

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790961

研究課題名(和文) Evi1 関連白血病における血小板系シグナルの機能解析

研究課題名(英文) The role of megakaryocytic signals in Evi1 leukemia

研究代表者

大河内 直子 (Okochi, Naoko)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00568412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円、(間接経費) 960,000 円

研究成果の概要(和文)： Evi1の高発現は、白血病の独立した予後不良因子である。本研究では、我々の作成したEvi1関連白血病モデルマウスを用いて、Evi1白血病における血小板系シグナル(CD41, cMpl)の役割を明らかにすることを目的とした。

ヒト白血病検体においてはEvi1とCD41およびcMplの発現には相関を認め、Evi1-KOマウスの造血幹細胞ではCD41およびcMplの発現が低下していた。Evi1白血病幹細胞はCD41陽性分画に存在する。抗CD41中和抗体およびCD41ノックダウンによるEvi1白血病発症の抑制効果は認めなかったが、cMplノックダウンによるEvi1白血病発症の抑制効果を認めた。

研究成果の概要(英文)： Ecotropic viral integration site 1 (Evi1), located on chromosome 3q26, is an independent negative prognostic indicator of survival in acute myeloid leukemia (AML). Thrombocytosis is a characteristic feature in AML patients with 3q26 abnormality, and the platelet function related genes, such as CD41 (integrin α IIb) and cMpl, positively correlates with Evi1 expression in AML patients. Previously, we succeeded in making a mouse model of Evi1-related leukemia. Sub-population of this Evi1 leukemia mice cells expressed both CD41 and cMpl. The CD41+ fraction of Evi1 leukemia mice more efficiently induced secondary leukemia than the CD41- counterpart in a serial BMT assay. The CD41+ cells predominantly expressed cMpl, and shRNA-mediated knockdown of cMpl delayed the progression of Evi1 leukemia in vivo, suggesting that T HPO/cMpl signaling is involved in enhancing the growth and survival of Evi1 leukemia cells.

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：Evi1 leukemia model mouse CD41 cMpl TPO

1. 研究開始当初の背景

Evi1 の高発現は、白血病の独立した予後不良因子である (Groschel, S. J. Clin. Oncol 2010; 28: 2101)。Evi1 遺伝子が存在する 3 番染色体に異常を持つ患者は AML 全体の 4.4%だが、Evi1 を高発現している患者は 10.7%にのぼる。この Evi1 高発現群の治療成績を向上させることが、これからの課題と言える。

Evi1 遺伝子を含む転座で最も高頻度なものが inv(3)(q21q26)であるが、この転座が最初に報告されたのは、1983 年のことである (Bernstein R. Blood 1982; 60: 613)。Bernstein Rらは、この転座を持つ患者の中に血小板増多を示す例があることを報告している。その後、多くの臨床的解析により、3q26 abnormality のある白血病患者においては、血小板増多が特徴の一つであることが明らかとなっている。ヒト白血病検体を用いた網羅的解析においても、Evi1 高発現の白血病と血小板系分子の発現には相関性がある (Valk, P.J. N. Engl. J. Med 2004; 350: 1617)。その中には血小板および巨核球系のマーカーである CD41 も含まれている。CD41 は、血小板や巨核球のマーカーとして利用されているが、造血発生期では stem cell marker であることが知られている。

我々は Evi1 高発現白血病モデルマウスを作製することに成功し、C/EBP の short isoform である LIP と Evi1 が協調して白血病を誘導することを明らかにした (Blood. 2013; 121(20):4142-55)。さらに我々は、この Evi1 関連白血病モデルでは、必ず、CD41 (integrin IIb) 陽性分画が出現することを発見した。CD41 陽性分画の細胞を sorting してギムザ染色してみると、blast であることも確認した。Evi1 と LIP を同時に高発現させて誘導した白血病細胞においても CD41 陽性分画が必ず存在する上、その割合は Evi1 単独で誘導した場合よりも増えることも分かっている。インテグリンは鎖と鎖の 2 本のサブユニットのヘテロ二量体蛋白質であり、CD41(Integrin IIb) は、CD61(Integrin III)とヘテロ二量体を作ることが知られている。我々は、Evi1 白血病細胞において、CD41 と同時に CD61 も発現していることを確認した。

以上の結果より、CD41 の発現は Evi1 白血病の病態となんらかの関係があると考えられる。しかし Evi1 関連白血病における血小板系シグナルの役割については明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、我々の作成した Evi1 白血病モデルマウスを用いて、Evi1 関連白血病における血小板系シグナルの役割を明らかにする。

3. 研究の方法

マウス骨髄細胞にレトロウイルスを用いて Evi1 を導入し、骨髄移植を実施して、Evi1 関連白血病モデルマウスを作製する。この Evi1 関連白血病モデルでは、CD41 (integrin IIb) の発現が常に誘導される。CD41 陽性分画に leukemic stem cell が enrich されているかどうかを確かめるために、CD41 陽性・陰性分画を移植して、白血病を発症するかどうか解析する。また、CD41 が Evi1 白血病の治療標的になりうるかどうかを確かめるために、Evi1 高発現白血病に対する抗 CD41 抗体の治療効果、あるいは shRNA による CD41 のノックダウンの治療効果をモデルマウスを用いて検証する。CD41 の下流のシグナル経路を確かめる。さらに、ヒト Evi1 高発現白血病細胞での CD41 発現について、細胞株および臨床検体を用いて解析する。Evi1 関連白血病では血小板系の分子が動くという今回の発見に伴い、Evi1 白血病における TPO 感受性についても解析する。TPO は巨核球の成熟過程において重要なサイトカインであるが、hematopoietic stem cell に対しても重要な働きがあることが分かっている。

4. 研究成果

(1) CD41 陽性・陰性分画の二次移植
CD41 陽性・陰性分画に分けて、二次移植し、白血病発症の有無を解析したところ、CD41 陽性分画のほうが有意に発症が早く発症率も高かった (p=0.0016)。Evi1 白血病の Leukemia Stem Cell (LSC) は、CD41 陽性分画に enrich していることが明らかとなった。

(2) ヒト AML 検体において、Evi1 の発現と CD41 および cMpl の発現に相関を認めた。また Evi1 ノックアウトマウスの造血幹細胞 (KSL) と wild type の造血幹細胞のマイクロアレイ解析では、Evi1 ノックアウトマウスで CD41 および cMpl の発現が低下していることが判明した。

(3) 抗 CD41 中和抗体による治療効果
Evi1 白血病細胞を抗 CD41 中和抗体で pre-treatment し、control としては normal IgG と反応させたものを準備し、二次移植して、キメリズム解析および生存期間を比較したが発症抑制効果は認めなかった。

(4) Evi1 白血病細胞において CD41 の発現を shRNA で阻害し、マウスに二次移植したところ、CD41 の発現抑制による Evi1 白血病発症の抑制効果は認めなかった。

(5) Evi1 白血病細胞において cMpl の発現を shRNA で阻害し、マウスに二次移植したところ、cMpl の発現抑制による Evi1 白血病

発症の抑制効果を認めた(p=0.018)。Blood. On revision.

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)

1. Watanabe-Okochi N, Yoshimi A, Sato T, Ikeda T, Kumano K, Taoka K, Satoh Y, Shinohara A, Tsuruta T, Masuda A, Yokota H, Yatomi Y, Takahashi K, Kitaura J, Kitamura T, Kurokawa M. The shortest isoform of C/EBP β , Liver inhibitory protein (LIP), collaborates with Evi1 to induce AML in a mouse BMT model. Blood. 2013;121(20):4142-55.
2. Maegawa S, Gough SM, Watanabe-Okochi N, Lu Y, Zhang N, Castoro RJ, Estecio MR, Jelinek J, Liang S, Kitamura T, Aplan PD, Issa JP. Age-related epigenetic drift in the pathogenesis of MDS and AML. Genome Res. 2014 Apr;24(4):580-91.
3. Nukina A, Kagoya Y, Watanabe-Okochi N, Arai S, Ueda K, Yoshimi A, Nannya Y, Kurokawa M. Single-cell gene expression analysis reveals clonal architecture of blast-phase chronic myeloid leukaemia. Br J Haematol. 2014 Jan 8. doi: 10.1111/bjh.12726. [Epub ahead of print]
4. Matsuhashi M, Tsuno NH, Sone S, Mishima Y, Nagura Y, Watanabe-Okochi N, Ikeda T, Kashiwase K, Fukuda S, Iriyama T, Hyodo H, Yamashita T, Kamei Y, Arai S, Minami M, Fujii T, Kurokawa M, Tozuka M, Takahashi K, Santoso S. The role of alloantibodies against human platelet antigen-15 in multiply platelet transfused patients. Transfusion. 2014 Apr;54(4):1093-9.
5. Yamamoto Y, Yamashita T, Tsuno NH, Nagamatsu T, Okochi N, Hyodo H, Ikeda T, Kawabata M, Kamei Y, Nagura Y, Sone S, Fujii T, Takahashi K, Kozuma S. Safety and efficacy of preoperative

autologous blood donation for high-risk pregnant women: experience of a large university hospital in Japan. J Obstet Gynaecol Res. 2014;40:1308-16.

6. Yoshizato T, Watanabe-Okochi N, Nannya Y, Ichikawa M, Takahashi T, Sato T, Masuda A, Yatomi Y, Tsuno NH, Kurokawa M, Takahashi K. Prediction model for CD34 positive cell yield in peripheral blood stem cell collection on the fourth day after G-CSF administration in healthy donors. Int J Hematol. 2013;98(1):56-65.
7. Ichikawa M, Yoshimi A, Nakagawa M, Nishimoto N, Watanabe-Okochi N, Kurokawa M. A role for RUNX1 in hematopoiesis and myeloid leukemia. Int J Hematol. 2013;97:726-34. Review.
8. Tsuno NH, Nagura Y, Kawabata M, Matsuhashi M, Sone S, Ikeda T, Okochi N, Takahashi K. The current status of autologous blood transfusion in Japan - The importance of pre-deposit autologous blood donation program and the needs to achieve patient blood management. Transfus Apher Sci. 2013;49(3):673-80.
9. Matsuhashi M, Tsuno NH, Ikeda T, Mishima Y, Watanabe-Okochi N, Santoso S, Tozuka M, Takahashi K. The frequencies of SLC44A2 alleles among the Japanese population. Tissue Antigens. 2013;81(4):227-8.

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Watanabe-Okochi N, Yoshimi A, Sato T, Ikeda T, Kumano K, Taoka K, Satoh Y, Shinohara A, Tsuruta T, Masuda A, Yokota H, Yatomi Y, Takahashi K, Kitaura J, Kitamura T, Kurokawa M. The shortest isoform of C/EBP β , Liver inhibitory protein (LIP), collaborates with Evi1 to induce AML in a mouse BMT model. Rinsho Ketsueki. 2013;54(8):749-58. Japanese.

〔学会発表〕(計 2 件)

1.
発表者(代表)名:大河内直子
発表標題: Evi1-induced leukemic cells express CD41 known as a megakaryocytic marker in a mouse BMT bone marrow transplantation model.
学会等名: 第 35 回日本分子生物学会年会
発表年月日: 2012 年 12 月 14 日
発表場所: 福岡

2.
発表者(代表)名:大河内直子
発表標題: Evi1-induced leukemic cells express CD41 known as a megakaryocytic marker in a mouse BMT model.
学会等名: 第 74 回日本血液学会学術集会
発表年月日: 2012 年 10 月 19 日
発表場所: 京都

〔図書〕(計 1 件)

1. 大河内直子、高橋孝喜: 輸血合併症: 今日の治療と看護 改訂第 3 版:45-50,2013

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
大河内 直子 (Naoko Okochi)

研究者番号: 00568412

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: