

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 6月 4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：22790901

研究課題名（和文）白血病難治化分子BAALCによる幹細胞活性とニッチ制御機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of the mechanism of stem cell and niche-regulating function of refractory leukemia-related molecule, BAALC

研究代表者

市川 幹（ICHIKAWA MOTOSHI）

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60463840

研究成果の概要（和文）：

BAALC (brain and acute leukemia, cytoplasmic)は、予後不良の急性骨髄性白血病において発現が上昇するが、その機能は不明であった。本研究では遺伝子改変マウスを用いて、BAALCが造血幹細胞ニッチの機能維持に重要であること、BAALCがp53機能を通じて静止期にある造血幹細胞を制御していることを明らかにした。本研究の成果はBAALCの新たな造血幹細胞制御分子としての機能を明らかとし、難治性白血病の新規治療法につながるものである。

研究成果の概要（英文）：

The *BAALC* (brain and acute leukemia, cytoplasmic) gene is known to be highly expressed in the acute myeloid leukemia cells with poor prognosis, however, its function in normal and malignant hematopoiesis has not been known. Using gene-targeted mice, this study elucidated a critical role for BAALC in regulating the hematopoietic stem cell niche in the bone marrow through the p53 pathway. These results identified BAALC as a novel stem cell regulating gene, and lead to a molecular targeted therapy for the refractory leukemia.

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：血液内科学・白血病・幹細胞

1. 研究開始当初の背景

生体での血球産生においては、すべての血球細胞の発生・分化の階層構造の頂点に自己複製能と多能性を持つ造血幹細胞が存在する。造血幹細胞が自己複製能によって維持され、さらに多種多様の造血細胞を秩序だてて生み出すことにより、正常の造血が維持されている。また、正常の造血維持機構のみならず悪性腫瘍細胞の維持においても一部に自己複製能をもつ細胞分画、すなわち腫瘍幹細胞が存在することが明らかになってきた。こうした正常造血・腫瘍性造血における幹細胞の維持機構の詳細な解明が、正常幹細胞の維持とそこからの効率的な分化を通じた再生医療の実現、あるいは腫瘍における自己複製能の維持機構の解明とそれを標的とした効果の高い分子標的療法の開発という面から望まれている。

一方、造血幹細胞の発生・維持にかかわる遺伝子の多くの遺伝子の変異が白血病などの造血器悪性腫瘍に多く見られることが知られている。造血幹細胞活性は白血病幹細胞活性と一部共通の分子機構によって維持されているとともに、予後不良白血病において発現が上昇している遺伝子が造血幹細胞活性においても重要な役割を果たしている可能性が高い。当初染色体異常トリソミー8をもつ白血病症例から分離された遺伝子である BAALC (Brain and Acute leukemia, cytoplasmic) は、中枢神経系と白血病細胞において発現が亢進している遺伝子であり、正常核型急性骨髄性白血病においてその発現上昇が予後不良因子として同定されている (Blood 102:1613-1618, 2003)。この分子の発現はヒトの造血幹細胞を含む細胞分画である CD34 陽性細胞において発現が認められており、幹細胞機能を通じて白血病の難治化に関与している可能性が高い。ところが、この分子は他の既知の蛋白質と明確な相同性を持たないことから蛋白質相互作用などの機能解析が行われておらず、またノックアウトマウスなどによる個体レベルの解析もなされていない。特に、造血系におけるこの分子の機能についての報告は皆無に等しく、白血病難治性や幹細胞機能の維持における機能の解析が望まれている。

2. 研究の目的

BAALC の発現は造血幹細胞を含む未熟な分画において上昇しており、造血細胞の分化とともに低下する。また、BAALC は正常造血においても構成するエクソンの異なる複数のアイソフォームが存在することが報告されているが、これらの異なるアイソフォームの導入によりマウス骨髄球系細胞の分化・増殖能が変化することが観察された。

BAALC のノックアウトマウスおよび条件的ノックアウトマウスを作成したところ、BAALC を欠失するマウスはそのほとんどが胎生期に死亡し、ごくわずかな個体のみが出生することが示された。

造血幹細胞は個体においては骨髄中においてニッチ (niche) と呼ばれる特定の部位に局在しており、周囲の細胞との相互作用によって通常は細胞分裂を行わない休眠状態にあり、このことが幹細胞活性において重要な役割を果たしているとされている。造血幹細胞分画で BAALC が高く発現し、白血病におけるその高発現が予後不良因子であることを併せて考えると、BAALC は正常および白血病幹細胞においてその休眠状態を制御している可能性が高い。

これらの知見をもとに、(1) BAALC 条件的ノックアウトマウスや造血幹細胞への BAALC の導入により、造血幹細胞活性とその休眠状態の維持、ニッチとの相互作用に BAALC が果たす役割を明らかにし、同時に (2) 成体および胎生期造血ニッチにおいて BAALC を欠失させるなどの手法により、造血ニッチにおける BAALC の機能を明らかにする。さらに、(3) BAALC と相互作用する蛋白質を同定することを手掛かりに BAALC の細胞内での機能を明らかにし、(4) 白血病モデルマウスと BAALC 条件的ノックアウトマウスの組み合わせにより、BAALC の欠失が白血病に与える影響を検証する。

これらの解析を通じて、本研究においては、機能が全く不明である新規分子 BAALC に対して、マウスモデルを手掛かりにその機能を明らかにしようと試みた。

3. 研究の方法

(1) ニッチ特異的 BAALC 欠失マウスでの造血幹細胞動態の解析

骨芽細胞は造血幹細胞の未分化性を維持する微少環境を形成するニッチとして知られている。BAALC は骨芽細胞において PTH により発現が誘導されることが報告されているが、骨芽細胞においてもその役割は不明のままである。そこで、骨芽細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Col1-Cre マウスとの交配により、骨芽細胞特異的に BAALC を欠失したコンディショナル・ノックアウトマウスを作成した。この骨芽細胞特異的 BAALC ノックアウトマウスにおいて造血細胞の数を末梢血・骨髄において定量した。さらに、骨芽細胞による造血幹細胞ニッチの機能を生理的に評価するため、骨芽細胞特異的に BAALC 欠失を誘導したマウスをレシピエントとして放射線照射後、野生型マウスの正常骨髄細胞を骨髄移植し、ドナー由来の細胞の生着を評価した。

(2) BAALC と相互作用して静止期にある造血幹細胞活性を制御する分子の同定

BAALC 欠失細胞において発現している遺伝子を DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析し、BAALC 欠失細胞において発現の変化がみられる遺伝子群を Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) ニッチ特異的 BAALC 欠失マウスでの造血幹細胞動態の解析

骨芽細胞特異的に BAALC 欠失を誘導しても、血算の異常や骨髄における造血幹細胞の数の変化は認められなかった。しかし、骨芽細胞特異的に BAALC 欠失を誘導したマウスをレシピエントとして放射線照射後、野生型マウスの正常骨髄細胞を骨髄移植すると、野生型マウスをレシピエントとしたコントロールと比較してドナーキメリズムの低下が認められた。このことから、骨芽細胞特異的に BAALC を欠失させると、骨髄移植時のようなストレス下において、造血幹細胞のニッチとしての機能が障害されることが初めて明らかとなった。

(2) BAALC と相互作用して静止期にある造血幹細胞活性を制御する分子の同定

BAALC 欠失細胞において発現の変化が見られる遺伝子群として p53 遺伝子とその関連分子が同定された。免疫沈降法により BAALC と p53 の相互作用が示され、BAALC が p53 機能を通じて静止期にある造血幹細胞を制御していることが示唆された。

本研究において BAALC を通じて造血幹細胞ニッチが制御されていること、p53 との相互作用を通じて静止期造血幹細胞のが制御されていることが明らかとなった。本研究の成果は、BAALC の造血における生理的役割および白血病の難治性の成立する機序を知る上で非常に重要な知見である。

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)

[雑誌論文] (計 24 件)

1. Toya T, Nishimoto N, Koya J, Nakagawa M, Nakamura F, Kandabashi K, Yamamoto G, Nannya Y, Ichikawa M, Kurokawa M. The first case of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm with MLL-ENL rearrangement. *Leukemia Research* 36:117-118, 2012 (査読有)
DOI:10.1016/j.leukres.2011.07.029

2. Morita K, Nakamura F, Nannya Y, Nomiya A, Arai S, Ichikawa M, Homma Y, Kurokawa M. Primary MALT lymphoma of the urinary

bladder in the background of interstitial cystitis. *Annals of Hematology* in press, 2012 (査読有)

DOI:10.1007/s00277-012-1419-0

3. Koya J, Iwata A, Nakamura F, Nagashima Y, Ichikawa M, Tsuji S, Kurokawa M. Fludarabine may overcome resistance to rituximab in IgM-related neuropathy. *Journal of the Neurological Sciences* 315:150-152, 2012 (査読有)
DOI:10.1016/j.jns.2011.12.001

4. Koya J, Nannya Y, Ichikawa M, Kurokawa M. The clinical role of procalcitonin in hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplantation* in press, 2012 (査読有)
DOI:10.1038/bmt.2012.18

5. Yamamoto G, Hosoi M, Miyagawa T, Ohmatsu H, Ichikawa M, Sugaya M, Kurokawa M. Evans syndrome with cytomegalovirus infection followed by emerging peripheral T-cell lymphoma. *Annals of Hematology* 91:123-124, 2012 (査読有)
DOI:10.1007/s00277-011-1214-3

6. Ogura M, Todo T, Tanaka M, Nannya Y, Ichikawa M, Nakamura F, Kurokawa M. Temozolomide may induce therapy-related acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*. 154:663-665, 2011 (査読有)
DOI:10.1111/j.1365-2141.2011.08641.x

7. Nishimoto N, Arai S, Ichikawa M, Nakagawa M, Goyama S, Kumano K, Takahashi T, Kamikubo Y, Imai Y, Kurokawa M. Loss of AML1/Runx1 accelerates the development of MLL-ENL leukemia through down-regulation of p19ARF. *Blood* 118:2541-2550, 2011 (査読有)
DOI:10.1182/blood-2010-10-315440

8. Seo S, Nakamoto T, Takeshita M, Lu J, Sato T, Suzuki T, Kamikubo Y, Ichikawa M, Noda M, Ogawa S, Honda H, Oda H, Kurokawa M. Crk-associated substrate lymphocyte type regulates myeloid cell motility and suppresses the progression of leukemia induced by p210Bcr/Abl. *Cancer Science* 102:2109-2117, 2011 (査読有)
DOI:10.1111/j.1349-7006.2011.02066.x

9. Nakagawa M, Shimabe M, Watanabe-Okochi N, Arai S, Yoshimi A, Shinohara A, Nishimoto N, Kataoka K, Sato T, Kumano K,

- Nannya Y, Ichikawa M, Imai Y, Kurokawa M. AML1/RUNX1 functions as a cytoplasmic attenuator of NF- κ B signaling in the repression of myeloid tumors. *Blood* 118:6626-6637, 2011 (査読有)
DOI:10.1182/blood-2010-12-326710
10. Yamazaki S, Fujioka Y, Nakamura F, Ota S, Shinozaki A, Yamamoto G, Kamikubo Y, Nannya Y, Ichikawa M, Fukayama M, Kurokawa M. Composite diffuse large B-cell lymphoma and CD20-positive peripheral T-cell lymphoma. *Pathology International* 61:662-666, 2011 (査読有)
DOI:10.1111/j.1440-1827.2011.02713.x
11. Yoshiki Y, Asai T, Ichikawa M, Hangaishi A, Ota S, Imai Y, Takahashi T, Kurokawa M. A case of myeloid sarcoma with correlation to JAK2V617F mutation, complicated by myelofibrosis and secondary acute myeloid leukemia. *Internal Medicine* 50:2649-2652, 2011 (査読有)
DOI:10.2169/internalmedicine.50.5783
12. Yamamoto G, Maki H, Ichikawa M, Kurokawa M. Pure red cell aplasia with follicular lymphoma showing regression and progression parallel to lymphoma. *International Journal of Hematology* 94:576-577, 2011 (査読有)
DOI:10.1007/s12185-011-0969-6
13. Morita K, Nakamura F, Nannya Y, Kamikubo Y, Ichikawa M, Kurokawa M. Lymphoma with specific affinity to endocrine organs. *Annals of Hematology* in press, 2011 (査読有)
DOI:10.1007/s00277-011-1372-3
14. Yamazaki S, Nakamura F, Nasu R, Nannya Y, Ichikawa M, Kurokawa M. Haemophagocytic lymphohistiocytosis is a recurrent and specific complication of acute erythroid leukaemia. *British Journal of Haematology* 153:669-672, 2011 (査読有)
DOI:10.1111/j.1365-2141.2010.08544.x
15. Arai S, Yoshimi A, Shimabe M, Ichikawa M, Nakagawa M, Imai Y, Goyama S, Kurokawa M. Evi-1 is a transcriptional target of mixed-lineage leukemia oncoproteins in hematopoietic stem cells. *Blood* 117:6304-6314, 2011 (査読有)
DOI:10.1182/blood-2009-07-234310
16. Kagoya Y, Takahashi T, Yoshimoto T, Ichikawa M, Hangaishi A, Fukayama M, Kurokawa M. Recurrent pericardial effusion after treatment for primary effusion lymphoma-like lymphoma: an autopsied case. *Annals of Hematology* 90:219-220, 2011 (査読有)
DOI:10.1007/s00277-010-0975-4
17. Kobayashi H, Ichikawa M, Hangaishi A, Imai Y, Kurokawa M. Concurrent development of "Burkitt-like" lymphoma and BCL-2-rearranged low-grade B cell lymphoma sharing the same germinal center origin. *International Journal of Hematology* 93:112-117, 2011 (査読有)
DOI:10.1007/s12185-010-0741-3
18. Yoshizato T, Nannya Y, Yoshiki Y, Nakamura F, Imai Y, Ichikawa M, Kurokawa M. Nilotinib-induced hypothyroidism in a patient with chronic myeloid leukemia. *International Journal of Hematology* 93:400-402, 2011 (査読有)
DOI:10.1007/s12185-011-0790-2
19. Koya J, Nannya Y, Yoshizato T, Ono K, Seo S, Nakagawa M, Ichikawa M, Kurokawa M. Disseminated tuberculosis following unrelated cord blood transplantation for refractory peripheral T-cell lymphoma: Clinical role of serum procalcitonin levels. *Journal of Infection* 62:237-240, 2011 (査読有)
DOI:10.1016/j.jinf.2011.01.010
20. Ichikawa M, Hangaishi A, Nannya Y, Kurokawa M. Postremission gentuzumab ozogamicin for elderly patients with acute myelogenous leukemia with favorable characteristics and comorbid conditions. *International Journal of Hematology* 92:673-674, 2010 (査読有)
DOI:10.1007/s12185-010-0711-9
21. Ueda K, Ichikawa M, Takahashi M, Momose T, Ohtomo K, Kurokawa M. FDG-PET is effective in the detection of granulocytic sarcoma in patients with myeloid malignancy. *Leukemia Research* 34:1239-1241, 2010 (査読有)
DOI:10.1016/j.leukres.2010.04.017
22. Hashidate T, Murakami N, Nakagawa M, Ichikawa M, Kurokawa M, Shimizu T, Nakamura M. AML1 enhances the expression

of leukotriene B4 type-1 receptor in leukocytes. FASEB Journal 24:3500-3510, 2010 (査読有) DOI:10.1096/fj.10-156844

23. Nishimoto N. Imai Y. Ueda K. Nakagawa M. Shinohara A. Ichikawa M. Nannya Y. Kurokawa M. T cell acute lymphoblastic leukemia arising from familial platelet disorder. International Journal of Hematology 92:194-197, 2010 (査読有) DOI:10.1007/s12185-010-0612-y

24. Hosoi M. Ichikawa M. Imai Y. Kurokawa M. A case of anaplastic large cell lymphoma, ALK positive, primary presented in the skin and relapsed with systemic involvement and leukocytosis after years of follow-up period. International Journal of Hematology 92:667-668, 2010 (査読有) DOI:10.1007/s12185-010-0708-4

[学会発表] (計2件)

1. 市川幹 (代表) ほか2名 : Use of second generation tyrosine kinase inhibitors for imatinib-induced renal dysfunction. 第73回日本血液学会学術集会、2011年10月15日、名古屋市

2. 市川幹 (代表) ほか3名 : Postremission gemtuzumab ozogamicin in older patients with AML: a single-center study. 第72回日本血液学会学術集会、2010年9月25日、横浜市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市川 幹 (ICHIKAWA MOTOSHI)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 : 6 0 4 6 3 8 4 0

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし