol. Chem. 285:31774-31782,2010. (査読あり)
- ④ Ishikawa J, Maeda T, Matsumura I, Ujiie H, Masaie H, Nakazawa T, Mochizuki N, Kishino S, and Kanakura Y. Antifungal activity of micafungin in serum. Antimicrob. Agents Chemother. 53:4559-4562,2009. (査読あり)
- ⑤ Yokota T, Oritani K, Butz S, Kokame K, Kincade P, Miyata T, Vestweber D, and Kanakura Y. The endothelial antigen ESAM marks primitive hematopoietic progenitors throughout life in mice. Blood. 113:2914-2923,2009. (査読あり)
- ⑥ Fukushima K, Matsumura I, Ezoe S, Tokunaga M, Yasumi M, Satoh Y, Shibayama H, Tanaka H, Iwama A, and Kanakura Y. FIP1L1-PDGFRalpha imposes eosinophil lineage commitment on hematopoietic stem/progenitor cells. J. Biol. Chem. 284:7719-7732,2009. (査読あり)
- ⑦ Satoh Y, Matsumura I, Tanaka H, Ezoe S, Fukushima K, Tokunaga M, Yasumi M, Shibayama H, Mizuki M, Era T, Okuda T, and Kanakura Y. AML1/RUNX1 Works as a Negative Regulator of c-Mpl in Hematopoietic Stem Cells. J. Biol. Chem. 283:30045-30056, 2008. (査読あり)
- ⑧ Yokota T, Oritani K, Garrett KP, Kouro T, Nishida M, Takahashi I, Ichii M, Satoh Y, Kincade PW, and Kanakura Y. Soluble frizzled-related protein 1 is estrogen inducible

in bone marrow stromal cells and suppresses the earliest events in lymphopoiesis. J. Immunol. 181:6061-6072,2008. (査読あり)

[学会発表] (計 7 件)

- ① 佐藤友亮 リンパ球の初期分化誘導分子の探索と機能解析、第 16 回血液科学セミナー (招待講演)、2010.10.23. 京王プラザホテル (東京)
- ② Yusuke Satoh, C-terminal mutation of RUNX1 deteriorates DNA damage-repair response and promotes the development of AML. The 17th international RUNX workshop. 2010.07.14. オリエンタルホテル広島 (広島)
- ③ 佐藤友亮 RUNX1 変異と DNA 損傷修復経路の異常、第 8 回先端血液学セミナー (招待講演)、2010.5.29. ホテルニューオータニ東京 (東京)
- ④ Yusuke Satoh, C-Terminal Mutation of RUNX1 Deteriorates DNA Damage-Repair Response and Promotes the Development of Acute Myeloid Leukemia. The American Society of Hematology 51st Annual meeting. 2009.12.7. ニューオリンズ
- ⑤ Yusuke Satoh, RUNX1 controls nucleotide excision repair (NER) system through transcriptional regulation of Gadd45a、第 71 回日本血液学会学術集会、2009.10.23. 国立京都国際会館 (京都)
- ⑥ 佐藤友亮 RUNX1 は Gadd45a の転写調節を介してヌクレオチド除去修復を制御する、第 68 回日本癌学会学術総会、2009.10.2. パシフィコ横浜 (神奈川)
- ⑦ Yusuke Satoh, Roles for the AML1/RUNX1 Point Mutation in the Pathogenesis of MDS/AML. The American Society of Hematology 50th Annual meeting. 2008.12.6. サンフランシスコ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 友亮 (SATO YUSUKE)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：20506307

(2) 研究分担者

金倉 譲 (KANAKURA YUZURU)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：20177489

横田 貴史 (YOKOTA TAKAFUMI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：60403200

前田 哲生 (MAEDA TETSUO)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：00403064

松村 到 (MATSUMURA ITARU)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：00294083
(H21 まで分担者として参画)