

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790669  
 研究課題名(和文) 難治性白血病マウスモデルの構築と新規治療法の開発  
 研究課題名(英文) Establishment of experimental model for leukemia to develop novel molecular therapy

## 研究代表者

合山 進 (GOYAMA SUSUMU)  
 東京大学・医学部附属病院・助教  
 研究者番号：80431849

## 研究成果の概要(和文)：

本研究では、難治性白血病遺伝子 Evi-1 を骨髄細胞に導入し、半固形培地上で長期間の培養を可能とする実験系 (colony replating assay) を確立した。この実験系を駆使して、MLL 転座型融合遺伝子により Evi-1 が活性化されること、Evi-1 が Pbx1 および Akt/mTor シグナル経路を活性化すること、Evi-1 がヒストンメチル化酵素やポリコム複合体と結合することを見出した。さらに、これらの因子の機能を阻害することにより、Evi-1 高発現白血病細胞のコロニー形成能が低下することを明らかにした。これらの結果は、難治性白血病に対する新規分子標的療法開発のための基盤となる貴重な成果と考えられる。

## 研究成果の概要(英文)：

Aberrant expression of Evi-1 has been shown as a poor-prognosis marker for acute myeloid leukemia (AML). In this study, we developed a colony replating assay to replicate Evi-1-related leukemia. Using this assay, we found several molecular mechanisms underlying Evi-1-mediated leukemogenesis as follows: (1) Evi-1 is upregulated by MLL oncoproteins. (2) Evi-1 activates Pbx1 and Akt/mTor pathway. (3) Evi-1 interacts with histone methyltransferases and polycomb complexes. Furthermore, we showed these factors are important for leukemogenic activities of Evi-1. These results provide a foundation to develop novel therapeutic strategies for AML.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：白血病、モデルマウス、新規治療法、Evi-1

1. 研究開始当初の背景

従来の化学療法の組み合わせによる白血病治療成績の改善は限界に達しており、今後は病態生理に基づいた革新的な治療法の開発が重要である。Evi-1 は難治性白血病で高頻度に活性化されている転写因子であり、白血病難治性の鍵を握る分子として注目されている。また、われわれは条件的 Evi-1 欠失マウスを用いて Evi-1 の不活性化により様々な白血病の病勢が低下することを明らかにした。したがって、Evi-1 を標的とした治療法の開発により、難治性白血病の根治が可能となる可能性がある。

2. 研究の目的

難治性白血病に対する新規分子標的療法の開発のためには、まず良い実験モデルを確立する必要がある。そこで本研究では、白血病遺伝子 Evi-1 を骨髄細胞に導入し、難治性で知られる Evi-1 関連白血病モデルの作製を試みた。さらにこれらの実験系を用いて、Evi-1 関連白血病に対する新規治療標的の探索を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 難治性白血病遺伝子 Evi-1 をレトロウイルスを用いて骨髄細胞に導入し、半固形培地上での長期間培養 (Colony replating assay) を試みた。また、Evi-1 導入骨髄細胞をレシピエントマウスに移植し、造血器腫瘍発症の有無を観察した。

(2) 様々な白血病細胞における Evi-1 の発現を調べた。また Evi-1 のプロモーター領域を用いてレポーターアッセイおよびクロマチン免疫沈降を行った。

(3) 野生型及び Evi-1 欠損を誘導した造血幹細胞の遺伝子発現プロファイルと急性骨髄性白血病症例における遺伝子発現パターンを解析し、Evi-1 の標的候補遺伝子を探索した。また、Evi-1 高発現細胞における様々なタンパクの発現や活性状態を解析し、Evi-1 によって活性化されるシグナル伝達経路を同定した。

(4) Evi-1 と様々なエピジェネティクスとの結合を手掛かりとして、Evi-1 関連白血病細胞におけるエピジェネティクス因子の役割を検討した。

4. 研究成果

(1) 難治性白血病モデルの作製

通常の骨髄細胞は培養を続けるうちに分化してコロニー形成能を失うのに対し、Evi-1 を導入した骨髄細胞は半永久的なコロニー

形成能を獲得した。転写共役因子 CtBP と結合できない Evi-1 変異はこの骨髄細胞不死化能を失っていた (図 1)。さらに、Evi-1 導入骨髄細胞を移植したレシピエントマウスは約半年の潜時を経て白血病を発症した。

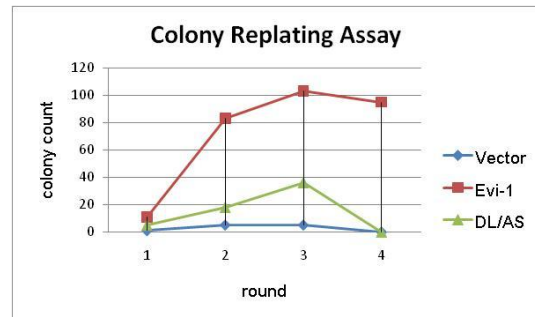


図 1: Vector 導入骨髄細胞は数回の replate 後コロニー形成能を失うが、Evi-1 を導入した骨髄細胞は 4 回目の replate 後もコロニー形成能を維持している。CtBP と結合できない変異体 (DL/AS) は、4round 目にコロニー形成能を失う。

(2) Evi-1 を活性化するメカニズムの解明

MLL 白血病細胞で Evi-1 の発現が有意に高いことを突き止めた。さらに、レポーターアッセイおよびクロマチン免疫沈降法により、MLL 転座型融合遺伝子が Evi-1 を直接活性化することを明らかにした (図 2)。この MLL による Evi-1 の活性化は造血幹細胞では顕著であるが、分化した骨髄前駆細胞では軽度であり、造血幹細胞という環境が Evi-1 の活性化に必要であることも判明した。

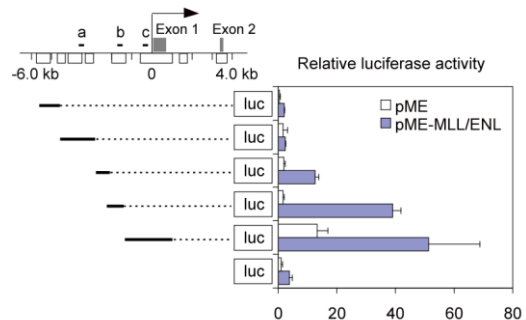


図 2. MLL 転座型融合遺伝子 MLL/ENL は、Evi-1 の上流約 2Kb のプロモーター領域を介して Evi-1 を活性化する。

(3) Evi-1 下流標的遺伝子・シグナルの同定

Evi-1 が造血系転写因子 Pbx1 (図 3) および Akt/mTor を活性化することを明らかにした。さらに、shRNA や薬剤を用いてこれらの因子を阻害することにより、Evi-1 によるコロニー形成能が低下することを示した。

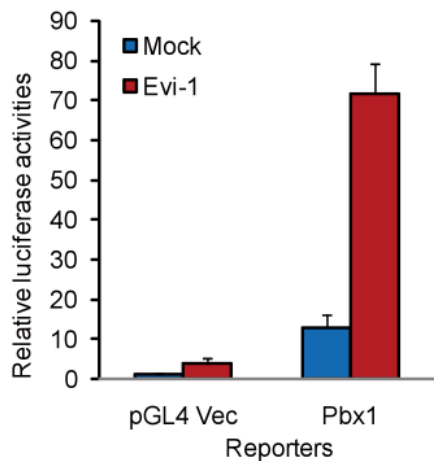


図3. Evi-1はPbx1のプロモーター領域を介してPbx1を活性化する。

(4) Evi-1 関連白血病とエピジェネティクス  
Evi-1がヒストンメチル化酵素 SUV39H1, G9a, および EZH2, BMI1 等のポリコーム複合体と結合することを見出した。さらに、shRNA を用いてこれらの遺伝子発現を抑制することにより、Evi-1によるコロニー形成能が低下することを示した。

#### 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)

(英文)

1. 合山進, 仁田英理子, 吉野哲也, 賀古真一, 渡辺-大河内直子, 島辺宗健, 今井陽一, 高橋孝喜, 黒川峰夫. Evi-1 interacts with histone methyltransferases SUV39H1 and G9a for transcriptional repression and bone marrow immortalization. *Leukemia*, 査読有, 24(1), 2010, 81-88.

2. 島辺宗健, 合山進, 渡辺-大河内直子, 吉見昭英, 市川幹, 今井陽一, 黒川峰夫. Pbx1 is a downstream target of Evi-1 in hematopoietic stem/progenitors and leukemic cells. *Oncogene*, 査読有, 28(49), 2009, 4364-4374.

3. 合山進, 黒川峰夫. Pathogenetic significance of ecotropic viral integration site-1 in hematological malignancies. *Cancer Science*, 査読有, 100(6), 2009, 990-995.

4. 合山進, 山本豪, 島辺宗健, 佐藤智彦, 市川幹, 小川誠司, 千葉滋, 黒川峰夫. Evi-1 is a critical regulator for hematopoietic stem cells and transformed leukemic cells. *Cell Stem Cell*, 査読有, 3(2), 2008, 207-220.

(和文)

5. 合山進, 黒川峰夫, 正常および白血病幹細胞における Evi-1 の機能, *Annual review 血液*, 査読無, 2010, 22-28.

6. 合山進, Evi-1 による造血幹細胞制御と白血病発症機構, *Trends in Hematological Malignancies*, 査読無, 1(2), 2009, 70-73.

7. 合山進, 黒川峰夫, Evi-1 による造血幹細胞制御と白血病発症, *血液・腫瘍科*, 査読無, 58(3), 2009, 354-360.

8. 合山進, 黒川峰夫, 転写因子と血液疾患, *BioClinica*, 査読無, 23(12), 2008, 19-25.

[学会発表] (計18件)

(国際学会)

1. 合山進, 島辺宗健, 黒川峰夫. Function of Evi-1 as a leukemia-related transcription factor, USA-Japan Cooperative Cancer Workshop, March 27-30, 2009, Hawaii, U.S.A. (Poster)

2. 合山進, 仁田英理子, 島辺宗健, 吉野哲也, 賀古真一, 市川幹, 今井陽一, 高橋強志, 半下石明, 黒川峰夫. Evi-1 Interacts with Histone Methyltransferases for Transcription Repression and Bone Marrow Transformation. 50th American Society of Hematology Annual Meeting. December 6-9, 2008, San Francisco, U.S.A. (Poster)

3. 荒井俊也, 合山進, 島辺宗健, 市川幹, 今井陽一, 高橋強志, 半下石明, 黒川峰夫. Evi-1 Is a Direct Target of MLL Oncoproteins in Hematopoietic Stem Cells. 50th American Society of Hematology Annual Meeting. December 6-9, 2008, San Francisco, U.S.A. (Poster)

4. 島辺宗健, 合山進, 市川幹, 今井陽一, 高橋強志, 半下石明, 黒川峰夫. Pbx-1 Is a Direct Target of Evi-1 in Hematopoietic Stem/Progenitors and Leukemic Cells. 50th American Society of Hematology Annual Meeting. December 6-9, 2008, San Francisco, U.S.A. (Poster)

(国内学会)

5. 吉見昭秀, 渡辺-大河内直子, 合山進, 南谷泰仁, 仁田英里子, 荒井俊也, 佐藤智彦, 島辺宗健, 中川正宏, 今井陽一, 北村俊雄, 黒川峰夫. Evi-1 Represses PTEN Transcription and Activates AKT/mTOR Through Interaction with Polycomb Repressor complexes, 第71回日本血液学会総会, 2009年10月24日, 京都。(口演)

6. 吉見昭秀, 渡辺-大河内直子, 合山進, 南谷泰仁, 仁田英里子, 荒井俊也, 佐藤智彦, 島辺宗健, 中川正宏, 今井陽一, 北村俊雄, 黒川峰夫. Evi-1 はポリコーム群を介して PTEN の転写抑制し AKT/mTOR シグナルを活性化する 第68回日本癌学会学術総会, 2009

年 10 月 3 日、横浜。(口演)

7. 合山進、佐藤智彦、荒井俊也、島辺宗健、黒川峰夫. 難治性白血病遺伝子 Evi-1 の分子生物学的機能解析、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 1 日、横浜。(口演)

8. 合山進. Evi-1 による造血幹細胞制御と白血病発症機構、第 5 回麒麟塾、2009 年 7 月 18 日、東京。(口演)

9. 合山進. Evi-1 による造血幹細胞制御と白血病発症機構、第 7 回先端血液学セミナー、2009 年 6 月 13 日、東京。

10. 佐藤智彦、合山進、黒川峰夫. Evi-1 による胎生期造血の制御機構、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 9 日～12 日、神戸。(口演)

11. 合山進、仁田英里子、島辺宗健、吉野哲也、市川幹、今井陽一、高橋強志、黒川峰夫、白血病標的遺伝子 Evi-1 によるヒストンメチル化修飾を介した転写制御機構、第 70 回日本血液学会総会、2008 年 10 月 11 日、京都。(口演)

12. 島辺宗健、合山進、市川幹、今井陽一、高橋強志、半下石明、黒川峰夫. 白血病標的遺伝子 Evi-1 による PBX-1 の発現制御機構、第 70 回日本血液学会総会、2008 年 10 月 11 日、京都。(口演)

13. 荒井俊也、合山進、島辺宗健、市川幹、今井陽一、高橋強志、半下石明、黒川峰夫. MLL 融合遺伝子による Evi-1 の発現制御機構 第 70 回日本血液学会総会、2008 年 10 月 11 日、京都。(口演)

14. 西本菜穂子、市川幹、中川正弘、合山進、高橋強志、今井陽一、黒川峰夫. Regulation of hematopoietic stem cell activity and leukemogenesis by AML1, 第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月 28 日、名古屋。(口演)

15. 島辺宗健、合山進、市川幹、今井陽一、高橋強志、半下石明、黒川峰夫. Evi-1 up-regulates transcription of the PBX-1 gene in hematopoietic cells. 第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月 28 日、名古屋。(口演)

16. 荒井俊也、合山進、島辺宗健、市川幹、今井陽一、高橋強志、半下石明、黒川峰夫: Evi-1 is up-regulated by MLL oncoproteins selectively in hematopoietic cells. 第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月 28 日、名古屋。(口演)

17. 合山進、仁田英里子、島辺宗健、市川幹、今井陽一、高橋強志、半下石明、黒川峰夫. Functional and physical interaction between oncogenic transcriptional factor Evi-1 and histone methyltransferases. 第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月 28 日、名古屋。(口演)

18. 合山進、黒川峰夫. Evi-1 によるヒストンメチル化修飾異常を介した白血病発症機構. 第 12 回がん分子標的治療研究会学術総会、2008 年 6 月 26-27 日、東京。(ポスター)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

合山 進 (GOYAMA SUSUMU)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 80431849