

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 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：2012～2013

課題番号：24790986

研究課題名(和文)核膜孔関連白血病の発症メカニズムの解明

研究課題名(英文)The mechanism of nuclear pore-related leukemia

研究代表者

島 豊(Shima, Yutaka)

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：90572298

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：NUP98は核膜孔構成タンパク質であるが、NUP98遺伝子は急性骨髄性白血病や骨髄異形成症候群で多くのパートナー遺伝子と融合遺伝子を形成することが知られ、NUP98融合遺伝子をもつ白血病は予後不良である。

本研究で、NUP98融合タンパク質に代謝関連タンパク質が結合することを明らかとし、この代謝関連タンパク質を阻害するとNUP98融合遺伝子をもつ白血病細胞のコロニー形成能が特異的に阻害された。この結果は、予後不良なNUP98融合遺伝子をもつ白血病の治療ターゲットとしてこの代謝関連タンパク質が有効であることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：NUP98 is a component of the nuclear pore complex (NPC). The NUP98 gene is rearranged with several partner genes in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes and NUP98-related leukemia is known to have a poor prognosis. Although the NUP98 gene has the several fusion partners, the role of the NUP98 moiety of NUP98 fusion proteins is not well investigated. To investigate NUP98-fusion-interacting proteins, we purified the protein complexes formed with NUP98-HOXA9. Mass spectrometry analysis identified that one metabolic regulator protein interacts with NUP98-HOXA9. The colony formation of the NUP98-HOXA9-immortalized mouse myeloid stem/progenitor cells was inhibited by shRNA and inhibitor for this metabolic protein. The inhibition was specific for NUP98 fusion-transformed cells. These results suggest that the metabolic protein can be a therapeutic target for NUP98 fusion-mediated leukemia.

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：白血病 核膜孔

1. 研究開始当初の背景

白血病には、染色体転座をともなっているものが多い。染色体転座の結果、異なる遺伝子同士が融合し、異常な融合タンパク質が生じることが白血病発症の原因となっている。核膜孔を構成する NUP98 や CAN は、骨髄性白血病において染色体転座のターゲットであり、これらの白血病は予後が悪い。染色体転座のターゲットとなっているいずれの核膜孔構成タンパク質もフェニルアラニンとグリシンの並んだ FG repeat を有し、異常な融合タンパク質になっても FG repeat は保存されている。これらは様々な遺伝子の融合パートナーとなっているが、核膜孔タンパク質側の白血病発症への関与についてはほとんどわかっていない。

2. 研究の目的

核膜孔関連白血病で見られる NUP98 融合タンパク質や CAN 融合タンパク質はいずれも FG repeat を有することから、私は核膜孔タンパク質側、特に FG repeat ドメインの関与を中心にその白血病発症メカニズムを解明し、予後不良な核膜孔関連白血病の治療にかなげることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 免疫沈降法

293FT 細胞に FLAG-tag のついた NUP98-HOXA9 および FG repeat ドメインを欠損させた NUP98-HOXA9 変異体を 293FT 細胞に一過性に発現させ、その細胞の可溶化物から抗 FLAG 抗体を用いて、それぞれのタンパク質複合体を免疫沈降した。免疫沈降したサンプルを SDS-PAGE で展開し、各タンパク質複合体に含まれるタンパク質について網羅的に解析する場合はポリアクリルアミドゲルから各種タンパク質バンドを切り出し、LC/MS/MS で解析した。各種結合を見る際は、展開したポリアクリルアミドゲルからタンパク質をニトロセルロース膜に転写し、抗体反応でその結合を検出した。

(2) コロニーフォーメーションアッセイ

マウスから骨髄細胞をとり、密度勾配遠心分離法により骨髄細胞から単核球を分取し、さらに抗 c-kit 抗体を用いて未分化なマウス c-kit 陽性造血細胞を精製した。この未分化な細胞にレトロウイルスを用いて NUP98-HOXA9 を始めとする各種融合遺伝子を導入し、メチルセルロース培地上で培養してコロニーを形成させた。再播種を繰り返すことによって不死化した白血病化させた細胞を得て、これらの細胞を用いて、阻害剤あるいはレンチウイルスを用いた shRNA の導入によって、それぞれのコロニー形成能がどのような影響を受けるかを検討した。

(3) クロマチン免疫沈降法

マウス c-kit 陽性骨髄細胞にレトロウイルスを用いて FLAG-tag のついた NUP98-HOXA9 および FG repeat ドメインを欠損させた NUP98-HOXA9 変異体を発現させ、メチルセルロース培地に播種した。形成されたコロニーをはがして回収し、1%ホルマリン液で固定して、その後ソニケーションすることでゲノムを切断した。抗 FLAG 抗体を用いて野生型および変異型の NUP98-HOXA9 とゲノムの複合体を精製し、脱クロスリンクした後に各ゲノム領域への野生型および変異型の NUP98-HOXA9 の結合を任意のプライマーセットを用いてリアルタイム PCR で解析した。

4. 研究成果

(1) 野生型 NUP98-HOXA9、NUP98-HOXA9 ΔFG1 変異体には不死化能があり、NUP98-HOXA9 ΔFG2 変異体には不死化能がないことがコロニーフォーメーションアッセイの結果、明らかとなっていた (図 1)。

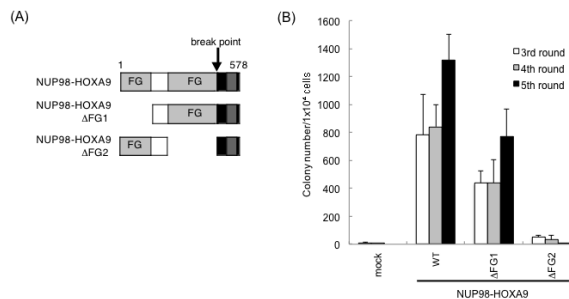


図1 NUP98-HOXA9のFG2ドメインは不死化能に必須である
(A) NUP98-HOXA9の構造
(B) NUP98-HOXA9変異体を用いたコロニーフォーメーションアッセイ

そこで、293FT 細胞から野生型 NUP98-HOXA9、NUP98-HOXA9 ΔFG1 変異体、NUP98-HOXA9 ΔFG2 変異体が形成するタンパク質複合体を精製し、その複合体に含まれるタンパク質についてマスマスペクトロメトリーを用いて同定し、不死化能に重要な FG2 repeat ドメインに結合するタンパク質について同定した。その結果、代謝関連タンパク質が同定された (図 2)。

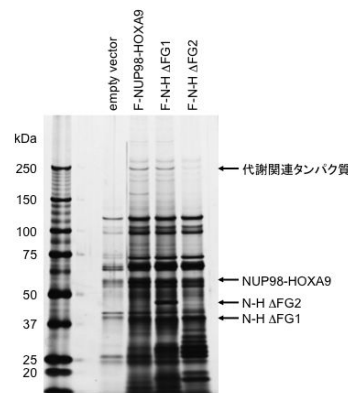


図2 NUP98-HOXA9結合タンパク質として代謝関連タンパク質が同定された

実際に、NUP98-HOXA9 にこの代謝関連タンパク質が結合するかどうか、IP-Western blotting 法で検討したところ、NUP98-HOXA9、NUP98-HOXA9 Δ FG1 には強く結合するが、NUP98-HOXA9 Δ FG2 にはほとんど結合しないことが明らかとなった (図3)。

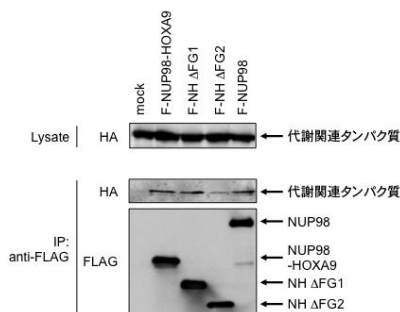


図3 NUP98-HOXA9のFG2ドメインには代謝関連タンパク質が強く結合する

次に shRNA を用いて、代謝関連タンパク質の発現をノックダウンした。すると NUP98-HOXA9 によるマウス骨髄細胞のコロニー形成能が著しく低下した (図4)。この低下はヒトの代謝関連タンパク質を発現させることで、救済できることも確認した (data not shown)。これらの結果からこの代謝関連タンパク質を阻害することは NUP98-HOXA9 を有する白血病細胞の阻害につながることを示唆された。

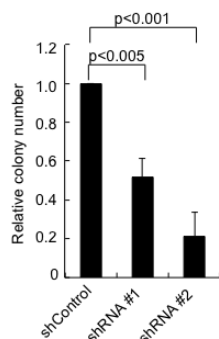


図4 代謝関連タンパク質のノックダウンによってNUP98-HOXA9によるコロニー形成は阻害される。

そこで、この代謝関連タンパク質の阻害剤をもちいて、NUP98-HOXA9 を発現する不死化したマウス骨髄細胞のコロニー形成能に与える影響について検討した。NUP98-HOXA9 だけでなく、同じく NUP98 が融合パートナーである NUP98-DDX10、またその他の融合遺伝子によって不死化したマウス骨髄細胞、ならびに正常な未分化なマウス c-kit 陽性細胞のコロニー形成能に与える阻害剤の影響について検討した。その結果、阻害剤は NUP98 融合遺伝子を有する細胞のコロニー形成能を特異的に阻害し、その他の融合遺伝子によるコロニー形成能や正常造血細胞のコロニー形成能にはほとんど阻害効果はなかった (図5)。

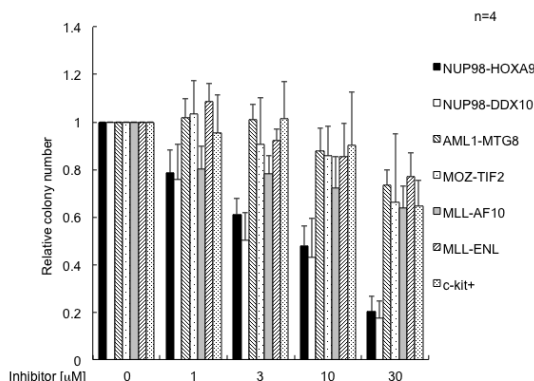


図5 代謝関連タンパク質の阻害剤は特異的にNUP98融合遺伝子によるコロニー形成を阻害する。

これらの結果から、この代謝関連タンパク質阻害剤が、NUP98 融合遺伝子を有する白血病細胞においてのみ有効であることが示唆された。

本研究より、NUP98 融合遺伝子を有する白血病の治療標的として NUP98 融合タンパク質に結合する代謝関連タンパク質が有用であることが示唆された。

(2)野生型 NUP98-HOXA9 及び N 末端側の FG repeat を欠損させた NUP98-HOXA9 Δ FG1 変異体は不死化能を有していたが、C 末端側の FG repeat を欠損させた NUP98-HOXA9 Δ FG2 変異体は有していなかった。この結果は、NUP98-HOXA9 Δ FG2 変異体に白血病発症能がないことを示すが、事実白血病において発現上昇が見られる Hoxa 遺伝子群の発現を NUP98-HOXA9 Δ FG2 変異体は誘導できなかった (図6)。

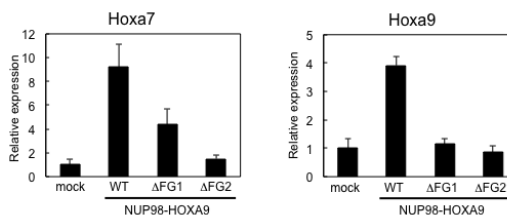


図6 NUP98-HOXA9 Δ FG2変異体にはHoxa遺伝子の発現誘導能がない

これらの結果から、NUP98-HOXA9 Δ FG2 変異体はゲノムの Hoxa 遺伝子領域にリクルートされないのではないかと考えられた。その可能性を探るため、クロマチン免疫沈降法で野生型 NUP98-HOXA9 及び NUP98-HOXA9 変異体の Hoxa 遺伝子領域への結合を調べた。その結果、不死化能を有する野生型 NUP98-HOXA9 および NUP98-HOXA9 Δ FG1 変異体は Hoxa 遺伝子領域に結合したが、不死化能を有さない NUP98-HOXA9 Δ FG2 変異体は Hoxa 遺伝子領域に結合しなかった (図7)。これらの結果から、NUP98 の FG2 ドメインは Hoxa 遺伝子領域を認識するのに重要であることが示された。白血病において様々な NUP98 融合遺伝子が存

在するが、NUP98 側が白血病発症に重要な遺伝子の領域認識のために機能していることが本研究より示唆された。

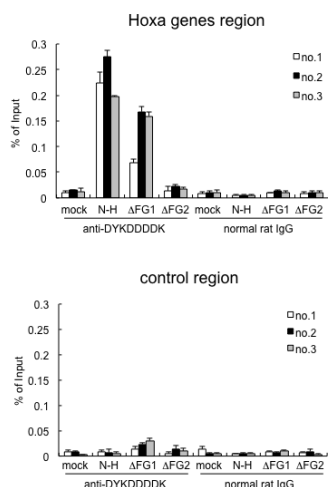


図7 NUP98-HOXA9 ΔFG2変異体はHoxa遺伝子領域には結合しない
FLAG-tagを付けたNUP98-HOXA9野生型および変異型をanti-DYKDDDDK抗体で免疫沈降し、それぞれの遺伝子領域を認識するプライマーでその結合を検出した。

島 豊 (SHIMA YUTAKA)
国立がん研究センター・研究所・研究員
研究者番号：90572298

(2)研究分担者
なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者
なし ()

研究者番号：

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 0件)

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[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