

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23249051

研究課題名(和文)白血球発症の分子メカニズムの統合的解明：新たなカテゴリーの異常の同定と解析

研究課題名(英文) Integrative elucidation of molecular mechanisms for leukemogenesis: Identification and analyses of mutations with novel categories.

研究代表者

北村 俊雄 (Kitamura, Toshio)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：20282527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,900,000円、(間接経費) 11,070,000円

研究成果の概要(和文)：TET2、EZH2、ASXL1変異がマウス骨髄移植(BMT)モデルにおいてMDS発症を誘導することを示し、ASXL1変異については、HoxA9とマイクロRNA125aの脱抑制がMDSの発症機序の1つであることを示唆した。一方、転写抑制因子Hes1がMMP9発現を上昇させることがCML病態の進展に寄与することを示唆した。また、マウスBMTモデルにおいてFIP1L1-PDGFRとHes1は共同して急性白血病を誘導し、FIP1L1-PDGFR陽性の好酸球性白血病患者5例中2例にHes1の過剰発現が認められた。これらの結果はHes1が細胞分化抑制を介して急性白血病発症に寄与することを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Mutations in a variety of epigenetic factors have been recently identified in various hematological malignancies. We have demonstrated that the mutations in TET2, EZH2 or ASXL1 induce myelodysplastic syndromes (MDS)-like in mouse bone marrow transplant (BMT) model and that derepression of HoxA9 and miR125a induced by ASXL1 mutants via EZH2/PRC2 repression plays critical roles in inducing MDS-like disease.

We previously reported that Hes1 plays critical roles in CML-BC. We here demonstrate that MMP9 expression induced by Hes1 via NFκB activation plays some roles in the progression of CML-BC. In addition, we also demonstrated that Hes1 collaborated with FIP1L1-PDGFR in inducing AML in mouse BMT model and that Hes1 overexpression was observed in 2 of 5 patients with eosinophilic leukemia harboring FIP1L1-PDGFR. These results indicate that Hes1 contribute to leukemogenesis in suppressing myeloid differentiation.

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

白血病には病型特異的な染色体転座が多く、染色体転座は白血病発症の必要十分条件であると考えられていた。実際、慢性骨髄性白血病（CML）の9;22転座によって生じるBcr-Abl融合遺伝子をマウス骨髄細胞で発現させると全例においてCML様疾患を発症する。しかしながら他の融合遺伝子は単独で白血病発症を誘導できない例が多い。例えば急性前骨髄球性白血病（AML-M3）の多くで認められる15;17転座で生ずるPML-RARα融合遺伝子単独では白血病を効率よく誘導しないが、活性型FLT3-ITDと共存することによってすべてのマウスで潜伏期間の短い急性前骨髄球性白血病を発症する。これらの結果に基づき、Gilliland博士らは、FLT3-ITDのように細胞増殖誘導/細胞死阻害に寄与する遺伝子変異（クラスI変異）とPML-RARαやMLL融合遺伝子のように血液細胞分化を阻害する遺伝子変異（クラスII変異）が協調して白血病を発症させるという仮説を10年前に提唱した。

しかしながらその後、次世代シーケンスの開発に伴って網羅的なシーケンス解析が可能となり、患者白血病細胞では10前後の遺伝子異常が共存すること、従来注目されていなかった遺伝子の異常が白血病や癌で見つかるようになったことから、上述の白血病の2段階発症モデルでは説明ができないことが多く出てきた。

2. 研究の目的

これまでの研究により白血病発症には増殖刺激/細胞死阻害を誘導するクラスI変異と細

胞分化を阻害するクラスII変異が必要であることが明らかになった。本研究においては従来クラスIおよびクラスIIに分類されていないTET2変異、ASXL1変異、EZH2変異が白血病発症においていかなる役割を果たすかを解析する。これらの異常はクラスIあるいはクラスII様の役割を果たす可能性もあるが、TET2変異はDNAメチル化に、ASXL1はポリコーン関連分子として働き、EZH2もポリコーン複合体PRC2に含まれ染色体メチル化に関与することが知られており、エピジェネティクス異常を介して白血病発症に関与する可能性が高い。これらの遺伝子異常と他の異常が共同して白血病発症を誘導しうるかを調べる。

一方、慢性骨髄性白血病（CML）を含む骨髄増殖性腫瘍（MPN）や骨髄異形成症候群（MDS）は付加的な遺伝子異常を伴い、急性白血病へと移行するが、本研究ではこの急性白血病への移行の分子メカニズムを調べる。

上記の研究によってことによって白血病発症の分子機序を理解し、解明する。

3. 研究の方法

造血器腫瘍患者の細胞で同定した種々の変異遺伝子をレトロウイルスベクターに組み込みマウス骨髄細胞に導入する。導入した細胞を照射したマウスに移植してヒトの造血器腫瘍を再現できる系を利用して実験を行なう。また、一部の変異遺伝子に関してはRosa26座にノックインしたトランスジェニックマウスを作製して、その生体内での機能を解析する。さらにこれらの造血器腫瘍モデルを利用した治療モデルも行なった。

4. 研究成果

TET2、EZH2、ASXL1の変異体を導入した骨髓細胞を移植したマウスは1年程度の潜伏期間を経てMDS様の病気を発症した。MDS患者においては平均して2-10個程度の遺伝子変異が同定されることが知られているが、この実験結果は上記3種の遺伝子の変異がドライバー変異としてMDS発症に重要な役割を果たしていることを示唆している。このうち、ASXL1変異体によって発症するMDSの解析において、(1) ASXL1変異体がEZH2/PRC2を抑制して代表的なヒストン抑制マークであるH3K27me3を低下させること、(2) それによってHoxA7、HoxA9、HoxA10、マイクロRNA-125a(miR-125a)の発現が脱抑制すること、(3) miR-125aはClec5a/MDL1のmRNAの3'側に結合し、その翻訳を抑制すること、(4) Clec5aが好中球分化に重要な働きをすること、(5) ASXL-1に変異を有するMDS患者細胞ではHoxA9の発現が高いこと、(6) Clec5aの発現はASXL1変異の有無にかかわらずMDS患者一般に低下していること、を明らかにした。これらの成果は、ASXL1変異によるMDS発症のメカニズムの一端を明らかにした。

以前我々は、転写抑制因子Hes1の過剰発現がCMLの急性転化(CML-blast crisis: CML-BC)に関与することをマウスBMTモデルによって示した。また、ミエロイド系のCML-BC患者の40%にHes1の過剰発現があることも報告した。今回の実験では、(1) Hes1がNFkBの活性化を介してMMP9の発現を誘導すること、(2) 誘導されたMMP9が、c-Kitリガンド(SCF)の可溶性(s-cKit-L)を増加させることによっ

てCML-BC細胞の増殖を正に調節する、CML-BC細胞のストローマ細胞への潜り込みを増加させることを介して、CML-BCの進展に寄与することを示唆した。これらの結果はHes1がC/EBPaの発現を抑制することによってCML細胞の分化を阻害して急性転化を誘導するだけでなく、CML-BC細胞の増殖および骨髓生着を強化することによってCML-BCの進展に寄与することを明らかにした。

他の造血器腫瘍においてもHes1高発現例があるか臨床検体を調べたところ、多くの急性骨髄性白血病(AML)やMDS患者ではHes1過剰発現の頻度は低かった。しかしながらFIP1L1-PDGFRaを有する好酸球性白血病5例中2例でHes1過剰発現が認められた。マウスBMTモデルで確かめたところFIP1L1-PDGFRa単独ではT-ALLあるいはMPNを発症したが、Hes1を同時に導入するとAMLを発症した。この白血病細胞は好酸球系前駆細胞マーカーであるSigLecやCD125(IL-5レセプター)を発現していたが、細胞は好酸球顆粒を含まず、PEX、プロテオグリカン、GATA1などの好酸球マーカーは発現していなかった。これらの結果はHes1が細胞分化を抑制することによって白血病に寄与すること以外にNFkB活性化を介して白血病発症に種々の寄与をしようことを示した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計11件)

1. Nakahara, F., Kitaura, J., Nishida, C., Uchida, T., Togami, K., Inoue, D., Matsukawa, T., Enomoto, Y., Kawabata,

- K.C., Chen-Yi, L., Komeno, Y., Izawa, K., Oki, T., Nagae, G., Harada, Y., Harada, H., Otsu, M., Aburatani, H., Hattori, K., and Kitamura, T. (2014) Hes1 promotes blast crisis in chronic myelogenous leukemia through MMP-9 up-regulation in leukemic cells. **Blood** in press.
doi:10.1182/blood-2013-01-476747
2. Sashida, G., Harada, H., Matsui, H., Oshima, M., Yui, M., Harada, Y., Tanaka, S., Mochizuki-Kashio, M., Wang, C., Saraya, A., Muto, T., Hayasi, Y., Suzuki, K., Nakajima, H., Inaba, T., Koseki, H., Huang, G., Kitamura, T. and Iwama, A. (2014) Ezh2 loss promotes development of myelodysplastic syndrome but attenuates its predisposition to leukemic transformation. **Nature Commun.** in press.
<http://www.nature.com/ncomms/index.html>
 3. Ishihara, J., Umemoto, T., Yamato, M., Shiratsuchi, Y., Takaki, S., Petrich, B.G., Nakauchi, H., Eto, K., Kitamura, T., and Okano T. (2014) Nov/CCN regulates long term repopulation activity of murine hematopoietic stem cells via integrin avb3. **Int. J. Hematol.** 99:393-406.
doi:10.1007/s12185-014-1534-x
 4. Uchida, T., Kitaura, J., Nakahara, F., Togami, K., Inoue, D., Maehara, A., Nishimura, K., Kawabata, C. K., Doki, N., Kakihana, K., Yoshioka, K., Izawa, K., Oki, T., Sada, A., Harada, Y., Ohashi, K., Katayama, Y., Matsui, T., Harada, H., and Kitamura, T. (2014) Hes1 up-regulation contributes to the development of FIP1L1-PDGFR α -positive leukemia in blast crisis. **Exp. Hematol.** in press.
doi:10.1016/j.exphem.2014.01.009
 5. Inoue, D., Kitaura, J., Togami, K., Nishimura, K., Enomoto, Y., Uchida, T., Kagiya, Y., Kawabata, K.C., Nakahara, F., Izawa, K., Oki, T., Maehara, A., Isobe, M., Tsuchiya, A., Harada, Y., Harada, H., Ochiya, T., Aburatani, A., Kimura, H., Thol, F., Heuser, M., Levine, R.L., Abdel-Wahab, O. and Kitamura, T. (2013) Myelodysplastic syndromes are induced by histone methylation-altering ASXL1 mutations. **J. Clin. Invest.** 123:4627-4640.
doi: 10.1172/JCI70739
 6. Okochi, N., Yoshimi, A., Sato, T., Ikeda, T., Kumano, K., Taoka, K., Sato, Y., Shinohara, A., Tsuruta, A., Masuda, A., Yokota, H., Yatomi, Y., Takahashi, K., Kitaura, J., Kitamura, T. and Kurokawa, M. (2013) The shortest isoform of C/EBP β , Liver inhibitory protein (LIP), collaborates with Evi1 to induce AML in a mouse BMT model. **Blood** 121:4142-4155.
doi:10.1182/blood-2011-07-368654

7. Harada, Y., Inoue, D., Ding, Y., Imagawa, J., Doki, N., Matsui, H., Yahata, T., Matsushita, H., Ando, K., Shashida, G., Iwama, A., Kitamura, T. and Harada, H. (2013) Runx1/AML1 mutant collaborates with Bmi1 overexpression in the development of human and mouse myelodysplastic syndromes. **Blood** 13:3434-3446. doi:10.1182/blood-2012-06-434423
8. Enomoto, Y., Kitaura, J., Shimanuki, M., Kato, N., Nishimura, K., Takahashi, M., Nakamura, H., *Kitamura, T., and *Sonoki T. (2012) MicroRNA-125b-1 accelerates a C-terminal mutant of C/EBPa (C/EBPa-C(m))-induced myeloid leukemia. **Int. J. Hematol.** 96, 334-341. doi: 10.1007/s12185-012-1143-5
9. Oki, T., Kitaura, J., Watanabe-Okochi, N., Nishimura, K., Maehara, A., Uchida, T., Komeno, Y., Nakahara, F., Harada, Y., Sonoki, T., Harada, H., and Kitamura, T. (2012) Aberrant expression of RasGRP1 cooperates with gain-of-function NOTCH1 mutations in T-cell leukemogenesis. **Leukemia** 26:1038-1045. doi:10.1038/leu.2011.328
10. Enomoto, Y., Kitaura, J., Hatakeyama, K., Watanuki, J., Akasaka, T., Kato, N., Shimanuki, M., Nishimura, K., Takahashi, M., Taniwaki, M., Haferlach, C., Siebert, S., Dyer, M.J.S., Asou, N., Nakakuma, H., *Kitamura, T., and *Sonoki, T. (2011) E \square /miR-125b transgenic mice develop lethal B-cell malignancies. **Leukemia** 25:1849-1856. doi:10.1038/leu.2011.166
11. Kato, N., Kitaura, J., Doki, N., Komeno, Y., Watanabe-Okochi N., Togami, K., Nakahara, F., Oki, T., Enomoto, Y., Fukuchi, Y., Nakajima, H., Harada, Y., Harada, H., and Kitamura, T. (2011) Two types of C/EBPa mutations play distinct roles in leukemogenesis: Lessons from clinical data and BMT models. **Blood** 117:221-233. doi:10.1182/blood-2010-02-270181
- [学会発表] (計 11 件)
- 1.北村俊雄 Lessons from mouse models for myelodysplastic syndromes/overt leukemia and chronic myelogenous leukemia in blast crisis: Insertional mutagenesis induced Evi-1 expression but not Hes1 expression 日本学術振興会 二国間交流事業セミナー (2011年7月14日 九州大学 百年講堂)
- 2.北村俊雄 Animal models for AML, MDS and MPN 日本遺伝子治療学会 教育講演 (2011年7月14日 九州大学 百年講堂)
Vancouver, Canada)
- 3.北村俊雄 Two types of C/EBPa mutations collaborate in inducing leukemia in a mouse BMT model. 第25回 IACRLRD (2011年

9月15日～17日 東京大学本郷キャンパス)

4.北村俊雄 Molecular basis of leukemia, MPN and MDS. 第70回 日本癌学会学術総会シンポジウム (2011年10月3日～5日 名古屋国際会議場)

5.北村俊雄 Mouse models for MDS/overt leukemia and CML-BC 第73回 日本血液学会学術集会 シンポジウム (2011年10月14日～16日 名古屋国際会議場)

6.戸上勝仁、北浦次郎、井上大地、鍵山侑希、内田智之、西村耕太郎、土岐典子、加藤菜穂子、中原史雄、沖俊彦、原田結花、原田浩徳、北村俊雄 Leukemogenesis induced by C-terminal mutations in the basic leucine zipper domain of C/EBP . 第74回日本血液学会 (2012年10月20日 京都国際会議館)

7.中原史雄、北浦次郎、川畑公人、内田智之、鍵山侑希、井上大地、戸上勝仁、沖俊彦、原田結花、原田浩徳、北村俊雄 Molecular Mechanisms of blast crisis in chronic myelogenous leukemia caused by upregulation of Hes1. 第74回日本血液学会 (2012年10月20日 京都国際会議館)

8.Toshio Kitamura: Molecular aspects of leukemic transformation of myelodysplastic syndromes (MDS) and myeloproliferative neoplasm (MPN). 日仏がんワークショップ 招待講演(2012年11月29日～12月1日 徳島 グランドエクスプロード)

9.北村俊雄 : ASXL1 mutations induces an

MDS-like disease in mice via derepression of HoxA9 and miR125a 日仏がん会議 (French Japanese Cancer Meeting) 招待講演 (2013年11月21日 トゥールーズ)

10.北村俊雄 : Hes1 promotes blast crisis of chronic myelogenous leukemia through MMP-9 up-regulation 分子生物学会 ワークショップ (2013年12月4日 神戸)

11.井上大地、北村俊雄 : C-terminal-truncating ASXL1 mutations induce MDS via repression of PRC2 function The 55th American Society of Hematology annual meeting (2013年12月9日 ニューオーリンズ)

[図書] なし

[産業財産権] 出願中 なし 取得 なし

[その他] 研究室ホームページ :

http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/clinical_oncol/

6. 研究組織

(1)研究代表者

北村 俊雄 (Kitamura, Toshio)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号: 20282527

(2)研究分担者

北浦 次郎 (Kitaura, Jiro)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号: 30282651

中原 史雄 (Nakahara, Fumio)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号: 80581181