

## 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 6 月 7 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：23791160

研究課題名（和文）B前駆細胞性白血病における LMO2 過剰発現の機序と意義に対する検討

研究課題名（英文）Aberrant expression of LMO2 in B-precursor ALL

研究代表者

廣瀬 衣子 (HIROSE KINUKO)

山梨大学・医学工学総合研究部・医学研究員

研究者番号：70436880

研究成果の概要(和文)：MLL陽性ALL株ではLMO2の蛋白発現が比較的低いにもかかわらずLMO2およびhHEXの遺伝子発現が高い傾向がみられた。さらにLMO2、hHEXともに発現が高い細胞株にLMO2のsiRNAを導入すると、hHEXの遺伝子発現が抑制された。以上からMLL陽性ALLを除く17;19転座型ALLなどのB前駆細胞型ALLでは、LMO2の過剰発現がhHEXの発現を誘導し白血病の発症に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In MLL-rearranged ALL cell lines, LMO2 protein expression was relatively low despite their higher gene expression levels of hHEX and LMO2. And introduction of siRNA against LMO2 into LMO2/hHEX-expressing B-precursor ALL cell lines significantly downregulated hHEX gene expression. These observations suggest the involvement of LMO2/hHEX pathway in leukemogenesis of B-precursor ALL particularly with t(17;19), but not MLL-arrangement.

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：医師薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：LMO2、B細胞性白血病

### 1. 研究開始当初の背景

LMO2は、小児T細胞性急性リンパ性白血病(T-ALL)の染色体転座の切断点である11p13領域からクローニングされた転写因子で、ノック・アウト・マウスは貧血のために胎生致死であり、トランスジェニック・マウスではT細胞分化が抑制され、蓄積された未分化T細胞からリンパ腫が発症する。さらに、先天性重症複合型免疫不全症に対する遺伝子治療において、一部の患者でレトロ・ウイルスがLMO2遺伝子の上流域に挿入されてLMO2遺伝子の過剰発現が起こりT-ALLを発症するという事故が起こり、はからずもヒトにおいてもLMO2遺伝子発現の破綻がT-ALLの発症に

至ることが直接的に証明された。

一方でLMO2のB細胞への関与はいままでに検討されてこなかったが、われわれはB前駆細胞型ALLのなかでも全例が短期間で再発し極めて予後不良な17;19転座型ALLにおいて、転座によって形成されるE2A-HLF融合遺伝子がLMO2の発現を誘導し白血病の発症へと至らせる可能性を見いだした。この解析の中で17;19転座型ALLと同レベルのLMO2発現がB前駆細胞型ALL細胞株の約1/3で認められ、特に11q23転座型ALL株で高頻度に認められた。

臍帯血から分離した造血幹細胞ではLMO2が17;19転座型ALLと同レベルに発現されていたのに対して、CD34陽性/CD19陽性の極め

て早期の分化段階の B 前駆細胞では LMO2 の遺伝子発現は約 1/100 に低下しており、それ以降の分化段階でも低い発現レベルが維持されていた。一方、17;19 転座型 ALL 株の LMO2 発現を siRNA で抑制したところ、B 細胞の初期分化に關与する遺伝子群の発現が誘導された。こうした知見から、本来は B 細胞の初期分化過程で抑制される LMO2 の発現が、17;19 転座などの結果として高レベルで維持されることによって ALL 細胞が未熟な分化段階で維持され、白血病の発症につながることを示唆された。

さらに McCormack らは、T-ALL 患者の検体を用いたマイクロアレイ解析で LMO2 が過剰発現することで *Lyl1*, *hHEX*, *Kit*, *Nfe2* といった遺伝子の発現が誘導されており、このうち *hHEX* を過剰発現させると胸腺細胞が長期間生存することから、*hHEX* が T 細胞の自己複製に關与していることを報告した (Science, 2010)。このことは T-ALL では *hHEX* が LMO2 の下流遺伝子として働き、白血病の発症に關与していることを示唆している。*hHEX* は、ホメオボックスファミリーに属する転写因子で、LMO2 と同様にノック・アウト・マウスでは貧血のために胎生致死であり、トランスジェニック・マウスでは、T 細胞系腫瘍が高頻度に発生することが以前から知られている。

## 2. 研究の目的

本研究では、B 細胞の正常分化の過程とその破綻による白血病の発症における LMO2 の意義をさらに明らかにすること、なかでも LMO2 の下流遺伝子として *hHEX* が關与する可能性とその機序を解明することにより、B 前駆細胞型 ALL の新たな治療戦略の糸口を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) *hHEX* の遺伝子発現の解析

B 前駆細胞型 ALL 細胞株 31 株 (17;19 転座型 4 株、MLL 陽性 9 株、Ph1 陽性 6 株、その他 12 株) および Burkitt' s リンパ腫株 4 株、EB ウイルス感染正常 B 細胞株 4 株について、*hHEX* の遺伝子発現を real-time PCR 法で解析し、LMO2 遺伝子および蛋白発現との相関を調べる。

### (2) *hHEX* 蛋白発現の解析

(1) で遺伝子解析を行った B 前駆細胞型 ALL 細胞株 31 株における *hHEX* 蛋白発現を Western blotting 法で解析したのちデンストメトリーで半定量化し、内在性コントロールの Tubulin 蛋白の発現レベルで補正して遺伝子発現との相関を調べる。

### (3) LMO2 のノック・ダウンによる変化

B 前駆細胞型 ALL における LMO2 の過剰発現が、*hHEX* の発現に關与している可能性を検証するため、LMO2、*hHEX* とともに遺伝子および蛋白発現が高い Ph1 陽性 ALL 細胞株の KOPN72bi 株を用いて、エレクトロポレーション法によって LMO2 の siRNA を導入し、LMO2、*hHEX* の遺伝子および蛋白発現の変化について解析する。siRNA は、それぞれ結合部位の異なる 3 種類の shRNA (8230, 8232, 224016) と、それらを混合して使用し、LMO2 および *hHEX* の遺伝子発現レベルを real time RT-PCR で半定量解析する。

### (4) *hHEX* のノック・ダウンによる変化

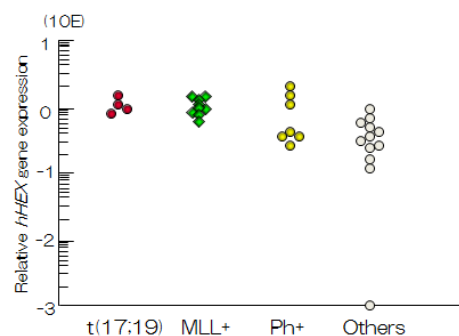
(3) において *hHEX* が LMO2 の下流遺伝子であると証明された場合、さらに B 前駆細胞型 ALL における、生存と未熟性の維持に対する *hHEX* の關与について明らかにする。(3) と同様にエレクトロポレーション法で B 前駆細胞型 ALL 細胞株に *hHEX* の siRNA を導入して *hHEX* の発現をノック・ダウンし、白血病細胞の分化や細胞周期、細胞死への影響について解析する。

## 4. 研究成果

### (1) *hHEX* の遺伝子発現の解析

B 前駆細胞型 ALL 細胞株 31 株、Burkitt' s リンパ腫株 4 株、EB ウイルス感染正常 B 細胞株 4 株の計 39 株の *hHEX* の遺伝子発現について real-time PCR 法で解析したところ、LMO2 遺伝子が高いレベルで発現されている 17;19 転座型 ALL 株や MLL 陽性株では、特に高いレベルの *hHEX* 遺伝子発現を認めた (図 1)。

(図 1) 染色体転座と *hHEX* 遺伝子発現

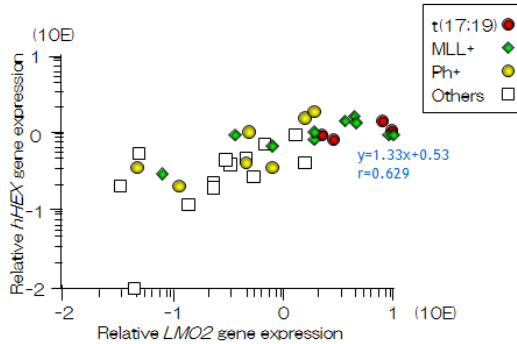


また、縦軸に *hHEX*、横軸に LMO2 の遺伝子発現レベルを示しグラフにすると、LMO2 と *hHEX* の遺伝子発現レベルに強い相関関係を認めた (図 2)。

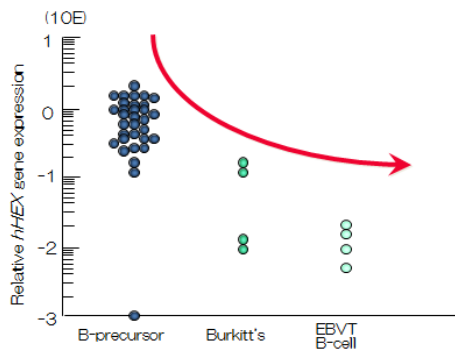
さらに、*hHEX* の遺伝子発現レベルは B 前駆細胞型 ALL 株に比べて Burkitt' s リンパ腫株や EB ウイルス感染正常 B 細胞株において低く、LMO2 遺伝子と同様に B 細胞の分化とともに

に遺伝子発現レベルが低下していく傾向を認めた (図 3)。

(図2) *hHEX*遺伝子と*LMO2*遺伝子の発現



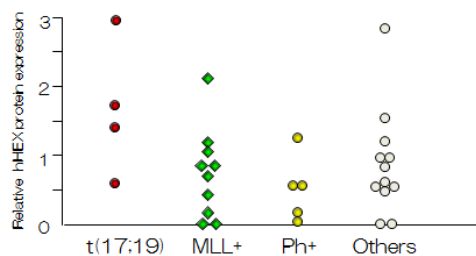
(図3) B細胞系細胞株における*hHEX*遺伝子発現の比較



(2) *hHEX* 蛋白発現の解析

B 前駆細胞型 ALL 株における *hHEX* の蛋白発現を Western blotting 法で半定量化して Tubulin 蛋白の発現レベルで補正して染色体転座ごとに比較した (図 4)。17;19 転座型 ALL 株では *hHEX* は高い発現を認めたのに対して、MLL 陽性株では、約半数の株で比較的低レベルにとどまった。

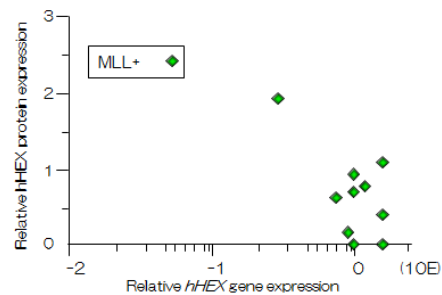
(図4) 染色体転座と*hHEX*蛋白発現



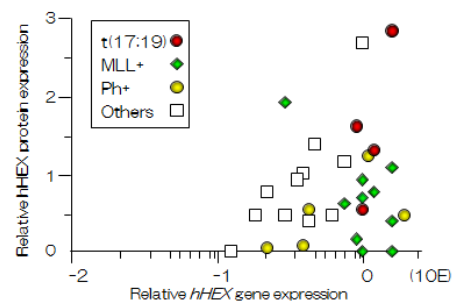
そこで、*hHEX* 遺伝子と *hHEX* 蛋白の発現についてグラフにすると、MLL 陽性株では *hHEX* 遺伝子の発現は高くても *hHEX* 蛋白の発現が低い株が多く、MLL 陽性株を除くと *hHEX* 遺伝子

と *hHEX* 蛋白の発現が相関する傾向が認められた (図 5、6)。

(図5) *hHEX*遺伝子と*hHEX*蛋白の発現の相関

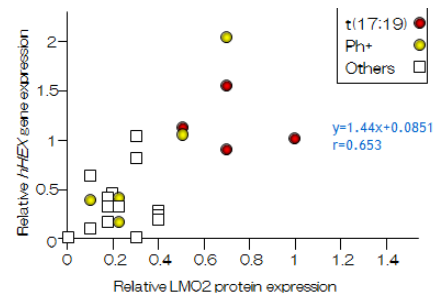
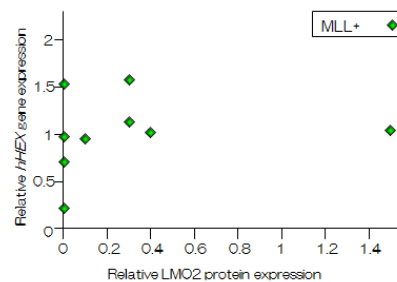


(図6) *hHEX*遺伝子と*hHEX*蛋白の発現の相関



*hHEX* が *LMO2* の下流遺伝子であると仮定すると、*hHEX* 遺伝子の発現レベルは *LMO2* 蛋白の発現レベルと相関すると想定される。そこで *hHEX* 遺伝子の発現レベルを縦軸に、*LMO2* 蛋白の発現レベルを横軸にとりグラフにした (図 7、8)。

(図7) *hHEX*遺伝子発現と*LMO2*蛋白発現の相関

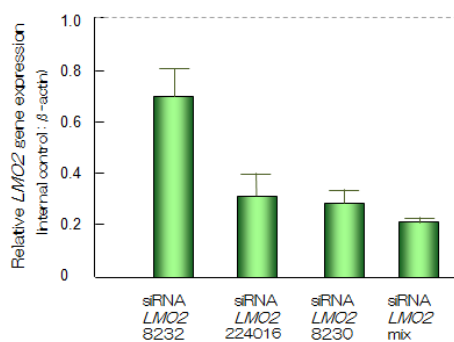


するとここでも MLL 陽性株では LMO2 の蛋白発現が比較的低いにもかかわらず hHEX 遺伝子の発現は高い傾向にあり、MLL 陽性株を除くと、強い相関関係が認められた。特に、17;19 転座型 ALL 株では、LMO2 蛋白と hHEX 遺伝子が共に高いレベルに保たれていた。以上から、MLL 陽性 ALL を除く B 前駆細胞型 ALL では、LMO2 の過剰発現が hHEX の発現に関与している可能性が示唆される一方で、MLL 陽性 ALL における hHEX 遺伝子の発現には LMO2 以外の因子が深く関与している可能性が示唆された。

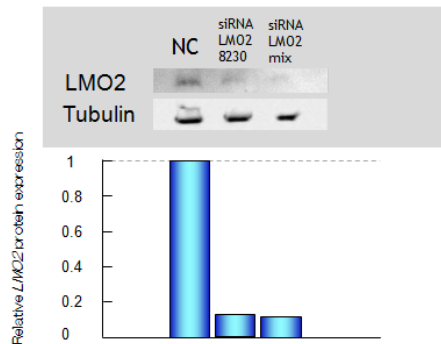
### (3) LMO2 のノック・ダウンによる変化

Ph1 陽性 ALL 細胞株の KOPN72bi 株にそれぞれ結合部位の異なる 3 種類の LMO2 の siRNA をエレクトロポレーション法によって導入した。その結果、LMO2 の遺伝子発現レベルは特に siRNA 8230 と 3 種類の siRNA の mix において、コントロール siRNA を導入した場合の 30-20% に抑制された (図 9)。また LMO2 の蛋白発現レベルは、コントロール siRNA の導入における 10% 以下に抑制されていることが確認された (図 10)。そして、これに伴って hHEX 遺伝子の発現も 40-20% に抑制されていることが確認された (図 11)。

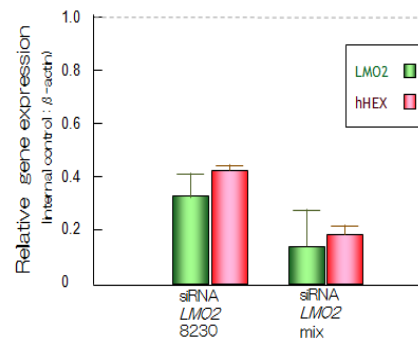
(図9) siRNAによるLMO2遺伝子の抑制



(図10) LMO2の抑制によるLMO2蛋白発現の変化



(図11) LMO2の抑制によるhHEX遺伝子発現の変化



この結果から、MLL 陽性 ALL を除く B 前駆細胞型 ALL における LMO2 の過剰発現は、T-ALL と同様に hHEX 遺伝子の過剰発現を誘導し、それが白血病細胞の生存と未熟性の維持に関与している可能性が示唆された。今後は、B 前駆細胞型 ALL における、生存と未熟性の維持に対する hHEX の関与について、細胞生物学的に解析を進める予定である。

### 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)

[学会発表] (計 1 件)  
 渡邊敦、犬飼岳史、廣瀬衣子 Expression of LMO2/hHEX pathway in B-precursor ALL 第 74 回日本血液学会学術集会 平成 24 年 10 月 19 日 パシフィコ横浜 (横浜市)

[その他]  
 ホームページ等  
 山梨大学医学部小児科  
<http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/pediatr/top.htm>

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
廣瀬 衣子 (HIROSE KINUKO)  
 山梨大学・大学院医学工学総合研究部・医学研究員  
 研究者番号：70436880

(2) 研究分担者  
 なし

(3) 連携研究者  
 なし