

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591549

研究課題名(和文) 小児白血病融合転写因子の白血病化と傍白血病症状を呈する下流遺伝子の同定

研究課題名(英文) Detection of leukemogenic and paraleukemic target genes for childhood leukemic chimeric transcription factor

研究代表者

黒澤 秀光 (Hidemitsu, Kurosawa)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：10205239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：t(17;19) B前駆細胞性急性リンパ性白血病(t(17;19)+ALL)は、転座により生じる融合転写因子E2A-HLFが、白血病化とともに骨浸潤、高カルシウム血症、凝固線溶異常を誘導する。E2A-HLFの下流遺伝子PTHrPを同定した。t(17;19)-ALL細胞株にE2A-HLFを導入するとPTHrPが誘導され、E2A-HLFの変異体ではPTHrPは誘導しなかった。t(17;19)+ALL細胞株でPTHrPをノックダウンするとアポトーシスが誘導された。以上よりt(17;19)+ALLにおいてPTHrPはE2A-HLFの下流遺伝子で、高カルシウム血症と白血病化あるいは難治化に関与している。

研究成果の概要(英文)：The E2A-HLF fusion transcription factor generated by t(17;19)(q22;p13) translocation is found in pro-B cell acute lymphoblastic leukemias (ALLs) and promotes leukemogenesis via antiapoptotic function, bone invasion, hypercalcemia and coagulopathy. Here, we demonstrate that t(17;19)+ ALL cells express PTHrP at high levels when compared with other ALL cells. Forced expression of E2A-HLF in t(17;19)- ALL cells up-regulated PTHrP expression, while transactivation domain mutants of E2A or basic domain mutants of HLF did not show PTHrP expression in t(17;19)- ALL cells. These results suggest that PTHrP is a downstream target of E2A-HLF. PTHrP knockdown by the shRNA lentivirus system induced sub-G0G1 and G0G1 accumulation indicating apoptosis in t(17;19)+ ALL cells. These data indicate that PTHrP expression, which is induced by E2A-HLF, is a key element in the protection of t(17;19)+ ALL cells from apoptosis and in the induction of bone invasion and hypercalcemia.

研究分野：小児白血病

キーワード：小児白血病 PTHrP E2A-HLF アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

t(17;19)<sup>+</sup>急性リンパ性白血病(ALL)は小児ALLの1%未満という頻度で、年長児に多く発生し、発症時に骨浸潤・高カルシウム血症や凝固線溶異常症といった特異な傍白血病症状を呈する。また、寛解は導入できるが早期に再発し極めて予後が悪い<sup>1</sup>。t(17;19)<sup>+</sup>ALLの白血病のメカニズムはE2A-HLFの発現によるアポトーシス抑制である<sup>2</sup>。これまでに融合転写因子E2A-HLFの下流遺伝子としてANNEXIN VIII、SRPUL、ANNEXIN II、SLUG、SURVIVIN、CD33、LMO2が同定された<sup>3,4</sup>。しかし、現在までt(17;19)<sup>+</sup>ALLの初発時に発症する高カルシウム血症の原因は確定していない。発症時あるいは再発時に高カルシウム血症を伴った小児ALLのretrospectiveな解析で、22例のうち半分の症例でPTHrPの高値が確認された。また高カルシウム血症を伴った小児ALLの17例中5例でE2A-HLFが検出された<sup>1</sup>。

PTHrPの高発現はt(17;19)<sup>+</sup>ALL以外のALLで報告はないが、成人型T細胞白血病(ATL)は80%にPTHrPの高発現による高カルシウム血症(humoral hypercalcemia of malignancy)を呈し、死亡原因の一つになっている。高カルシウム血症の発症機序は腫瘍細胞が産生し増加したPTHrPが骨芽細胞のparathyroid hormone-1 receptor (PTH1R)を刺激し、RANK ligand (RANKL)の増加とdecoy receptorであるosteoprotegrin (OPG)の産生低下を生じる。さらにRANKLが陽若破骨細胞の分化と増殖を促進し骨吸収を誘導し、高カルシウム血症が生じる。

PTHrPは翻訳後修飾によりシグナルペプチドを有するN末、nuclear localization signal (NLS)を有する中間部分とC末部分に

分かれる。N末PTHrP(1-36)はPTHと相同性を有する領域があり、autocrine/paracrine作用でPTH1Rに結合して高カルシウム血症に関与する<sup>5</sup>。一方、中間部分PTHrPはNLSが存在しているため、中間部分が核内に移行し転写因子様にさまざまなシグナル伝達系遺伝子を活性化し、腫瘍の増殖や抗アポトーシス機能を有していることが知られるようになっている<sup>5</sup>。

## 2. 研究の目的

(1) t(17;19)<sup>+</sup>ALLにおける高カルシウム血症の原因遺伝子がPTHrPであること。また、PTHrPの高発現が、融合転写因子E2A-HLFの下流遺伝子であることを証明する。PTHrP発現のメカニズムを詳細に解明する。

(2) t(17;19)<sup>+</sup>ALLの白血病化・難治化にPTHrPが関与しているかを検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝子発現解析

ヒトALL細胞株よりtotal RNAを抽出し、cDNAを作成し、TaqMan Gene Expression Assays法でReal time PCRを実施した。プライマーはPTHrP: Hs00174969\_m1、PTH1R: Hs00174895\_m1、HPRT1: Hs99999909\_m1、CXCR4: HS00607978\_s1、SNAI1: Hs00195591\_m1、SNAI2: Hs00161904\_m1で7300 Real time PCR System (Applied Biosystem)を用いた。CT法にて発現量を計測した。

### (2) 培養液中の分泌PTHrP定量

培養液中のPTHrP定量はimmunoradiometric assay法(IMRA: ミツビシ)を用いてPTHrPを測定し、1X10<sup>6</sup>細胞あたりの濃度を算出した。

### (3) Immunoprecipitation (IP)-Western法によるPTHrPタンパク発現解析

NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction

Reagents (Thermo Scientific) を用いて核と細胞質の lysates を抽出し、Immunoprecipitation Kit-Dynabeads Protein G (Novex) を使用した。IP に使用した抗体は Sc-20728 (H-137) rabbit polyclonal (Santa Cruz Biotechnology) Western blot には Sc-53936 (1D1) mouse monoclonal (Santa Cruz Biotechnology) を用いた。

(4) RNA 干渉法 (Small interfering RNA) を用いた loss of function 解析

Lenti lox3.7 plasmid (pLL 3.7) はマウス U6 プロモーター下に PTHrP siRNA の oligonucleotide と CMV プロモーター下に GFP 発現する。293FT 細胞に pLL3.7 (Addgene, Cambridge, MA) と packaging vector を cotransfection し生じた lentivirus particle を標的細胞に感染させる。GFP 陽性な感染細胞をフローサイトメーターで sorting して発現解析を行った。PTHrP 発現の消失を real time PCR 法ならびに IP-Western 法にて確認した。細胞周期を BrdU flow kit (BD-Pharmingen) を用いて解析した。

(5) PTHrP のクローニング

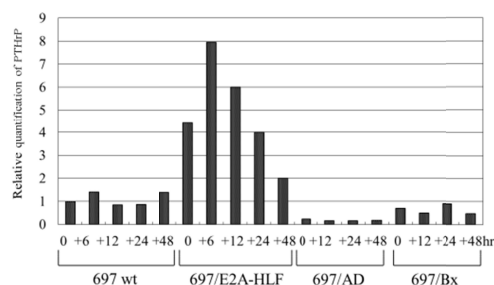
t(17;19)<sup>+</sup>ALL 細胞株 (HAL-01) cDNA をテンプレートに用いた。プライマーは forward 1: 5' -GAGTTTAGTTGTTTGTTCCAGGGG-3' reverse 2: 5' -CTGAACCACTCTCCGCTGCATCGTC-3'。約 500bp 近傍の産物を用いた。Sequence で 177aa と 175aa に相当する PTHrP を cloning したことを確認した。クローニングした PTHrP 177aa を亜鉛誘導発現ベクター pMT-CB6<sup>+</sup> (Dr. F. Rauscher III より譲渡) に組み込み、エレクトロポレーション法により 697 と NaIm6 (ともに t(17;19)<sup>-</sup>ALL 細胞株) と F5.12 (IL-3 依存性マウス pro B 細胞株) に導入した。G418 でセレクションして得られた細胞株の PTHrP の発現を

確認した。

#### 4. 研究の成果

(1) ALL 細胞株における PTHrP 発現解析で、t(17;19)<sup>+</sup>ALL 細胞株は Jurkat 細胞株 (T cell ALL 細胞株) に比べて 4-6 倍の RNA 発現していた。更に PTHrP の発現の低い 697 細胞株に pMT-CB6<sup>+</sup>E2A-HLF を導入した 697/E2A-HLF 細胞に E2A-HLF を高発現すると、PTHrP が誘導できた。この現象は他の ALL 細胞株 (NaIm6, REH) でも確認できた。さらに 697 細胞株に E2A-HLF の変異体 (AD: 転写活性化領域の欠失、Bx: DNA 結合領域の変異) を導入し、誘導すると両変異体とも PTHrP の発現は誘導されなかった (図 1)。以上の結果は PTHrP が E2A-HLF の下流遺伝子であることを強く示唆した。

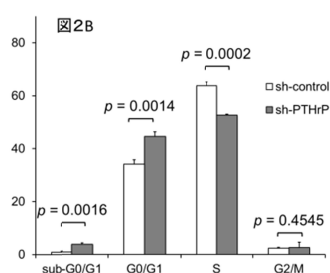
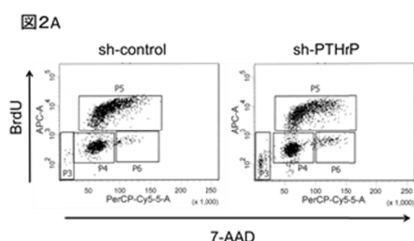
図 1



ALL 細胞株の培養液中の分泌型 PTHrP (N末 34aa) は t(17;19)<sup>+</sup>ALL 細胞株と t(17;19)<sup>-</sup>ALL 細胞株との間に差はなかった。

(2) UOC-B1 (t(17;19)<sup>+</sup>ALL 細胞株) に PTHrP の knockdown 導入後 48 時間の BrdU 取り込みによる FACS 解析を実施した。PTHrP knockdown により、sub-G0/G1 と G0/G1 の増加を認めアポトーシス細胞の増加と G1/G0 arrest が観察された (図 2a, b)。この所見は UOC-B1 細胞株にドミナントネガティブ変異型 E2A-HLF (転写活性化ドメイン欠失と DNA 結合変異を有する) を誘導した時に生じるアポトーシスと類似した所見であった<sup>2</sup>。以上より t(17;19)<sup>+</sup>ALL 細胞株に

においてE2A-HLFはPTHrPを転写誘導し、PTHrPの抗アポトーシスによる白血病化やt(17;19)<sup>+</sup>ALLの予後不良に関与している可能性が示唆された。



(3) FL5.12/pMT+PTHrPでPTHrPを発現誘導するとIL-3非依存性を獲得出来るか検証した。培養細胞に亜鉛添加後にIL-3を除去するとFL5.12/pMT+PTHrPはアポトーシスが誘導された。FL5.12/pMT+E2A-HLFで確認されるIL-3非依存性の獲得は出来なかった<sup>2</sup>。IL-3非依存性をE2A-HLF発現では可能であったが、その下流であるPTHrP単独ではIL-3非依存性を獲得出来ず、他の下流遺伝子と協力して抑制していると考えられた。

(4) 697/pMT+PTHrP株でPTHrPを誘導してPTHrPの機能解析を実施した。Real time PCRによるPTHrPの発現は697 wild type に比べて、697/pMT+PTHrP#12株では亜鉛添加後4時間に18倍の発現誘導があった。この細胞とUOC-B1細胞を用いてPTH1RとCXCR4の発現解析を実施した。PTHrPを誘導してもPTH1R発現は誘導されなかった。すなわちt(17;19)<sup>+</sup>ALLではPTHrPはautocrineに作用し

ていないことが確認され、PTHrPのN'末は細胞増殖には影響していない可能性が高いと示唆された。CXCR4はreal time PCRとflow cytometry法で検索した。いずれの検索でもCXCR4の発現はPTHrPを発現誘導しても変化がないことを確認した。t(17;19)<sup>+</sup>ALLはPTHrPを高発現するが、乳がん細胞とは異なるシグナル伝達系を介して難治化が生じていることが示唆された<sup>6</sup>。PTHrPの下流遺伝子としてSnail (SNAI1) が報告された<sup>7</sup>。Snailは細胞周期調節・細胞分化・アポトーシスに関与している。Snail familyのSlug (SNAI2) はE2A-HLFの下流遺伝子である<sup>4</sup>。E2A-HLF PTHrP発現誘導 Snail family発現というパスウェーを予測して、SNAI1とSNAI2の発現解析をUOC-B1細胞と697/pMT+PTHrP株でPTHrPを誘導して解析した。両者の明確な発現誘導はなかった。

E2A-HLFの下流遺伝子としてPTHrPが発現誘導すること、t(17;19)<sup>+</sup>ALL細胞においてPTHrPはアポトーシスを抑制して白血病化に関与することは証明された。PTHrPの抗アポトーシス機能がどのような機序で生じているかは実験継続中である。

#### < 引用文献 >

Inukai T, et al. Hypercalcemia in childhood acute lymphoblastic leukemia: frequent implication of parathyroid hormone-related peptide and E2A-HLF from translocation 17;19. Leukemia. 2007;21(2):288-296.

Inaba T, et al. Reversal of apoptosis by the leukaemia-associated E2A-HLF chimaeric transcription factor. Nature. 1996;382(6591):541-544.

Kurosawa H, et al. Two candidate

downstream target genes for E2A-HLF. *Blood*. 1999;93(1):321-332.

Inukai T, et al. SLUG, a ces-1-related zinc finger transcription factor gene with antiapoptotic activity, is a downstream target of the E2A-HLF oncoprotein. *Mol Cell*. 1999;4(3):343-352.

Bhatia V, et al. Parathyroid hormone-related protein regulates cell survival pathways via integrin alpha6beta4-mediated activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. *Mol Cancer Res*. 2009;7(7):1119-1131.

Li J, et al. PTHrP drives breast tumor initiation, progression, and metastasis in mice and is a potential therapy target. *J Clin Invest*. 2011;121(12):4655-4669.

Ongkeko WM, et al. Parathyroid hormone related-protein promotes epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer. *PLoS One*. 2014;9(1):e85803.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計10件)

Koyama D, Kikuchi J, Hiraoka N, Wada T, Kurosawa H, Chiba S, Furukawa Y. Proteasome inhibitors exert cytotoxicity and increase chemosensitivity via transcriptional repression of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 査読あり 2014;28:1216-1226.

doi: 10.1038/leu.2013.366.

Sato Y, Kurosawa H, Fukushima K, Okuya M, Yabe H, Arisaka O. Necessary stem cell transplantation using myeloablative

therapy for myelodysplastic syndrome with progression of genotypic abnormalities and TP53 dysfunction in a young adult. *Pediatr Transplant* 査読あり 2014;18:E255-257. doi: 10.1111/ptr.12334.

Zhang X, Inukai T, Hirose K, Akahane K, Kuroda I, Honna-Oshiro H, Kagami K, Goi K, Nakamura K, Kobayashi M, Endo M, Yagita H, Kurosawa H, Thomas Look A, Honda H, Inaba T, Nakazawa S, Sugita K. Oncogenic fusion E2A-HLF sensitizes t(17;19)-positive acute lymphoblastic leukemia to TRAIL-mediated apoptosis by upregulating the expression of death receptors.

*Leukemia*. 査読あり 2012;26:2483-2493.

doi: 10.1038/leu.2012.139.

[学会発表] (計4件)

黒澤秀光, 他. 17;19 転座急性リンパ性白血病の抗アポトーシスと高カルシウム血症は E2A-HLF により誘導された PTHrP が関与している. 第 24 回日本癌病態研究会. 2015. 6. 25 ~ 26. 日光千姫物語(栃木県日光市).

Kurosawa H, et al. Inhibitor of apoptosis protein family gene expression in childhood acute myeloid leukemia (AML). 第 55 回日本小児血液・がん学会. 2013. 11. 29 ~ 12. 1. ヒルトン福岡シーフォーク (福岡県福岡市).

Kurosawa H, et al. Leukostasis in children and adolescents with CML: Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. 第 75 回日本血液学会. 2013. 10. 11 ~ 13. ロントン札幌 (北海道札幌市).

黒澤秀光, 他. 発達障害を伴う小児がん患者への対応 分教室との連携を中心に.

第 116 回日本小児科学会学術集会。2013. 4. 19  
~ 21。広島国際会議場 ( 広島県広島市 )。2013

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

黒澤 秀光 ( Kurosawa, Hidemitsu )

獨協医科大学・医学部小児科・教授

研究番号 : 10205239

### (2) 研究協力者

菊池 次郎 ( Kikuchi, Jiro )

古川 雄祐 ( Furukawa, Yusuke )

犬飼 岳史 ( Inukai, Takeshi )

稲葉 俊哉 ( Inaba, Toshiya )