

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 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790899

研究課題名（和文） 難治性白血病遺伝子 Evi1 による白血病モデルマウスの作成および新規治療法の開発

研究課題名（英文） Establishment of murine model of Evi1-related leukemia and development of radical cure.

研究代表者

大河内 直子 (OKOCHI NAOKO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00568412

研究成果の概要（和文）：

本研究では、Evi1 高発現白血病モデルマウスを用いて、C/EBP β (CCAAT/enhancer binding protein beta) 遺伝子の short isoform である LIP が Evi1 と協調作用して白血病を誘導することを明らかにした。C/EBP β が Evi1 白血病発症に必須であるかどうかを確かめるために、C/EBP β の conditional ノックアウトマウスの骨髄細胞を用いた移植実験を実施したところ、C/EBP β ノックアウト細胞でも、Evi1 の導入により白血病を発症することが判明したことから、C/EBP β は Evi1 の transform 活性には必須ではないことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Ecotropic viral integration site 1 (Evi1) is one of the master regulators in the development of acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS). High expression of Evi1 is found in 10 % of AML patients and indicates a poor outcome. Several recent studies indicate that Evi1 requires collaborative factors to induce AML. Therefore, the search for candidate factors which collaborate with Evi1 in leukemogenesis is one of the key issues in uncovering the mechanism of Evi1-related leukemia. Previously, we succeeded in making a mouse model of Evi1-related leukemia using a bone marrow transplantation (BMT) system. In the Evi1-induced leukemic cells, we identified frequent retroviral integrations near the CCAAT/Enhancer-binding Protein β (C/EBP β) gene and overexpression of its protein. These findings imply that C/EBP β is a candidate gene which collaborates with Evi1 in leukemogenesis. Co-transduction of Evi1 and the shortest isoform of C/EBP β , Liver Inhibitory Protein (LIP), induced AML with short latencies in a mouse BMT model. Overexpression of LIP alone also induced AML with longer latencies. However, excision of all three isoforms of C/EBP β (LAP*/LAP/LIP) did not inhibit the development of Evi1-induced leukemia. Therefore, isoform-specific intervention that targets LIP is required when we consider C/EBP β as a therapeutic target.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：血液腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群（Myelodysplastic syndrome = MDS）は、造血幹細胞の異常により2系統以上の造血機能が障害され、血球の形態異常と血球減少を呈し、高率に急性骨髄性白血病（Acute myeloid leukemia = AML）へ進展するという特徴をもつ症候群である。MDSの原因は不明で、我が国の特定疾患の一つに認定されている難病である。これまでに我が国の疫学調査は行われていないが、欧米での年間発症率は10万人に3~4人とされている。高齢者での発症が多いため、今後、日本人口の高齢化に伴い患者数の増加が予想されている。また、抗がん剤治療や放射線治療後の二次性 MDS/AML は医学の発展とともに出現してきた疾患であり、既存の抗がん剤治療に対する反応性が不良で、病態の解明も進んでいない。以上の状況を改善し、MDS/AML の治療成績を格段に向上させるためには、病態に基づいた新たな分子治療の開発が必須である。病態に基づいた治療法の実現にはモデル動物の存在が欠かせない。また、MDS は非常に多様な臨床像を呈するため、ひとつのモデル動物で MDS あるいは MDS/AML のすべての特徴をモデル化することは難しい。したがって、さまざまな遺伝子異常を組み合わせたモデル動物の作製は、*in vivo* での薬剤効果判定に利用可能であり、臨床的に有用である他、病態の本態を解明する上で重要な研究ツールになると期待される。

本研究者は、レトロウイルスを用いて目的遺伝子を骨髄細胞に導入し、レシピエントマウスに移植するという手法を用いて、様々な造血器腫瘍マウスモデルをこれまでに作製してきた。転写因子 AML1 (RUNX1) の点突然変異体を導入した骨髄細胞を移植したマウスは、MDS/AML 様の症候を呈し、MDS/AML のマウスモデルとして注目されている。さらに、レトロウイルスベクター挿入部位の解析から、AML1 (RUNX1) 変異と Evi1 の活性化が協調して MDS/AML をひきおこすことも明らかにした (Blood 2008; 111:4297-308)。MDS/AML の発症に関与していると思われる分子はいくつか報告されているが、中でも Evi1 遺伝子に注目している。MDS-RA では約 11%、MDS-RAEB では約 58% の患者で Evi1 の過剰発現が認められている (Dreyfus F, et al. Leukemia. 1995;9:203-5.)。また、Evi1 の発現が高い AML 患者は化学療法に対する反応性が悪く、

Evi1 は独立した予後不良因子であることも報告されている (Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, et al. Blood. 2003;101:837-845. Lugthart S, et al. Blood. 2008;111:4329-4337.)。しかし、臨床的には、Evi1 の発現上昇を認める患者においてもその病像は MDS-RA から MDS-RAEB、そして MDS/AML へ進展しているものなどさまざまであることから、Evi1 単独ではなく、Evi1 と関連する遺伝子異常により病態が異なるものと推測される。したがって、Evi1 と協調して作用する遺伝子の探索は、MDS から AML へ進展するメカニズムの解明において重要な因子を抽出する有用な方法であると期待される。

2. 研究の目的

骨髄性白血病 (AML) や骨髄異形成症候群 (MDS) で高頻度に活性化されている転写因子の Evi1 (Ecotropic viral integration site 1) は、白血病の難治性を規定する重要な因子として注目を集めている。本研究では、われわれが世界で初めて作製した Evi1 高発現白血病モデルマウスを用いて、Evi1 による造血器腫瘍、とくに骨髄異形成症候群の発症機構の本質を明らかにする。すでに C/EBP β (CCAAT/enhancer binding protein beta) 遺伝子と Evi1 との有意な関連性を示す結果を得ており、さらに両者の関連について詳細に解析を進める。病態モデルマウスの知見に基づく新たな分子標的療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

マウス骨髄細胞にレトロウイルスを用いて Evi1 を導入し、骨髄移植を実施して、Evi1 関連白血病モデルマウスを作製する。白血病を発症したマウスのゲノム DNA におけるレトロウイルスの挿入部位を同定し、周辺遺伝子の解析により、Evi1 と協調して白血病をひきおこす遺伝子を明らかにする。これまでの研究により Evi1 の挿入部位が C/EBP β 遺伝子の近傍である頻度が非常に高いことが判明しているため、両者の協調作用を確かめる目的で、両遺伝子を同時に高発現させて骨髄移植を行い、白血病発症との関連を観察する。また、今回確立された Evi1 白血病細胞において C/EBP β をノックアウト技術で欠損させ、Evi1 による白血病発症に C/EBP β が必須であるかどうかを確かめる。

4. 研究成果

C/EBPbeta と Evi1 の協調作用が移植実験によって証明できた。また、C/EBPbeta が Evi1 関連白血病には必須ではないことを、ノックアウトマウスの骨髄を用いて証明できた。Evi1 関連白血病において、C/EBPbeta のショートアイソフォームである LIP が Evi1 と協調作用することは明らかになったが、Evi1 の transform 活性において、C/EBPbeta は必須ではないことも判明した。これは残念な結果であったが、一方で、C/EBPbeta が関与する場合の Evi1 白血病の表現型と、C/EBPbeta が存在しない時の Evi1 白血病の表現型は異なることが分かってきた。今後は、C/EBPbeta の conditional knockout mice を用いて、C/EBPbeta の白血病発症における役割を明らかにしていきたいと考えている。

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 1 件)

- ① 大河内直子、他、Evi1 の活性化と白血病一病態と予後に関する最近の知見、血液・腫瘍科、査読なし、2010、pp. 746-746

[学会発表] (計 3 件)

- ① 大河内直子 C/EBPbeta のアイソフォームである LIP は Evi1 と協調作用して急性骨髄性白血病を誘発する、第 73 回日本血液学会学術集会、2011 年 10 月 15 日、名古屋
- ② 大河内直子 E v i 1 関連白血病モデルマウスの作成と解析、第 72 回日本血液学会学術集会 2010 年 9 月 24 日 横浜
- ③ 大河内直子 E v i 1 関連白血病モデルマウスの作成と解析、第 69 回日本癌学会学術総会 2010 年 9 月 23 日 大阪

[図書] (計 1 件)

- ① 大河内直子 医歯薬出版株式会社、アフエレス療法ポケットマニュアル 2010、pp.262-267

[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

<http://www.u-tokyo-hemat.com/staff.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大河内 直子 (OKOCHI NAOKO)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00568412

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

