

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790670

研究課題名（和文）AML1 標的遺伝子群の白血病における機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of AML1-target genes in hematological malignancy.

研究代表者

中川 正宏 (NAKAGAWA MASAHIRO)

東京大学・医学部附属病院 助教

研究者番号：10431850

研究成果の概要（和文）：AML1 はヒトの白血病において最も高頻度に遺伝子異常の標的となる標的の一つである。われわれが未分化造血細胞において明らかにした新規 AML1 標的シグナルである、NF- κ B シグナルの造血器悪性腫瘍での機能を解析した。AML1 は NF- κ B シグナルを抑制するが、造血器悪性腫瘍で認められる AML1 の変異体はその抑制能を欠いており、AML1 関連造血器腫瘍において NF- κ B シグナルが亢進しており、新たな分子標的治療候補となることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：AML1-related leukemia exhibits distinctly activated NF- κ B signaling. Inhibition of the NF- κ B pathway in the leukemic cells with mutated AML1 efficiently blocks their growth.

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	1,200,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科臨床医学・血液内科学

キーワード：血液内科学

1. 研究開始当初の背景

造血器悪性腫瘍の治療は、造血幹細胞移植術の発展により大きな改善が見られたが、移植は GVHD や感染症などの副作用も大きく、適応症例は限られている。また、通常の化学療法の治療成績も、頭打ちとなっている。一方

で、CML では、発症機構の解明と分子標的療法が確立し、標準的治療法が置き換わりつつある。しかし、その他の白血病では、多くの遺伝子異常が明らかとなっているものの、分子標的療法の確立はまだ不十分である。白血病で認められる遺伝子異常の最も頻度

が高いものの一つに、転写因子 AML1 があげられる。AML1 は急性骨髄性白血病 (AML) FAB 分類 M2 型において高頻度に見られる t(8;21) 染色体転座において発見された。その後、CML の急性転化時に認められる t(3;21) 転座、急性リンパ急性白血病 (ALL) における t(12;21) 転座等でも認められ、これらの白血病では、染色体転座により、AML1-ETO や AML1-Evi-1 などの AML1 キメラ蛋白が認められる。また、AML や骨髄異形性症候群 (MDS)、家族性血小板減少症 (FPD) などにおいて、AML1 の点突然変異も報告されており、予後不良である。

2. 研究の目的

本研究では、急性白血病での最も多い遺伝子異常の一つである、AML1 関連白血病での分子標的療法の確立を試みる。我々も含めて、これまで AML1 に関しては様々な解析が行われてきたにも関わらず、依然分子標的療法が確立できていない。そこで、本研究では、AML1 自体ではなく、AML1 の標的遺伝子をターゲットして、分子標的療法の確立を試みる。われわれはこれまで AML1 について行ってきた解析の中で、マウスの正常造血幹細胞における AML1 の標的遺伝子群を同定している。一方、白血病においても、幹細胞が重要であると考えられるようになっており、これらの遺伝子群が、AML1 関連白血病における、鍵分子ではないかと考え、白血病細胞における機能解析を行い治療標的となりうるかを検証する。さらには、AML1 関連以外の白血病における治療標的となりうるかについても解析を行う。

3. 研究の方法

造血幹細胞で同定された AML1 標的遺伝子群に対し、まず、AML1 関連白血病における発現を調べる。さらに、蛋白やシグナル伝達系として、活性化、もしくは抑制化されている

かを検証する。次に、その蛋白や、シグナル伝達系の阻害剤や活性化剤を用いたり、レトロウイルスによる強制発現や、siRNA による発現抑制を用いたりして機能解析を行う。いずれも、マウスモデルでの実験系と、ヒトの臨床検体での実験系とで併せて実験を行う。

4. 研究成果

われわれはこれまでに、AML1 の条件的欠失マウスを用いて、AML1 欠失直後のトランスクリプトームを、パスウェイ解析を行うことにより、炎症やがん化に関わる NF- κ B シグナルが活性化されることを見いだした。

NF- κ B は炎症や免疫、増殖において重要な役割を果たしている転写因子である。近年、その異常な亢進が種々の悪性腫瘍において報告されており、悪性腫瘍の尾治療標的として注目を集めている。炎症や増殖において重要な古典的経路と、主としてリンパ球で重要な働きをしている非古典的経路がよく知られている。古典的経路では、定常状態で NF- κ B の腫瘍構成因子である p65 は I κ B と結合して細胞質にとどまっている。TNF 等の刺激を受けると、IKK 複合体により I κ B がリン酸化を受けた後にユビキチン化されて分解される。その結果、p65 が核内に移行して、NF- κ B シグナルは活性化される。細胞株での p65 核内移行の実験系において AML1 を発現させると、p65 の核内移行は抑制された。また、NF- κ B シグナルが活性化されると p65 はリン酸化させるが、このリン酸化も AML1 の発現により阻害された。従って、AML1 は生理的には NF- κ B を抑制していると考えられた。続いて AML1 による NF- κ B 抑制の作用点を検証した。まず NF- κ B の腫瘍構成因子と AML1 の結合を調べたところ、AML1 は IKK と結合することが明らかとなった。さらに、IKK はリン酸化酵素で I κ B や p65 をリン酸化するが、インビトロキナー

ゼアッセイを行ったところ、AML1はIKKのキナーゼ活性を抑制することが明らかとなった。さらに、この結合は主に細胞質で認められた。AML1は核内転写因子として知られているが、本研究により、細胞質でNF-κBを抑制するという全く新しい機能を明らかにすることができた。

続いて、造血器腫瘍で認められるAML1の変異体や融合タンパクのNF-κB抑制機能を検証した。骨髄異形成症候群で同定されたC末端欠失変異体であるS291fsX300や、急性骨髄性白血病で広く認められるAML1/ETO融合蛋白はp65の核内移行抑制能力を欠き、IKKのキナーゼ活性抑制能力も欠いていた。さらに、S291fsX300をマウス骨髄細胞に導入して不死化させた細胞はNF-κB阻害剤に高い感受性を示した。このS291fsX300を用いたマウスモデルにNF-κB阻害剤を投与したところ、生存期間が優位に延長した。AML1/ETOを発現しているヒト白血病細胞はNF-κB阻害剤に高い感受性を示した。さらに、*in silico*解析により、ヒトAML1関連白血病でもNF-κBシグナルが亢進することを見いだした、これらの研究により、AML1関連白血病の有望な治療標的としてNF-κBシグナル分子がもたらされ、今後の発展が期待される。

さらにわれわれは、*in silico*解析の結果、AML1関連白血病以外にも、NF-κBシグナルが亢進している症例の集団を同定した。これらの症例は予後不良であり、NF-κB阻害剤の適応となる症例の層別化に道を開くものと考えられ、今後さらに解析を進める予定である。

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)

[学会発表] (計8件)

① Nakagawa M, Shimabe M, Nishimoto N, Watanabe-Okochi N, Ichikawa M, Nannya Y, Imai Y, and Kurokawa M. AML1/Runx1 is a cytoplasmic attenuator of NF-κB signaling: implication in pathogenesis and targeted therapy of AML1-related leukemia. Keystone symposia “New Paradigms in Cancer Therapeutics” 2010/3/25, Victoria, Canada

② Nakagawa M, Shimabe M, Nishimoto N, Watanabe-Okochi N, Ichikawa M, Nannya Y, Imai Y, and Kurokawa M. AML1/Runx1 is a cytoplasmic attenuator of NF-κB signaling: implication in pathogenesis and targeted therapy of AML1-related leukemia. The American Society of Hematology 51th Annual Meeting, 2009/12/5, New Orleans, USA

③ Nakagawa M, Imai Y, Nishimoto N, Ichikawa M, and Kurokawa M. Critical regulation of NF-κB signaling by AML1/Runx1 in normal and malignant hematopoietic cells. The 2009 International RUNX Meeting 2009/8/19, Oxford, UK

④ 中川正宏, 今井陽一, 西本菜穂子, 市川幹, 黒川峰夫. AML1/Runx1によるNF-κBシグナルの制御, 第71回日本血液学会学術集会, 2009/10/24, 京都

⑤ 中川正宏, 今井陽一, 西本菜穂子, 市川幹, 黒川峰夫. AML1/Runx1によるNF-κBシグナルの制御. 第68回日本癌学会学術総会, 2009/10/1, 横浜

⑥ 中川正宏, 今井陽一, 黒川峰夫. 白血病関

連転写因子AML1/Runx1によるNF- κ Bシグナルの制御. 第13回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2009/6/25, 徳島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川正宏 (NAKAGAWA MASAHIRO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 10431850