

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591162

研究課題名（和文） MLL融合蛋白による腫瘍化過程の解明と新規治療法の開発

研究課題名（英文） Developmental impact of MLL-AF4 fusion gene on early hematopoietic stem cells

研究代表者

江口 真理子 (Eguchi Mariko)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40420781

研究成果の概要（和文）：

MLL融合蛋白による造血細胞分化への影響を調べるために、MLL-AF4融合遺伝子を恒常的に発現するマウスES細胞を作製した。MLL-AF4を発現するマウスES細胞は、造血細胞への分化過程で造血幹細胞を含む分画であるTie2陽性かつc-kit陽性分画への分化が抑制されていた。遺伝子発現アレイ解析では、MLL-AF4は造血細胞への分化に作用する遺伝子群の発現を低下させ、逆に間葉系細胞への分化に作用する遺伝子群の発現を上昇させていた。MLL-AF4発現細胞を免疫不全マウスに移植しても白血病は発症せず、白血病化には何らかの付加的異常が必要であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

To study the developmental impact of MLL-AF4 fusion gene on early hematopoietic development, mouse embryonic stem (ES) cells with constitutive expression of MLL-AF4 were established. When hematopoietic differentiation was examined by embryoid body (EB) formation, Tie2⁺c-kit⁺ cells which contain early hematopoietic stem cells were significantly reduced in MLL-AF4 expressing EBs compared to that of control EBs. Expression array analysis indicated that MLL-AF4 works as positive regulator of gene expression up-regulating various genes. Several genes up-regulated by MLL-AF4 were known to have important roles in cell differentiation to mesenchymal lineage, whereas transcriptional regulator of hematopoietic lineage were down-regulated. These MLL-AF4 expressing pre-hematopoietic stem cells with mesenchymal nature, were unable to cause leukemia *in vitro* or *in vivo*, showing that some secondary event is necessary to cause leukemia. MLL-AF4, having the potential to influence early hematopoietic cell differentiation, may cause leukemic transformation when accompanied by some important additional genetic events.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

染色体 11q23 に位置する MLL 遺伝子は 40 以上の転座相手と融合遺伝子を形成する。MLL 転座型白血病は乳児白血病の 80%、TopoII 阻害剤を用いた癌の化学療法後に発症する治療関連白血病の大部分に認められ、いずれも治療抵抗性である。

乳児の MLL 転座型白血病は、全国規模の乳児白血病共同研究(代表石井榮一)において、FISH 法による MLL 遺伝子再構成の早期診断と、早期の骨髄移植を含む強力な治療でその長期予後を著明に改善し得た。しかし長期生存率はなお 50%未満で、治癒後も晩期障害に苦しむ例が多く、患者の生命予後および Quality of Life の改善のためには新たな分子標的療法が必要である。

MLL 融合遺伝子をレトロウイルスで造血細胞に導入すると自己複製能が亢進し、リプレティングアッセイにて造血コロニーが異常に増加する。またこの造血細胞を免疫不全マウスに移植すると、白血病を発症する。転座相手にかかわらず多くの MLL 融合蛋白でこの自己複製能亢進が認められる。MLL-AF9 ノックインマウスは早期に白血病を発症しないことから MLL 融合遺伝子以外の付加的遺伝子変異が白血病発症に必要と考えられている。一方レトロウイルスにより MLL 融合遺伝子を導入すると、極めて早期に腫瘍化した造血細胞が得られる。この差は後者ではレトロウイルスベクターのゲノムへの組み込みによる近傍遺伝子の活性化が付加的遺伝子異常として作用していると考えられている。すなわち、MLL 融合蛋白による腫瘍化には付加的遺伝子異常が必要と考えられ、新規治療法や予防法の開発には付加的遺伝子異常の解明が必要である。

一方、MLL-AF4 では同様の方法で腫瘍モデルを作製することが難しく、腫瘍化メカニズムに何らかの違いがあると考えられているが、詳細は不明である。

2. 研究の目的

本研究では分子標的となりうる MLL 融合蛋白による腫瘍化のメカニズムを明らかにし、新たな分子標的療法の開発につながる基礎データを得ることを目的とした。特に乳児白血病で高頻度に認められ、病態が明らかになっていない MLL-AF4 を中心に検討した。

3. 研究の方法

(1) MLL-AF4 融合遺伝子を発現するマウス ES 細胞の作製

Chicken-beta-actine (CAG) プロモーター下に MLL-AF4 を発現する発現ベクターを作製し、マウス ES 細胞に導入、MLL-AF4 を恒常的に発現するマウス ES 細胞を作製した。

(2) MLL-AF4 が造血細胞分化に与える影響の検討

MLL-AF4 を発現するマウス ES 細胞を造血細胞へ分化させ、その表現型を解析することにより、MLL-AF4 の造血細胞分化における影響を検討した。また発現アレイなどを用いて、造血細胞分化の過程で MLL-AF4 により発現が変化する標的遺伝子の同定を試みた。

(3) MLL-AF4 転座型白血病の付加的遺伝子異常の同定

MLL-AF4 を発現する ES 細胞を血液前駆細胞に分化させ、インサートを持たないレトロウイルスベクターを導入後免疫不全マウスに移植した。白血病を発症したマウスの白血病細胞を分離し DNA を抽出、inverse PCR 法でレトロウイルスの挿入部位を同定し、近傍に存在する付加的遺伝子異常の候補遺伝子の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) MLL-AF4 融合遺伝子を発現するマウス ES 細胞の作製

Chicken-beta-actine (CAG) プロモーター下に MLL-AF4 を恒常的に発現するマウス ES 細胞を作製した。MLL-AF4 は未分化 ES 細胞の未分化能の維持および増殖能に影響を与えなかった。

(2) MLL-AF4 が造血細胞分化に与える影響の検討

MLL-AF4 を発現する未分化 ES 細胞は Fik1 陽性細胞への分化が阻害されており、Fik1 陽性細胞より派生する造血細胞への分化も抑制されていた。造血細胞への分化が抑制される代わりに、Pdgfra

図1 MLL-AF4による中胚葉細胞の分化の偏り (分化開始5日後)

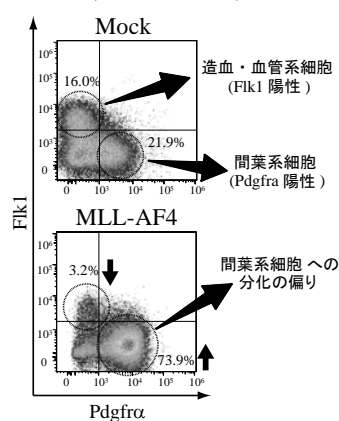
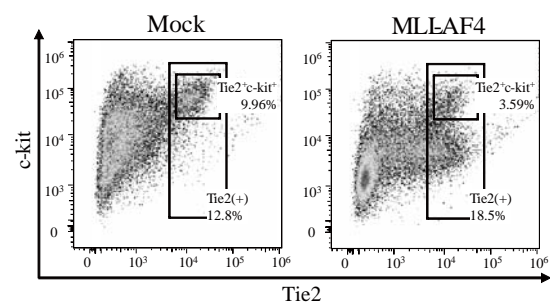
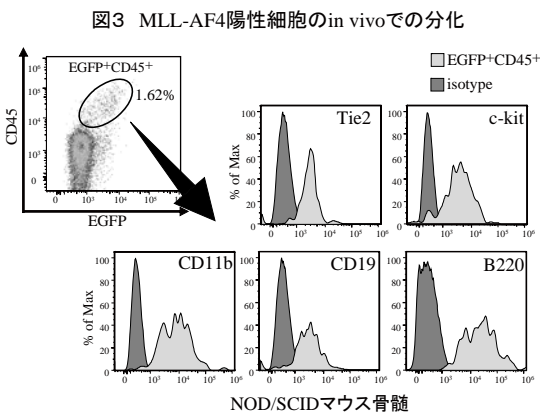


図2 MLL-AF4はTie2+/c-kit+分画への分化を抑制する (分化開始6日後)



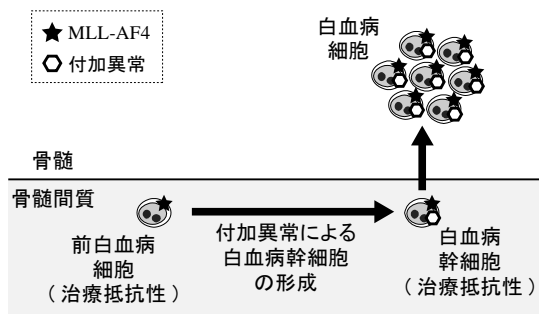
陽性の間葉系細胞の方向へ分化が進む傾向が認められた(図1)。また未分化な造血幹細胞を含む細胞分画である Tie2 陽性かつ c-kit 陽性の分画も MLL-AF4 を発現する細胞では減少していた(図2)。

MLL-AF4 発現 ES 細胞を collagen I 等でコートした培養ディッシュで培養すると 2-3 週間程度で CD45 陽性の造血細胞が出現することから、MLL-AF4 発現 ES 細胞の造血細胞への分化能は完全に喪失しているのではなく、適度な条件下では造血細胞へ分化する能力を有していることが示された。また MLL-AF4 発現 ES 細胞を Tie2 陽性細胞へ分化させ、EGFP でマーキングした後に免疫不全マウス(NOD/SCID)に移植することにより、in vivo での CD45 陽性の造血細胞への分化も認められた(図3)。



これらの結果から、MLL-AF4 を発現するマウス ES 細胞は間葉系細胞への分化傾向を有するが、未分化 B 細胞への分化能も保持しており、この細胞に何らかの“2nd hit“が入ることで血液細胞への分化が起こり、白血病化をきたすのではないかと考えられた。すなわち MLL-AF4 の標的細胞は、血液幹細胞よりさらに未熟な間葉系細胞である可能性が示唆された(図4)。

図4 MLL-AF4陽性白血病細胞の進展



(3) MLL-AF4 転座型白血病の付加的遺伝子異常の同定

MLL-AF4 による白血病化に必要な付加的遺伝子異常を同定するために、MLL-AF4 発現 ES 細胞を Tie2 陽性細胞に分化させた段階でレトロウイルスベクターを導入、ゲノムに

ランダムに挿入させた後に免疫不全マウスに移植した。本研究期間中には全ての結果を解析できなかったが、現在までのところ免疫不全マウスに明らかな白血病の発症は認めず、今後の継続した検討を必要とすると思われる。

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 14 件)

1. M. Nishi, M. Eguchi-Ishimae, Z. Wu, W. Gao, H. Iwabuki, S. Kawakami, H. Tauchi, T. Inukai, K. Sugita, Y. Hamasaki, E. Ishii and M. Eguchi, "Suppression of the let-7b microRNA pathway by DNA hypermethylation in infant acute lymphoblastic leukemia with MLL gene rearrangements.", *Leukemia*, 査読あり、27 巻 2 号、389-397 頁、2013 年
2. 徳田桐子、河上早苗、江口真理子、石前峰 査、本田美里、田内久道、石井榮一、同種造血幹細胞移植後にドナー細胞由来の骨髓異形成症候群/急性骨髄性白血病を発症した小児白血病の検討、*日本小児血液・がん学会雑誌*、査読あり、印刷中、2013 年
3. T. Asano, K. Kogawa, A. Morimoto, Y. Ishida, N. Suzuki, S. Ohga, K. Kudo, S. Ohta, H. Wakiguchi, K. Tabuchi, S. Kato and E. Ishii, "Hemophagocytic lymphohistiocytosis after hematopoietic stem cell transplantation in children: a nationwide survey in Japan.", *Pediatr Blood Cancer*, 査読あり、59 巻 1 号、110-114 頁、2012 年
4. H. Kanegane, X. Yang, M. Zhao, K. Yamato, M. Inoue, K. Hamamoto, C. Kobayashi, A. Hosono, Y. Ito, Y. Nakazawa, K. Terui, K. Kogawa, E. Ishii, R. Sumazaki and T. Miyawaki, "Clinical features and outcome of X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 (SAP deficiency) in Japan identified by the combination of flow cytometric assay and genetic analysis.", *Pediatr Allergy Immunol*, 査読あり、23 巻 5 号、488-493 頁、2012 年
5. K. Nagai, T. Ochi, H. Fujiwara, J. An, T. Shirakata, J. Mineno, K. Kuzushima, H. Shiku, J. J. Melenhorst, E. Gostick, D. A. Price, E. Ishii and M. Yasukawa, "Aurora kinase A-specific T-cell receptor gene transfer redirects T lymphocytes to display effective antileukemia reactivity.", *Blood*, 査読あり、119 巻 2 号、368-376 頁、2012 年
6. N. Shiba, M. J. Park, T. Taki, J. Takita, M. Hiwatari, T. Kanazawa, M. Sotomatsu, E.

- Ishii, H. Arakawa, S. Ogawa and Y. Hayashi, "CBL mutations in infant acute lymphoblastic leukaemia.", *Br J Haematol*, 査読あり, 156 巻 5 号, 672-674 頁, 2012 年
7. M. Ohta, M. Eguchi-Ishimae, M. Ohshima, H. Iwabuki, K. Takemoto, K. Murao, T. Chisaka, E. Yamamoto, T. Higaki, K. Isoyama, M. Eguchi and E. Ishii, "Novel dominant-negative mutant of GATA3 in HDR syndrome.", *J Mol Med (Berl)*, 査読あり, 89 巻 1 号, 43-50 頁, 2011 年
 8. Y. Murata, T. Yasumi, R. Shirakawa, K. Izawa, H. Sakai, J. Abe, N. Tanaka, T. Kawai, K. Oshima, M. Saito, R. Nishikomori, O. Ohara, E. Ishii, T. Nakahata, H. Horiuchi and T. Heike, "Rapid diagnosis of FHL3 by flow cytometric detection of intraplatelet Munc13-4 protein.", *Blood*, 査読あり, 118 巻 5 号, 1225-1230 頁, 2011 年
 9. A. Hamidah, M. Reena, A. R. Halim, S. Ibrahim, M. Eguchi, A. L. Zarina, K. N. Norazlin, R. Jamal and H. Kanegane, "Successful treatment of very large congenital infantile fibrosarcoma.", *Pediatr Int*, 査読あり, 53 巻 5 号, 768-770 頁, 2011 年
 10. M. Zhao, H. Kanegane, C. Kobayashi, Y. Nakazawa, E. Ishii, M. Kasai, K. Terui, Y. Gocho, K. Imai, J. Kiyasu, S. Nonoyama and T. Miyawaki, "Early and rapid detection of X-linked lymphoproliferative syndrome with SH2D1A mutations by flow cytometry.", *Cytometry B Clin Cytom*, 査読あり, 80 巻 1 号, 8-13 頁, 2011 年
 11. 江口真理子, 石前峰齋 小児白血病と TEL 遺伝子異常, *臨床血液*, 査読なし, 52 巻, 686-694 頁, 2011 年
 12. A. Morimoto, Y. Ishida, N. Suzuki, S. Ohga, Y. Shioda, Y. Okimoto, K. Kudo and E. Ishii, "Nationwide survey of single-system single site Langerhans cell histiocytosis in Japan.", *Pediatr Blood Cancer*, 査読あり, 54 巻 1 号, 98-102 頁, 2010 年
 13. K. Nagai, K. Yamamoto, H. Fujiwara, J. An, T. Ochi, K. Suemori, T. Yasumi, H. Tauchi, K. Koh, M. Sato, A. Morimoto, T. Heike, E. Ishii and M. Yasukawa, "Subtypes of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan based on genetic and functional analyses of cytotoxic T lymphocytes.", *PLoS One*, 査読あり, 5 巻 11 号, e14173 頁, 2010 年
 14. K. Otsubo, H. Kanegane, M. Eguchi, M. Eguchi-Ishimae, K. Tamura, K. Nomura, A. Abe, E. Ishii and T. Miyawaki, "ETV6-ARNT fusion in a patient with childhood T lymphoblastic leukemia.", *Cancer Genet Cytogenet*, 査読あり, 202 巻 1 号, 22-26 頁, 2010 年
- [学会発表] (計 16 件)
1. 徳田桐子, 河上早苗, 手束真理, 田内久道, 石前峰齋, 江口真理子, 石井榮一, 播種性病変を認めた Desmoplastic infantile astrocytoma の 1 例. 第 54 回日本小児血液・がん学会, 横浜, 2012 年 11 月 30 日
 2. 中野直子, 越智史博, 永井功造, 八角高裕, 河上早苗, 石前峰齋, 江口真理子, 田内久道, 石井榮一, Munc13-4 ミスセンス変異による学童期発症 FHL3 型の症例. 第 54 回日本小児血液・がん学会, 横浜, 2012 年 11 月 30 日
 3. 石前峰齋, 江口真理子, 石井榮一, Developmental impact of MLL-AF4 fusion gene on early hematopoietic stem cells. 第 74 回日本血液学会, 京都, 2012 年 10 月 19 日-21 日
 4. 八木千裕, 石前峰齋, 河上早苗, 田内久道, 徳田桐子, 江口真理子, 石井榮一, 岡田 賢, 小林 正夫, X-linked chronic granulomatous disease in a young female due to skewed inactivation of the X-chromosome. 第 74 回日本血液学会, 京都, 2012 年 10 月 19 日-21 日
 5. 本田美里, 河上早苗, 田内久道, 石前峰齋, 江口真理子, 石井榮一, 亀岡一裕, 長島光樹, 下大静脈から右心室まで進展し緊急に心臓内腫瘍摘出術を行った副腎原発神経芽腫の 1 例. 第 53 回日本小児血液学会・がん学会, 前橋, 2011 年 11 月 25-27 日
 6. 石前峰齋, 江口真理子, 西 真範, 田内久道, 河上早苗, 杉田完爾, 石井榮一, MicroRNA let-7b is a target of leukemogenic MLL fusion protein and inactivated by DNA hyper-methylation. 第 72 回日本血液学会総会, 名古屋, 2011 年 9 月 24 日~26 日
 7. 徳田桐子, 江口真理子, 石前峰齋, 河上早苗, 本田美里, 田内久道, 石井榮一, KRAS mutation was found in FLK1-positive cells in a case of JMML. 第 72 回日本血液学会, 名古屋, 2011 年 9 月 24 日~26 日
 8. 河上早苗, 徳田桐子, 田内久道, 本田美里, 石前峰齋, 江口真理子, 石井榮一, 2 回目の同種造血幹細胞移植後にドナー由来の二次性 MDS を発症した再発乳児 ALL の 1 例. 第 73 回日本血液学会, 名古屋, 2011 年 9 月 24 日~26 日
 9. 韓東均, 石前峰齋, 江口真理子, 石井榮一, 韓国の小児急性リンパ性白血病における IKZF1, ARID5B および CEBPE 遺伝子変異の意義, 第 114 回日本小児科学会, 東京, 2011 年 8 月 12-14 日
 10. 河上早苗, 田内久道, 石前峰齋, 江口真理子, 石井榮一, 正着不全のため 3 回の同種造血幹細胞移植を行い骨髄内臍帯血移植を併用した急性リンパ性白血病の女児

例、第 33 回日本造血幹細胞移植学会、愛媛、2011 年 3 月 9 日-10 日

11. 河上早苗、田内久道、渡部竜助、宮脇零士、石前峰斉、江口真理子、石井榮一、堀内淳、亀岡一裕、腹腔内 desmoplastic small round cell tumor の男児、第 52 回日本小児血液学会、第 26 回日本小児がん学会、大阪、2010 年 12 月 17-19 日
12. Han DK, Kim HN, Shin M-H, Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Ishii E, Baek HJ, Park SJ, Kim HJ, Hwang TJ, Kook H, Implication of genetic variations of Ikzf1, ARIDB5, and CEBPE genes in the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia in Korea. 52nd Annual Meeting of American Society of Hematology, Orland, USA, 2010 年 12 月 4-7 日
13. 河上早苗、田内久道、石前峰斉、江口真理子、石井榮一、急性リンパ性白血病の再々発時に TEL-AML1 の増幅と c-myc の増幅を認めた 1 男児、第 72 回日本血液学会、横浜、2010 年 9 月 24-26 日
14. 江口真理子、石前峰斉、石井榮一、小児白血病と TEL 遺伝子異常、第 72 回日本血液学会、横浜、2010 年 9 月 24-26 日
15. 河上早苗、田内久道、千阪俊行、太田雅明、石前峰斉、江口真理子、石井榮一、呼吸管理が必要であった血友病 A 早産児における補充療法の適応について、第 20 回日本産婦人科・新生児血液学会、静岡、2010 年 6 月 25-26 日
16. 大嶋麻友美、江口真理子、石前峰斉、太田雅明、村尾紀久子、竹本幸司、石井榮一、HDR 症候群に認められた GATA3 遺伝子の新規変異とその機能解析、第 113 回日本小児科学会、盛岡、2010 年 4 月 23-25 日

[図書] (計 2 件)

1. 石前峰斉、江口真理子、リンパ球機能異常と類縁疾患 原発性免疫不全症候群 Ataxia-telangiectasia、日本臨床別冊 血液症候群 (第 2 版) II —その他の血液疾患を含めて、2013 年 3 月
2. 石前峰斉、江口真理子、小児 ALL、乳児白血病と DNA メチル化異常、Annual Review 血液 2011、137-146 頁、中外医学社、2011 年 1 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江口 真理子 (Eguchi Mariko)
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：40420781

(2) 研究分担者

江口 峰斉 (Eguchi Minenari)

愛媛大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：50420782

石井 榮一 (Ishii Eichi)
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20176126

(4) 連携研究者

中畑 龍俊 (Nakahata Tatsutoshi)
京都大学・iPS 細胞研究センター・教授
研究者番号：20110744