

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：10101  
研究種目：研究活動スタート支援  
研究期間：2022～2023  
課題番号：22K20842  
研究課題名（和文）NUP98-NSD1白血病の発症・病態機序の解明

研究課題名（英文）Unveiling NUP98-NSD1 leukemia

研究代表者

松川 敏大（Matsukawa, Toshihiro）

北海道大学・大学病院・特任助教

研究者番号：20963169

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、北海道白血病ネットで集めた臨床検体からNUP98-NSD1陽性の急性骨髄性白血病検体を見つけ、NUP98-NSD1のクローニングを行い全長をシーケンスで確認した。出来上がったNUP98-NSD1をヒトB細胞系細胞株であるBa/F3に遺伝子導入し、薬剤選択法でNUP98-NSD1陽性細胞株を樹立したと考えたが、NUP98-NSD1の融合蛋白の発現をウエスタンブロットで確認できず、他のヒト細胞株にも遺伝子導入を行い、薬剤耐性株の樹立を行った。しかし、Ba/F3細胞株への遺伝子導入と同様にNUP98-NSD1の融合蛋白の確認ができなかった。このため、別のベクターによる遺伝子導入を行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在までに主だった成果は挙げられていない。

NUP98-NSD1が大きくなかなかヒト細胞株に遺伝子導入ができていないが、以前より施行している遺伝子導入法ではなく別の方法での遺伝子導入を行っており、NUP98-NSD1陽性ヒト細胞株が確立され、NUP98-NSD1陽性急性骨髄性白血病の発症機構や薬剤耐性機構が解明できれば、予後不良であるNUP98-NSD1陽性急性骨髄性白血病治療における重要な成果となりうると考える。

研究成果の概要（英文）：This study identified NUP98-NSD1-positive acute myeloid leukemia from specimens which collected by the Hokkaido Leukemia Net. We next cloned NUP98-NSD1 and confirmed the full length of the vector by Sanger sequencing.

Then we transfected NUP98-NSD1 into Ba/F3, the human B-cell line, and selected it by puromycin. However, because the expression of the NUP98-NSD1 fusion protein could not be detected by immunoblotting, we tried to transduce other human cell lines.

研究分野：血液学

キーワード：NUP98-NSD1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病 (AML) は染色体異常や遺伝子変異などにより生じる造血器悪性腫瘍である。染色体異常や遺伝子変異により AML の治療成績が異なり予後が層別化されることが知られている。日常診療において AML における染色体異常は G 分染法を用いた検査が行われており広く普及している。G 分染法により染色体異常のない「正常核型」と判断される AML ではその他に予後に関わる遺伝子変異がなければ、多くのガイドラインで予後中間群に分類される。

AML の一部には Nucleoporin 98kDa (NUP98) 変異が検出されることが知られており予後不良であることが報告されている。NUP98 は本来細胞の核膜孔を構成するヌクレオポリンを構成するもののひとつである。NUP98 変異を有する AML は NUP98 の partner gene が 30 以上報告されており、特に NUP98::NSD1 遺伝子複合体の頻度が比較的高い。NUP98 と NSD1 の相互転座は転座部位の大きさがほぼ同じであることから、NUP98::NSD1 は G 分染法による染色体検査では「正常核型」と判定され、G 分染法で検出できない潜在的な転座となってしまうことから日常臨床では NUP98::NSD1 の相互転座は見落とされることが多いと考えられている。したがって、NUP98::NSD1 陽性 AML のまとまった症例解析の報告は少なく、実態解明が望まれる。

一方で、従来から AML の予後不良因子として FLT3-ITD が報告されていた。FLT3-ITD を有する AML は治療成績が不良であったが、FLT3-ITD に対する治療薬として FLT3 阻害薬が登場してからは治療成績が改善し、現在では多くのガイドラインで予後中間と定義されることが多い。

NUP98::NSD1 陽性 AML は、FLT3-ITD の陽性率が 8 割程度に達する。一般的に AML では FLT3-ITD は 30% 程度までの陽性率と報告されており、NUP98::NSD1 陽性 AML における FLT3-ITD 陽性率の高さが指摘されている。NUP98::NSD1 単独陽性の AML は寛解率の低さなどから予後不良となるが、FLT3-ITD が同時陽性となることにより治療成績は更に悪化する。FLT3 阻害薬の登場により近年では治療成績が向上していることも考えられるが、NUP98::NSD1 を有する AML では FLT3-ITD の頻度が高いことや従来の標準治療である化学療法に抵抗性を示すことなど白血病発症や治療に対する特有の分子学的機序を有している可能性が考えられる。

### 2. 研究の目的

予後不良である NUP98::NSD1 陽性 AML は前述の通り様々な要因により治療成績が悪くなっている可能性があるが、予後不良の原因として他の正常核型 AML に比べ、標準治療であるアントラサイクリン系抗がん剤とシタラピンの併用療法における寛解率が低く、再発率が高くなる。このように NUP98::NSD1 白血病の治療法の深化は治療抵抗性や高い再発率の原因解明が鍵となる。

研究代表者は、北海道を中心に全国の施設から急性白血病の検体を集めて保険診療で行うことのできない遺伝子変異の解析を行う北海道白血病ネットを主宰し検討を行っている。

本課題では北海道白血病ネットで収集したヒト急性白血病、特に AML の臨床検体を用いて治療成績の不良である NUP98::NSD1 を有する AML における白血病発症機構や薬剤耐性機構、再発が高い理由を解明することにより今後の NUP98::NSD1 陽性 AML における新規治療につながる機序の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

収集した臨床検体から NUP98::NSD1 をクローニングし、その後クローニングしたベクターをヒト由来の細胞株に形質導入することで NUP98-NSD1 陽性細胞株を樹立する。樹立した細胞株を用いて *in vitro* で、AML に対し従来から使用されてきたアントラサイクリン系抗がん剤やシタラピンなどの抗がん剤に加え、造血器悪性疾患で使用される薬剤を投与することにより、薬剤感受性について検討を行う。次に、NUP98-NSD1 白血病で約 80% 以上の症例で認められる FLT3-ITD を共発現させることにより細胞株の形質が変化する可能性が高いため、FLT3-ITD を共発現したヒト細胞株の樹立を行う。その後、NUP98-NSD1 陽性 AML 検体を次世代シーケンスにより網羅的に解析し、発症や病態、治療抵抗性に関わる遺伝子発現量の変化や変異を解析する。

### 4. 研究成果

#### (1) NUP98::NSD1 のクローニング

まず、研究代表者は北海道白血病ネットで収集した臨床検体の中から、PCR 法にて NUP98::NSD1 陽性 AML 検体を見つけ、NUP98::NSD1 のクローニングを行う方針とした。

当初の予定では、全長をクローニングしようと試みたが、NUP98::NSD1 は約 5800bp と大きいため前半と後半部に分けてクローニングを行った。

前半部を PCR で増幅し、ベクターを制限酵素で切断し切断部分に insert し、形質転換後に

プラスミド抽出を行った。後半部も同様に形質転換後にプラスミド抽出を行った。サンガーシークエンスにて前半、後半部のシークエンスを行った。サンガーシークエンスでは一部が塩基置換が認められたため PCR 法などにより元の配列となるように修復を行ない、オリジナルのシークエンスを復元した。前半と後半部を結合させ、全長を確認のため再度シークエンスで確認した。

## (2) レトロウイルスによる遺伝子導入

Doxycycline(以下、Dox)で誘導可能なレトロウイルスベクターに挿入する方針とし、pRetro-tetOne-puroベクターにNUP98::NSD1を挿入することを試みた。HEK293T細胞(以下、293T)をパッケージング細胞としてリポフェクションし、ウイルス上清を回収し、まずマウスProB細胞株であるBa/F3へ遺伝子導入を行なった。Puromycin耐性であるため、puromycinによる薬剤選択を行い増加した細胞を回収し、蛋白発現などの確認を行なった。Doxを添加したものとしなかったものを比較し、RT-PCRで確認したところ、Dox添加細胞株の方がNUP98::NSD1の発現亢進が見られたことから、抗NUP98抗体を用いて蛋白発現を確認すると、内因性NUP98は98kD付近の発現が認められたが、NUP98::NSD1融合蛋白が見られると思われる約200kD付近には発現が確認できなかった。293T細胞にNUP98::NSD1を発現させた陽性コントロールでは融合蛋白の発現が確認できた。陽性コントロールでは発現の確認ができているが、抗体の問題である可能性も考慮し、融合蛋白の検出に用いる抗体を抗FLAG抗体に変更する方針とし、さらに血球系の遺伝子導入に有利であるベクターへの乗せ替えを行なった。ベクターはpMys-IRES-puroへの乗せ替えを試み、In-Fusionプライマーを設定しももとのベクターからNUP98::NSD1を切り出し、制限酵素を用いてpMys-IRES-puroへの乗せ替えを行なった。さらに、3×FLAGタグを付加し、乗せ替え後に、全長をサンガーシークエンスで確認し、塩基置換が認められずオリジナルの配列であることを確認した。作成したベクターをPlat-Aをパッケージング細胞として、ヒト細胞株であるTHP-1やMOLM-13に遺伝子導入を行い、puromycinによる薬剤選択を行なった。薬剤選択により遺伝子導入ができたと思われる細胞株の蛋白を精製し、同様に抗NUP98抗体を用いて融合蛋白の確認を行なったが融合蛋白部に発現の確認ができなかった(図1)。同様に抗FLAG抗体でも確認を試みたが、蛋白の発現は確認できなかった(図1)。陽性コントロールでは両方の抗体を用いて融合蛋白の発現が確認できていることから、ヒト細胞株への遺伝子導入ができていない可能性が高いと考えられた。前述の通り、NUP98::NSD1が非常に大きいため、遺伝子導入ができていない可能性を考慮した。

この検討においては細胞全てから蛋白精製していることからNUP98は核膜に多く存在し、NUP98変異融合蛋白は核内に存在することが報告されており、細胞内における蛋白の局在により蛋白が検出できていない可能性を考えた。そこで、次に細胞を核蛋白、細胞質蛋白を抽出して蛋白発現について確認を行なった。すると既報通り、NUP98蛋白は核内に多く発現していることが確認できたが、NUP98::NSD1の融合蛋白は核内、細胞質のいずれにも認められなかった(図2)。

## (3) トランスポゾンベクターによる遺伝子導入

上記の通り、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入では融合蛋白が確認できていないため、次にトランスポゾンベクターであるpiggyBac transposonベクターによる遺伝子挿入を試みる方針とした。piggyBacシステムはNUP98::NSD1をもつトランスポゾンベクターとトランスポダーゼを発現するベクターを同時に遺伝子導入することで目的とするNUP98::NSD1配列を切り取りゲノム上に組み込むことが可能であるシステムである。エレクトロポレーションにより遺伝子導入を行う系であるが、当研究室で従来より使用している慢性骨髄性白血病細胞株であるK562にこれらのベクターを遺伝子導入することを試みた。同様にpuromycinによる薬剤選択によりNUP98::NSD1が遺伝子導入されたと考えられるK562細胞を前述と同様の方法にて融合蛋白の同定を行った。すると抗FLAG抗体、抗NUP98抗体のいずれにおいてもNUP98::NSD1の融合蛋白と思われるサイズにバンドが確認でき、この系での遺伝子導入が可能であると考えられた(図3)。

現在、本来目的としている細胞株に遺伝子導入を試みている。

图1

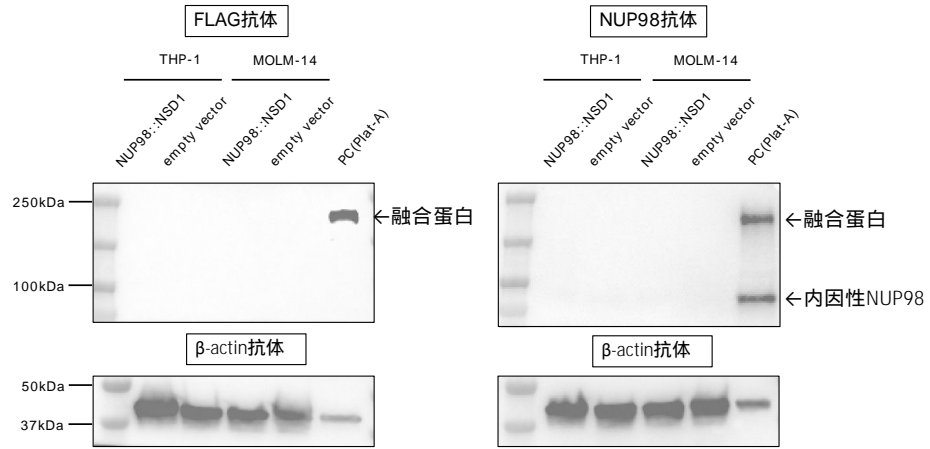


图2

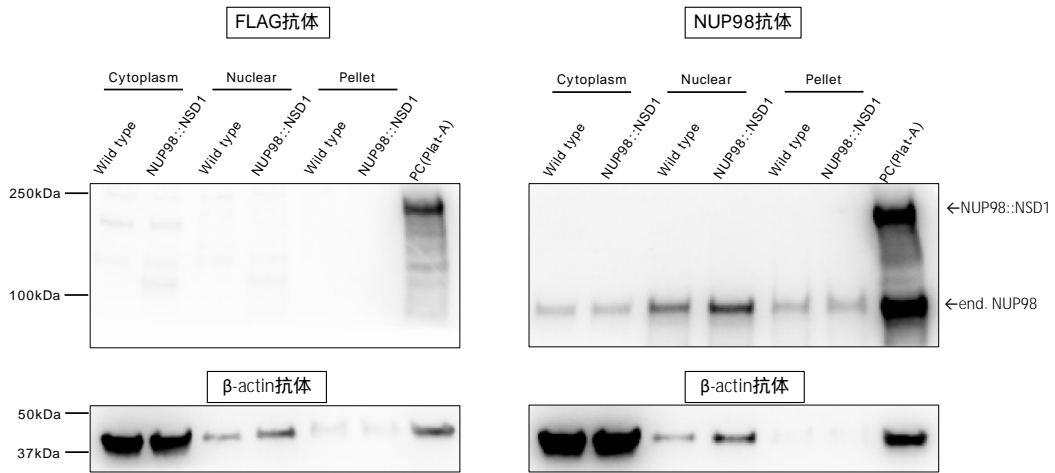
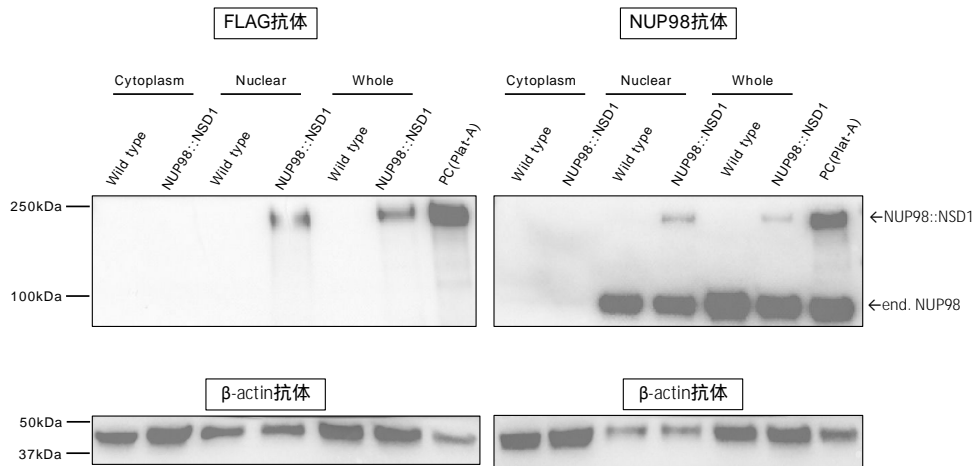


图3



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------