

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791158

研究課題名（和文）急性リンパ性白血病に発現される CD33 抗原の解析

研究課題名（英文）The analysis of CD33 antigens expressed in acute lymphoblastic leukemia

研究代表者

赤羽 弘資 (AKAHANE KOSHI)

山梨大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90377531

研究成果の概要（和文）：

我々はこれまでに、小児急性リンパ性白血病(ALL)の中でも極めて予後不良な 17;19 転座型 ALL では骨髄球系抗原の CD33 が高頻度に発現されており、転座由来の E2A-HLF 融合転写因子が CD33 の発現を誘導していることを報告してきた。本研究は ALL における CD33 発現誘導の機序を解明することを目的としている。今回の解析で我々は、E2A-HLF による *CD33* 遺伝子の発現誘導には転写開始点下流の PEA3 結合部位が重要であることを見出し、この機序は代表的な小児難治性 ALL である Philadelphia 染色体陽性 ALL と 11q23 転座型 ALL の CD33 発現においても必須であることを確認した。

研究成果の概要（英文）：

We previously reported frequent expression of myeloid antigen CD33 on t(17;19)-ALL, which shows the poorest outcome in childhood ALL, and that E2A-HLF fusion transcription factor derived from t(17;19) induces CD33 expression. The objective of this study is to elucidate the mechanism of CD33 expression ALL. We found that the PEA3 binding sites located downstream of the start site of *CD33* gene are important for the induction by E2A-HLF and confirmed that this mechanism is also essential for CD33 expression in both Philadelphia chromosome-positive ALL and ALL with 11q23 chromosomal translocations, which are representative refractory childhood ALLs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：急性リンパ性白血病、骨髄球系抗原、CD33、E2A-HLF

## 1. 研究開始当初の背景

急性リンパ性白血病(ALL)は T または B リンパ球前駆細胞の白血化であるが、このうち 5～32% の症例で骨髄球系抗原の発現が認められる。最近、単球系への分化能を併せ持つリンパ球前駆細胞の存在が確認され、ALL における骨髄球系抗原発現の意義が改めて注目されている。このうち CD33 の発現は、治療成績が改善した今日においても小児 B 前駆

細胞型 ALL の重要な予後不良因子であると報告されている (Mejstříková et al. Leukemia 2005)。一方、骨髄球系細胞の CD33 発現には転写因子 PU.1 が中心的な役割を果たすことが報告されているが、ALL における CD33 の発現機序は不明である。我々は、小児 ALL の中でも著しく予後不良である 17;19 転座型 ALL では高頻度に CD33 が陽性であり、17;19 転座に由来する *E2A-HLF* 融合遺伝子が CD33 の発

現を誘導することを報告した(Akahane et al. Leukemia 2010)。この知見は、ALLにおけるCD33の発現機序の一つとして、転座に由来する融合遺伝子の関与を初めて明らかにするとともに、小児ALLの予後不良因子としてのCD33の意義を解明するための大きな手掛かりになると考えられる。

## 2. 研究の目的

ALLにおいて、E2A-HLFをはじめとする転座由来の融合遺伝子産物が、CD33の発現を誘導する具体的な機序を解明し、これらの発現が白血病細胞の増殖や生存、薬剤感受性へ与える影響を解析する。

## 3. 研究の方法

(1) 17;19転座由来E2A-HLFによるCD33発現誘導の機序の解明

17;19転座型ALL細胞株やE2A-HLFを遺伝子導入したCD33陰性B前駆細胞型ALL細胞株を用いて、E2A-HLFやPU.1のDNA結合能をゲルシフト・アッセイで解析した。

また、E2A-HLFによるCD33の発現誘導に重要な領域を同定するために、前記の細胞株を用いて、ルシフェラーゼによるレポーター・アッセイを行った。

(2) 11q23転座型ALLやPhiladelphia染色体陽性ALLにおけるCD33発現誘導機序の解明

代表的な小児難治性ALLである11q23転座型ALLとPhiladelphia染色体(Ph1)陽性ALLにおいても、CD33が高頻度に発現されることが知られている。そこで、これらの細胞のCD33の発現誘導に重要な領域を同定するために、(1)と同様にルシフェラーゼによるレポーター・アッセイを行った。

## 4. 研究成果



図1. CD33 遺伝子プロモーター領域の模式図

(1) CD33 遺伝子プロモーターの転写開始点上流には E2A-HLF が結合する配列と類似した塩基配列 (E2A-HLF 結合候補配列) が複数存在するが (図 1. ①)、この配列に E2A-HLF が直接結合する可能性は、ゲルシフト・アッセイによる解析で否定された。また、E2A-HLF 導入細胞で CD33 遺伝子のプロモーター活性を解析したところ、E2A-HLF 発現によるプロモータ

ーの活性化は、E2A-HLF 結合候補配列を欠失させても維持された。

これらの結果から、E2A-HLF が直接 CD33 遺伝子プロモーターに結合して CD33 の発現を誘導する可能性は否定された。

(2) CD33 遺伝子の転写開始点から約 400bp 下流には、前述した PU.1 の結合配列が存在する (図 1. ②)。CD33 遺伝子 exon1 の上流で PU.1 結合配列を含む約 200 塩基の領域 (+296/+508) のプロモーター活性を、E2A-HLF を遺伝子導入した 697 細胞で検討したところ、Zn の添加により E2A-HLF が発現されると、-839/+508 と同様に +296/+508 のプロモーター活性が誘導されることが確認された (図 2)。このことから、E2A-HLF による CD33 の発現誘導には、PU.1 結合配列を含む +296/+508 領域が重要であることが示唆された。

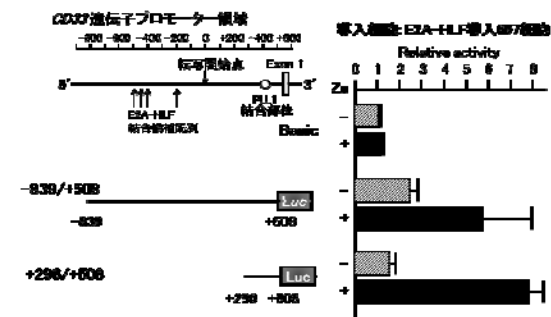


図2. E2A-HLFによるCD33遺伝子プロモーターの活性化 (ルシフェラーゼによるレポーターアッセイ)

そこで、E2A-HLF が PU.1 の活性化を介して CD33 の発現を誘導する可能性について E2A-HLF 導入細胞で検討したところ、E2A-HLF によって CD33 の発現が誘導されても、PU.1 の遺伝子発現や DNA 結合能は誘導されなかった。また、+296/+508 領域のうち PU.1 結合配列を変異させると、骨髓球系細胞株ではプロモーター活性が低下したのに対して、17;19 転座型 ALL 細胞株では活性が維持されていた。以上の結果から、骨髓球系細胞とは異なり、E2A-HLF による CD33 遺伝子プロモーターの活性化において、PU.1 の関与は低いことが示唆された。

(3) 前述した+296/+508領域には、PU.1結合配列をはさんで5'側にSP-1結合配列が、3'側に3か所のPEA3結合配列が存在する。そこで、E2A-HLFによるCD33発現誘導に重要な部位を同定するために、5'側の領域のみを含むレポーターと3'側の領域のみを含むレポーターの活性を17;19転座型ALL細胞株で検討したところ、PEA3結合配列を含む3'側の領域(+426/+508)でのみ活性が維持された(図3)。

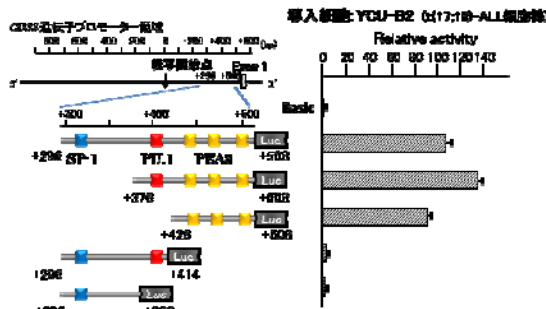


図3. +296/+508領域におけるプロモーター活性 (ルシフェラーゼによるレポーターアッセイ)

次に、3カ所のPEA3結合配列の変異導入によるプロモーター活性の変化を解析したところ、図4に示す配列のAまたはBに変異を導入すると、17;19転座型ALL細胞株ではCD33のプロモーター活性は約1/3に低下し、2ヶ所に変異を導入すると10%以下にまで低下した(図4)。

これらの結果から、E2A-HLFによるCD33遺伝子の発現誘導には、転写開始点下流のPEA3結合配列が重要であることが確認された。

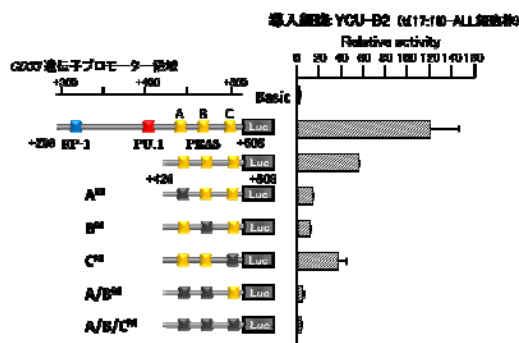


図4. PEA3結合配列の変異導入によるプロモーター活性の変化 (ルシフェラーゼによるレポーターアッセイ)

(4) CD33を発現している11q23転座型ALL細胞株(KOPB26, KOCL50)とPhiladelphia染色体(Ph1)陽性ALL細胞株(YAMN73)でCD33遺伝子のプロモーター活性を解析したところ、17;19転座型ALL細胞株と同様に+426/+508

領域のプロモーター活性が確認され、PEA3結合配列の変異導入により活性は著しく低下した(図5)。

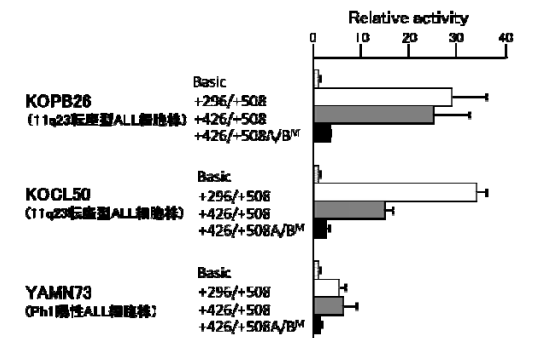


図5. 11q23転座型およびPh1陽性ALLにおけるCD33遺伝子プロモーター活性 (ルシフェラーゼによるレポーターアッセイ)

この結果から、11q23転座型ALLやPh1陽性ALLのCD33発現においても、プロモーター上のPEA3結合配列が重要であることが確認された。

(5) PEA3 siteに結合する転写因子としてはETV1、ETV4、ETV5が知られており、これらはEwing肉腫における転座でEWS遺伝子とfusionを形成して腫瘍発生に関与していることが報告されている。そこで17;19転座型ALL細胞株でこれらの発現レベルを解析したところ、CD33の発現レベルとは明らかな相関を認めなかった。また、E2A-HLFを遺伝子導入したB前駆細胞型ALL細胞株で前述のPEA3結合転写因子の発現を解析したところ、E2A-HLFによりCD33の発現が誘導されても、PEA3結合転写因子の遺伝子発現には変化を認めなかった。

以上の結果から、小児難治性ALLにおけるCD33の発現誘導において、プロモーター上のPEA3結合配列が重要であることが確認された。この結果から、E2A-HLFをはじめとする転座由来の融合遺伝子は、PEA3結合配列に作用する転写因子の活性化を介してCD33の発現を誘導すると推測されるが、17;19転座型ALLの解析ではE2A-HLFによるETV1、ETV4、ETV5の明らかな誘導は確認できなかった。PEA3結合配列は代表的な小児難治性ALLである11q23転座型ALL細胞株やPh1陽性ALLのCD33発現においても必須であることから、CD33発現に関与する転写因子の発現は白血病の発症や進展にも関与して、その結果としてCD33の発現が予後不良のマーカーになっている可能性も考えられる(図6)。そのため、ALLにおけるPEA3結合配列を介したCD33発現誘導の機序の解明は、難治性ALLに対する新たな治療戦略の糸口になると期待される。

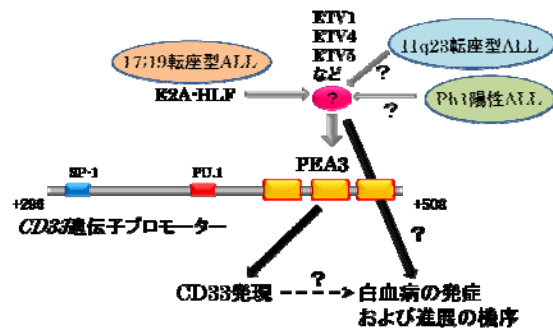


図6. 結果のまとめ

## 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)

[その他]

ホームページ等

山梨大学小児科ホームページ フレッシュ・ペーパー・エクスプレス

<http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/pediatr/fpe/fpe100819.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

赤羽 弘資 (AKAHANE KOSHI)

山梨大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90377531

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし