

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21790913

研究課題名（和文） ETV6/FLT3 融合遺伝子による造血器悪性腫瘍 発症機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of the role of ETV6/FLT3 in oncogenesis,
using a murine bone marrow transduction model

研究代表者

菱澤 方勝 (HISHIZAWA MASAKATSU)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：90444455

研究成果の概要（和文）：

我々は、骨髄増殖性疾患(MPD)と前駆T細胞リンパ芽球性リンパ腫(T-LBL)を合併した患者の腫瘍細胞から、新規のETV6/FLT3融合遺伝子を同定した。ETV6/FLT3の腫瘍化における役割を解明するため、マウスの骨髄移植モデルを用いて解析したところ、ETV6/FLT3は移植したマウス全例で早期にMPDを発症し、さらに腫瘍化においてGrb2-Gab2のシグナル伝達経路が重要であることが示された。

研究成果の概要（英文）：

We identified a novel ETV6/FLT3 variant fusion transcript in myeloproliferative disease (MPD) with T-lymphoblastic leukemia/lymphoma (T-LBL). To investigate the role of ETV6/FLT3 fusion gene in oncogenesis, we used a murine bone marrow transplant model. ETV6/FLT3 induced a rapidly fatal MPD in primary recipient mice. We demonstrated that the Grb2-Gab2 pathway plays an important role in oncogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2000000	600000	2600000
2010年度	1300000	390000	1690000
年度			
年度			
年度			
総計	3300000	990000	4290000

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

1. 研究開始当初の背景

FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3)は class III receptor tyrosine kinase であり、造血器悪性疾患ではしばしば認められる。代表的

な遺伝子変異は、活性型変異である internal tandem duplication (ITD)であり、急性骨髄性白血病の約30%にFLT3-ITDは認められ、予後とも関連する。

我々は、骨髄増殖性疾患 (Myeloproliferative disease: MPD) に前駆T細胞リンパ芽球性リンパ腫 (T-lymphoblastic lymphoma: T-LBL) を合併した患者の腫瘍細胞から t(12;13)(p13;q12) 転座を同定した。さらに、この染色体相互転座から ETS variant gene 6 (ETV6; TEL) と FLT3 の融合遺伝子 ETV6/FLT3 が確認された (図 1)。この染色体転座は、これまで一例の MPD で報告されているが、腫瘍化における役割についての詳細は解明されていない。

2. 研究の目的

活性型の FLT3 による腫瘍発症機構を ETV6/FLT3 融合遺伝子を用いて解明することを試みた。患者の細胞からこの融合遺伝子を単離し、マウスの骨髄移植モデルを用いて解析をおこなった。

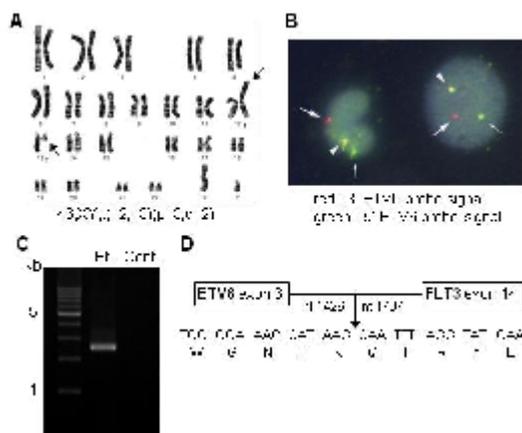


図 1. ETV6/FLT3 の同定
A 染色体解析 B FISH(ETV6) 解析 C. D. RT-PCR およびシーケンスによる検出

3. 研究の方法

マウスの骨髄を 5-FU で処理し、レトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入して、放射線照射した同系マウスに移植した。In vitro の解析は、Ba/F3 細胞株に遺伝子導入しておこなった。また、Grb2 との関連を検討するために、Gab2 ノックアウトマウスを使用した。

4. 研究成果

ETV6/FLT3 を遺伝子導入した骨髄を移植すると、全例のマウスが早期に MPD となり (生存中央値 18 日)、この融合遺伝子のみで腫瘍化

することが明らかになった (図 2)。さらに、この融合遺伝子の ETV6 領域にある helix-loop-helix (HLH) domain の deletion mutant や FLT3 領域に含まれる tyrosine kinase の inactive mutant では腫瘍化せず、oligomerization および kinase が MPD の発症に必須であることが示された。

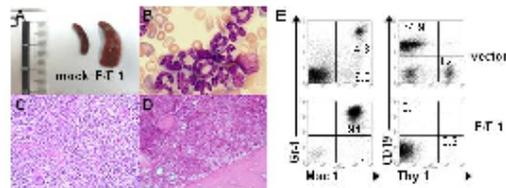


図 2 ETV6/FLT3 によりマウスに発症した骨髄増殖性疾患 ETV6/FLT3 を遺伝子導入した骨髄を移植したマウスでは、脾腫や骨髄での骨髄球系細胞の過形成がみられ、腫瘍細胞は Gr-1 と Mac-1 が陽性であった。

FLT3-ITD では、tyrosine 残基の 589 および 591 を介した Stat5 の活性化が腫瘍化に重要である。しかし、ETV6/FLT3 融合遺伝子ではこの tyrosine の変異 (Y589/591F) を移植したマウスでも早期に MPD となり、Stat5 のリン酸化などシグナル伝達における差も認められなかった。

一方、この融合遺伝子は ETV6 領域に 2 ヶ所 (Y314/354)、FLT3 領域に 3 ヶ所 (Y768/955/969) の Grb2 結合部位の候補がある。この結合部位の mutant によって Stat5, Erk1/2, Akt などのリン酸化が阻害された (図 3)。

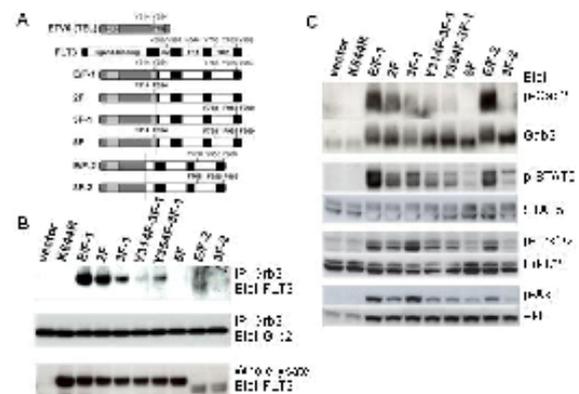


図 3 ETV6/FLT3 の Grb2 によるシグナル伝達
A. 実験に用いた mutant B. 免疫沈降による

Grb2 の結合の確認 C. Grb2 結合部位の mutant では Stat5, Erk1/2, Akt などのリン酸化が阻害された。

Mutant を用いて、マウスの骨髄移植をおこなうと 5ヶ所すべての tyrosine を置換したものは、腫瘍化が遅延した(図 4)。さらに、Gab2 ノックアウトマウスを用いた骨髄移植では ETV6/FLT3 による MPD の発症は減弱した(図 5)。

このように、本研究によって ETV6/FLT3 融合遺伝子では Grb2-Gab2 シグナルが腫瘍化に関与しており、FLT3 による腫瘍発症におけるこの経路の重要性が示唆された。

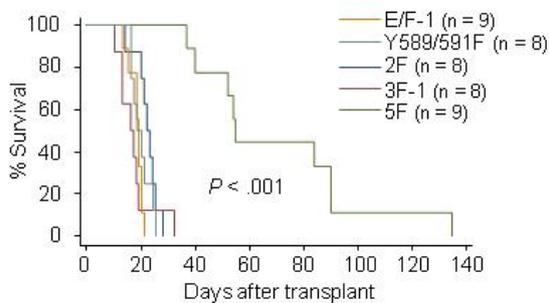


図 4 Grb2 結合部位の変異による骨髄増殖性疾患発症阻害

ETV6 および FLT3 にある Grb2 結合部位 5 個すべての変異(5F)によって骨髄増殖性疾患の発症は遅延した。

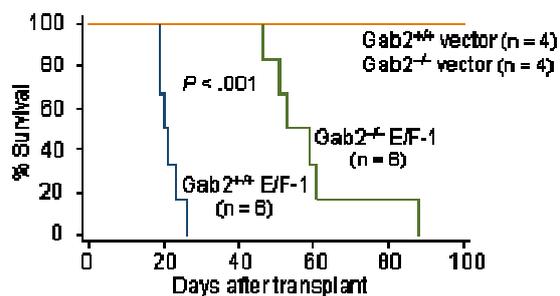


図 5 Gab2 ノックアウトマウスによる骨髄移植

Gab2 ノックアウトマウスの骨髄を用いると ETV6/FLT3 による骨髄増殖性疾患の発症は遅延した。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

Kazuhisa Chonabayashi, Masakatsu Hishizawa, Shin Kawamata, Masashi Matsui, Tatsuharu Ohno, Takayuki Ishikawa and Takashi Uchiyama. Direct Binding of Grb2 Is Required for Efficient Induction of Myeloproliferative Disease in Mice by ETV6/FLT3. 51th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, 2009 年 12 月 5-8 日, New Orleans, USA.

Kazuhisa Chonabayashi, Masakatsu Hishizawa, Takayuki Ishikawa and Takashi Uchiyama. Efficient and rapid induction of myeloproliferative disorder (MPD) by ETV6/FLT3 fusion gene using a murine bone marrow transplant model. 第 68 回日本癌学会学術総会, 2009 年 10 月 1-3 日, 横浜.

Kazuhisa Chonabayashi, Masakatsu Hishizawa, Shin Kawamata, Tatsuharu Ohno, Takayuki Ishikawa and Takashi Uchiyama. ETV6/FLT3 fusion gene induces a fatal myeloproliferative disorder in a murine bone marrow transplantation model. 第 71 回日本血液学会学術総会, 2008 年 10 月 23-25 日, 京都.

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菱澤 方勝 (HISHIZAWA MASAKATSU)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号 : 90444455

研究者番号 :

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし