

平成 25 年 6 月 12 日現在

機関番号：82606
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791094
 研究課題名（和文）MOZ/MLL 融合遺伝子による急性骨髄性白血病発症機構の解明
 研究課題名（英文）Analysis of acute myeloid leukemia development mechanisms induced by MOZ/MLL fusion genes
 研究代表者
 勝本 拓夫（KATSUMOTO TAKUO）
 独立行政法人国立がん研究センター・研究所・研究員
 研究者番号：50469970

研究成果の概要（和文）：

本研究では、主に MOZ/MLL 融合遺伝子による白血病発症における内在性の MOZ や役割を中心に解析を行った。その結果、内在性の MOZ は MOZ/MLL 融合遺伝子の標的遺伝子のクロマチンを転写が起きやすい状態に維持することに必須であることを明らかにした。また下流遺伝子としてがん抑制遺伝子 INK4A の発現制御に関わっていることを明らかにした。以上の結果から、内在性の MOZ は融合遺伝子による標的遺伝子の発現異常が生じ得るようなクロマチン状態を維持することで白血病発症に寄与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, I mainly analyzed roles of endogenous MOZ in leukemogenesis induced by MOZ/MLL fusion genes. As a result, I revealed that endogenous MOZ was essential for maintenance of active histone marks in target gene loci induced by MOZ/MLL fusion genes. Endogenous MOZ was also critical for suppression of INK4A tumor suppressor gene. These results suggest that endogenous MOZ was critical for leukemogenesis to maintain chromatin status to be able to exert aberrant genes expression by MOZ/MLL fusion genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科臨床医学・血液内科学

キーワード：発現制御、癌、幹細胞、発生・分化

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病では、融合遺伝子形成などの遺伝子変異が特に転写制御に関わる遺伝子に多く見られることが知られている。このことから急性骨髄性白血病の分子機序として、転写制御に関わる遺伝子に変異が生じることでその転写制御機構が攪乱され、その結果として異常な増殖や自己複製能の獲得、分化抑制といった形質を獲得することで発症に至ることが想定されている。

これまでの我々の解析からヒストンアセチル化酵素 MOZ は造血幹細胞の自己複製に

必須の遺伝子であり、HoxA9 遺伝子の発現制御に重要であることを明らかにしてきた。またこれまでの知見から白血病幹細胞は正常の幹細胞の自己複製機構を一部利用することで自己複製能を獲得していることが知られている。これらの結果から我々は内在性の MOZ が白血病幹細胞の自己複製にも重要である可能性を考え、MOZ 欠損造血前駆細胞に種々の白血病融合遺伝子を導入して細胞の不死化及び白血病発症の有無について解析を行った。その結果、MOZ 欠損造血前駆細胞に MOZ/MLL 融合遺伝子を導入しても

細胞の不死化及び白血病発症は見られないこと、主要な標的遺伝子である HoxA9/Meis1 の発現誘導が見られないことを明らかにした。また MOZ 融合遺伝子については条件によって不死化及び HoxA9 の発現誘導は見られるが、白血病発症及び Meis1 の発現誘導は見られないことを明らかにしてきた。しかしながら、その詳細な分子機序については未解明であった。

また臨床的には MOZ/MLL 融合遺伝子による白血病は予後が悪く、特異的な分子標的薬も無いため、新薬開発に必要な白血病発症の分子機序の解明が期待されていた。

2. 研究の目的

主に MOZ/MLL 融合遺伝子を MOZ 遺伝子欠損造血前駆細胞に導入することで作製した白血病細胞を用いて、クロマチン免疫沈降などの生化学的解析や遺伝子発現解析を行なって MOZ/MLL 融合遺伝子による白血病発症における内在性の MOZ の作用機序及びその下流遺伝子を明らかにすることを目的とする。またその成果から、MOZ/MLL 融合遺伝子による白血病の治療標的を明らかにすることも目的とする。

3. 研究の方法

(1) MOZ 融合遺伝子による標的遺伝子のクロマチン制御における内在性の MOZ の役割

① Meis1 遺伝子の発現解析

胎生 14.5 日の MOZ 欠損マウス胎仔肝臓から細胞を調製し、Lineage, Sca-1, CD34, CD71 に対する蛍光抗体で染色した。染色後造血幹細胞を含む Lineage-, CD71-, CD34+ Sca-1+ 分画の細胞をフローサイトメトリーを用いて分取した。回収した細胞から RNA を抽出して cDNA を合成して、定量的 RT-PCR 法を用いて Meis1 遺伝子の発現量を解析した。各サンプルの cDNA 量を b-actin の発現量で平準化した。

② 標的遺伝子領域のヒストン修飾の解析

MOZ 融合遺伝子白血病細胞を 1%ホルマリン液で固定した後に超音波で DNA を断片化して、種々のヒストン修飾に対する抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行った。回収した DNA 断片を精製/回収後、サイバークリーンを用いた定量的 PCR 法で各領域のヒストン修飾を解析した。また各サンプルの DNA 量をインプット DNA 量で平準化した。

(2) MOZ 融合遺伝子による白血病発症における Meis1 の役割

胎生 14.5 日の MOZ 欠損マウス胎仔肝臓からマグネティックビーズを用いて、分化マーカー陰性分画の細胞を分取した。1 日培養後 MOZ-TIF2 融合遺伝子(MT2)を GFP マーカーを

同時に発現するレトロウイルスを用いて導入した。3 日後 Meis1 遺伝子もしくは Mock を hNGFR マーカーと同時に発現するレトロウイルスを用いて導入して 2 日間更に培養した。培養後細胞を回収して、 2×10^5 細胞を半致死量放射線照射したマウスに移植した。移植後 4 週間毎に採血を行い、GFP 陽性率と Mac-1 陽性率を測定して白血病発症を評価した。

(3) MOZ 融合遺伝子の下流遺伝子の発現解析

① MOZ 融合遺伝子白血病細胞の発現解析

MOZ 欠損白血病細胞から回収して RNA を抽出、cDNA 合成を行い、定量的 RT-PCR 法で INK4A, Bmi1 遺伝子の発現量を解析した。各サンプルの cDNA 量を b-actin の発現量で平準化した。

② Meis1 強制発現による INK4A 遺伝子の発現変化

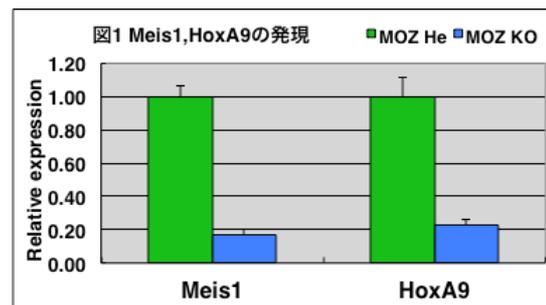
MOZ 欠損造血前駆細胞に MOZ 融合遺伝子をレトロウイルスを用いて導入/培養後、レトロウイルスを用いて Meis1 もしくは Mock を導入してさらに培養、2 日後に細胞を回収して RNA を抽出、cDNA 合成を行い、定量的 RT-PCR 法で INK4A 遺伝子の発現量を解析した。各サンプルの cDNA 量を b-actin の発現量で平準化した。

4. 研究成果

(1) MOZ 融合遺伝子による標的遺伝子のクロマチン制御における内在性の MOZ の役割

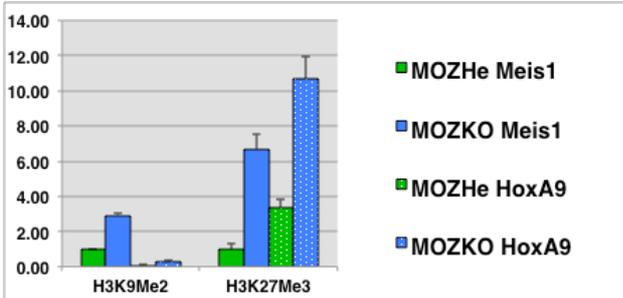
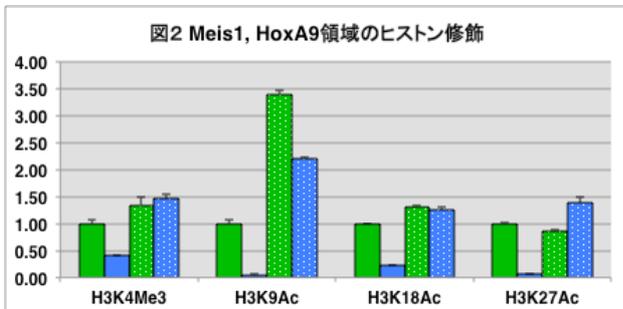
① Meis1 遺伝子発現における MOZ の役割

これまでの報告から MOZ/MLL 融合遺伝子による白血病では、HoxA9/Meis1 遺伝子の発現が恒常的に活性化していることが知られている。これまでの解析から HoxA9 が MOZ の標的遺伝子の一つであることを明らかにしてきたが、Meis1 遺伝子については未解明であった。そこで Meis1 遺伝子は造血幹・前駆細胞で発現が高いことから MOZ 欠損マウスの胎仔肝臓から造血幹・前駆細胞を多く含む分画を分取して Meis1 遺伝子の発現を解析した。その結果、Meis1 遺伝子は HoxA9 遺伝子と同様に MOZ 欠損造血幹・前駆細胞分画で発現が低下していた。このことから、Meis1 も HoxA9 と同様に MOZ の標的遺伝子の一つであることが示唆された。(図 1)



② MOZ 融合遺伝子の標的遺伝子領域でのクロマチン制御機構の解析

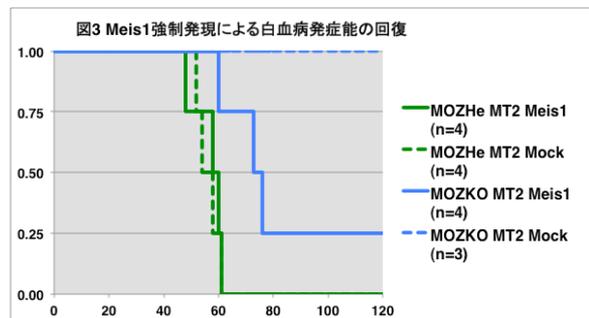
MLL 融合遺伝子を発現する白血病細胞では主な標的遺伝子である HoxA9/Meis1 領域のヒストン修飾について特に遺伝子発現が活発な状態で見られるヒストン修飾の増加が見られることが明らかになっている。MOZ もヒストン修飾酵素であることから MOZ 融合遺伝子を導入した MOZ 欠損白血病細胞において標的遺伝子のヒストン修飾についてクロマチン免疫沈降法を用いて解析を行った。その結果、MOZ 欠損 MOZ 白血病細胞で発現誘導が見られない Meis1 遺伝子の領域ではヒストン H3 K9, K18, K27 のアセチル化 (Ac)、ヒストン H3 K4 のトリメチル化 (Me3) といった転写が活性化している状態のクロマチンで見られるヒストン修飾が減少していた。逆に転写が抑制されている状態のクロマチンで見られるヒストン H3 K9 のジメチル化 (Me2)、ヒストン H3 K27 のトリメチル化 (Me3) が増加していた。一方発現誘導が見られる HoxA9 遺伝子領域のヒストン修飾については、ヒストン H3 K27Me3 は MOZ 欠損白血病細胞で増加しているが、他のヒストン修飾は MOZ ヘテロ欠損白血病細胞と大きな違いは見られなかった。これらの結果から、内在性の MOZ は MOZ/MLL 融合遺伝子の標的遺伝子領域のクロマチンを転写が活性化されている状態に維持することで HoxA9/Meis1 遺伝子の恒常的活性化や白血病発症に寄与していることが示唆された。(図 2)



(2) MOZ 融合遺伝子による白血病発症における Meis1 の役割

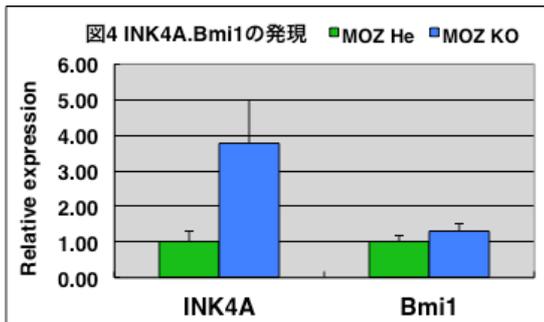
これまでの報告から Meis1 遺伝子は HoxA9 遺伝子による転写を協調的に制御していること、Meis1 との共発現により HoxA9 による白血病発症に必要な期間を大幅に短縮する

ことが明らかとなっている。また MOZ 融合遺伝子では HoxA9/Meis1 の発現誘導が見られること、MOZ 欠損白血病細胞では Meis1 遺伝子の発現誘導が見られないことから MOZ 欠損白血病細胞で白血病発症が見られない原因として Meis1 遺伝子の発現誘導が起らないことが原因として考えられる。そこで、MOZ 欠損白血病細胞に Meis1 遺伝子を導入した後にその細胞を移植して白血病発症が見られるかについて解析を行った。その結果、MOZ 欠損白血病細胞に Meis1 遺伝子を導入することで発症までの期間は MOZ ヘテロ欠損白血病細胞よりやや遅れるが白血病発症が見られた。また細胞表面抗原の発現から、白血病の型も MOZ ヘテロ欠損白血病細胞と同様であった。この結果から、MOZ 融合遺伝子による白血病発症には、HoxA9 と同様に Meis1 の恒常的活性化が必須であることが示唆された。(図 3)

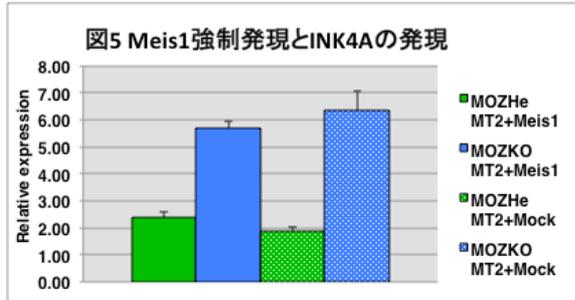


(3) MOZ 融合遺伝子の下流遺伝子の発現解析

MOZ 欠損白血病細胞では、細胞の不死化能の獲得は見られるが、依然として形成されるコロニー数、細胞数は MOZ ヘテロ欠損白血病細胞に比べて減少している。これまでに MLL 融合遺伝子白血病の細胞で Meis1 遺伝子を欠損させると細胞周期抑制因子の INK4A 遺伝子の発現が上昇することが知られている。そこで MOZ 欠損白血病細胞では Meis1 遺伝子の発現誘導が見られないことから、INK4A 遺伝子はその原因の一つと考え、その発現について定量的 RT-PCR 法で解析を行った。その結果、MOZ 欠損白血病細胞でも INK4A 遺伝子の発現が上昇していることがわかった。INK4A 遺伝子の制御に関わるポリコム群遺伝子 Bmi1 の発現は MOZ ヘテロ欠損白血病細胞と比べて変化がないことからこの発現上昇は Bmi1 を介した制御ではないことが示唆された。(図 4)



さらに INK4A の発現上昇が Meis1 の発現低下によるものかについて MOZ 欠損白血病細胞に Meis1 遺伝子を強制発現させることで INK4A 遺伝子の発現量が低下するか解析を行った。その結果、INK4A 遺伝子の発現量は低下しなかった。この結果から MOZ 欠損白血病細胞で見られる INK4A の発現増加は予想と異なり、Meis1 の発現低下によるものではないことが示唆された。(図 5)



以上の本研究を通じて、内在性の MOZ は MOZ/MLL 融合遺伝子による白血病発症において、主な標的遺伝子の Meis1 遺伝子領域においてクロマチン状態を活性化状態に維持することで Meis1 遺伝子の恒常的活性化及び白血病発症において重要な役割を果たしていることが示唆された。MOZ 欠損造血前駆細胞に MLL 融合遺伝子を導入しても HoxA9/Meis1 遺伝子の両方の発現誘導が見られないことから、恐らく MLL 融合遺伝子の場合には HoxA9 遺伝子領域においても内在性の MOZ が同様の機能を果たしていることが考えられる。また今回新たな標的遺伝子として細胞周期抑制因子の一つである INK4A 遺伝子の発現抑制に内在性の MOZ が関与していることが明らかとなった。MOZ/MLL 融合遺伝子による白血病における INK4A 遺伝子の役割はまだ明らかではないが、今後の解析からその機能が明らかになることが期待される。

今後の課題として今回明らかにできなかった MOZ/MLL 融合遺伝子白血病の維持に対する内在性の MOZ の役割について解明する必要がある。白血病の維持に内在性の MOZ が必要であれば MOZ の機能阻害剤が MOZ/MLL 白血病の分子標的薬の候補になることが期待される。

本研究で得られた知見は、特に今まで HoxA9 と比べて不明な点が多かった Meis1 の発現制御及び MOZ/MLL 白血病で見られる恒常的活性化の分子機序に大きな洞察を与えるものであると考えられる。またこれらの知見がこれまで分子標的治療薬がない MOZ/MLL 白血病の治療法開発の進展に寄与することが期待される。

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 3 件)

① 勝本拓夫、北林一生; 「造血器腫瘍 転写制御」 日本臨床 査読無 70, 2012, 75-78

② 勝本拓夫、北林一生; 「転写共役因子を介した造血幹細胞と白血病幹細胞の制御機構」 Mebio 査読無 28, 2011, 9-17

③ Yuta Mishima, Satoru Miyagi, Atsunori Saraya, Masamitsu Negishi, Mitsuhiro Endoh, Takaho A. Endo, Tetsuro Toyoda, Jun Shinga, Takuo Katsumoto, Tetsuhiro Chiba, Naoto Yamaguchi, Issay Kitabayashi, Haruhiko Koseki, Atsushi Iwama; The Hbo1-Brd1/Brpf2 complex is responsible for global acetylation of H3K14 and required for fetal liver erythropoiesis. Blood 査読有 118, 2011, 2443-53

[学会発表] (計 8 件)

① 勝本拓夫、山形和恒、北林一生、「Roles of MOZ in leukemia development and HoxA9/Meis1 expression」、第 74 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 ロイトン札幌他

② Takuo Katsumoto, Issay Kitabayashi, 「Histone acetyltransferase MORF and MOZ are essential for hematopoiesis and self renewal of hematopoietic stem cells」 10th ISSCR annual meeting 2012 Jun. Yokohama, Japan

③ 勝本拓夫、北林一生、「MOZ is critical for MOZ/MLL-fusion-induced HoxA9/Meis1 expression and leukemia development」、第 10 回幹細胞シンポジウム 2012 年 5 月 淡路夢舞台

④ 嶋晴子、相川祐規子、篠美花、山形和恒、勝本拓夫、古関明彦、渡邊利雄、北林一生

「Critical pathways for maintenance of stem cells in acute myeloid leukemia」

第 10 回幹細胞シンポジウム 2012 年 5 月
淡路夢舞台

⑤ 勝本拓夫、「ヒストンアセチル化酵素 MOZ の急性骨髄性白血病における役割」、平成 23 年度個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ、2012 年 1 月 琵琶湖ホテル

⑥ Takuo Katsumoto, Issay Kiyabayashi、
「MOZ is critical for MOZ/MLL-fusion induced HoxA9/Meis1 expression and leukemia development」、53rd ASH annual meeting and exposition、2011 Dec. San Diego, USA

⑦ 小川原陽子、勝本拓夫、内海健、河野公俊、北林一生
「The critical role of YB-1 in NPMc-induced acute myeloid leukemia」
第 73 回日本血液学会学術総会 2011 年 10 月
名古屋国際会議場

⑧ 勝本拓夫、北林一生、「Histone acetyltransferase MOZ and MORF are essential for hematopoiesis and self renewal of hematopoietic stem cells」、第 9 回幹細胞シンポジウム、2011 年 5 月 泉ガーデンギャラリー

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勝本 拓夫 (KATSUMOTO TAKUO)
独立行政法人国立がん研究センター・
研究所・研究員
研究者番号：50469970