

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461437

研究課題名(和文) LPXNのサイトカイン反応性シグナルとETV6-LPXNにおける過剰反応性の解析

研究課題名(英文) Analyses of cytokine responsive signaling of LPXN and enhanced responses caused by ETV6-LPXN

研究代表者

安部 明弘 (ABE, Akihiro)

藤田保健衛生大学・医学部・客員准教授

研究者番号：00432261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：LPXNは細胞外からのシグナルを細胞内で伝えるアダプター分子である。ETV6-LPXNは急性骨髄性白血病の再発時に付加的に生じた融合遺伝子として同定され、白血病進行に関与したと推察される。ETV6-LPXNでは、分化の抑制は見られなかったが、G-CSFに対する増殖反応が亢進し、CXCL12に対して細胞遊走能の亢進が認められた。また、LPXNが細胞質に均一な分布を示すのに対しETV6-LPXNでは多量体化により点状の分布へと変化が見られた。ETV6-LPXNによりG-CSFに対する増殖性が亢進し、CXCL12に対する遊走能亢進による白血病ニッチへの関与の増強が、白血病悪化の機序と考えられた。

研究成果の概要(英文)：LPXN acts as a signal transducing adaptor protein and plays important roles in cell adhesion and spreading. We discovered a novel fusion gene between ETV6 on 12p13 and LPXN on 11q12.1 in leukemic cells of a patient with relapsed acute myeloid leukemia. ETV6-LPXN did not transform the interleukin-3-dependent 32D myeloid cell line; however, an enhanced proliferative response was observed when these cells were treated with G-CSF without inhibition of granulocytic differentiation. The 32D and human leukemia cell lines each transduced with ETV6-LPXN showed enhanced migration towards the chemokine CXCL12. The immunofluorescence data indicated that ETV6-LPXN oligomerized, because it was detected as discrete spots in the cytoplasm, although LPXN was diffusively distributed throughout the cytoplasm. Our data indicate that ETV6-LPXN is associated with progression of leukemia through modulation of G-CSF and CXCL12/CXCR4, potentially acting within the microenvironment of leukemic cells.

研究分野：血液内科学

キーワード：染色体転座 ETV6 LPXN G-CSF CXCL12

1. 研究開始当初の背景

- (1) leupaxin(LPXN)は、パキシリンとホモロジーのある遺伝子として造血細胞から同定され、タンパク質間相互作用に参与する4つのLIMドメインと4つのLDモチーフを有するアダプター分子である。パキシリンは一般的な細胞に発現しインテグリンなどからのシグナルを細胞内に伝える分子で、FAKと会合し細胞の接着および運動の制御に重要な役割を果たしており、詳細な機能解析が進んでいる。これに対しLPXNは、白血球の細胞質に発現し、FAKファミリーに属するPYK2、LYN、チロシンホスファターゼPTP-PESTなどと結合することが報告されているが、造血細胞における機能には未知な点が多く残されている。
- (2) 我々は、t(7;11)(p15;p15)/NUP98-HOXA9を有する急性骨髄性白血病(AML)の再発時に付加的に生じたt(11;12)(q13;p13)転座から、新規融合遺伝子ETV6-LPXNを同定した。ETV6-LPXNは白血病の再発・進行に強く関与したと推察される。

2. 研究の目的

本研究は、パキシリンファミリー分子で血液細胞に高発現するLPXN遺伝子と、ETV6-LPXN融合遺伝子に関し、G-CSFをはじめとするサイトカインやケモカインCXCL12などに対する反応性を解析することにより、ETV6-LPXNの白血病発症機構と造血細胞におけるLPXNの役割を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 症例
66歳、男性のAMLで、初発時の染色体検査は46,XY,t(7;11)(p15;p15)であった。化学療法で完全寛解を得るも約1年半後に再発し、再発時の染色体検査で、46,XY,inv(6)(p22q15),der(7)t(7;11)(p15;p15),der(11)t(7;11)t(11;12)(q12.1;p13),der(12)t(11;12)(q12.1;p13)[17]/46,idem,t(1;3)(q25;q26.2)[2]/46,XY[1]とt(11;12)(q12.1;p13)の付加的異常が認められた。
- (2) 融合遺伝子のクローニング
FISH解析
12p13に位置するETV6領域のFISH検査は、Vysis LSI ETV6 Dual Color Break Apart Rearrangement probeを用いて行った。
RACE法とPCR
ETV6遺伝子の、融合パートナーは3'RACE PCR(Rapid Amplification of cDNA Ends)を用いて同定した。ETV6-LPXN

(EL), LPXN,およびNUP98-HOXA9(NH)のcDNAsはRT-PCRを用いて患者白血病細胞からクローニングし、FLAG-tagあるいはHA-tagを付加してレトロウイルスベクターに組み込んだ。ETV6の多量体領域を欠いたPNT-ETV6-LPXNおよびGFP, Tomatoとの融合遺伝子等も作製した。

- (3) 遺伝子導入と細胞増殖、遊走、分化
レトロウイルスベクターによる遺伝子導入
レトロウイルスベクタープラスミドとVSV-G, gag-pol発現ベクター-pCGCGPを293細胞にリン酸カルシウム法を用いてトランスフェクションし、レトロウイルスを作製し遺伝子導入を行った。セレクションマーカーに応じてG418あるいはblasticidin-Sにより遺伝子導入細胞のセレクションを行った。
細胞株
マウスIL-3依存性骨髄細胞系細胞株32D, マウスIL-3依存性Bリンパ球系細胞株BaF3, ヒト骨髄性白血病細胞NKM-1, ヒト赤白血病由来細胞株TF-1, ヒト胎児腎細胞由来細胞株293を用いた。
細胞増殖
細胞増殖の解析は、カウント法あるいはXTTアッセイ(Dojin Chemical)により吸光度を測定して行った。
細胞分化
32Dの顆粒球分化は、IL-3除去G-CSF存在下で7日間培養し、マウスGr-1抗体を用いて、FACS-CaliburとCellQuestによりGr-1発現細胞を解析した。
細胞遊走試験
24-wellプレートで8.0µm孔の膜を隔てたチャンバー内で細胞を培養し、膜を超えてG-CSFあるいはCXCL12を含む培養液に遊走した細胞を定量した。
- (4) 遺伝子発現の解析
細胞内の分布
GFPおよびTomato融合遺伝子の発現は、蛍光をBZ-9000(KEYENCE)を用いて観察した。
ウエスタンブロット解析
抗FLAG抗体、抗HA抗体などの各種抗体と各種抗リン酸化抗体を用いて行った。
- (5) RNA-seq解析
初発時および再発時の患者凍結保存検体からRNAを抽出しcDNAを作製し、イルミナHiSeq2000により、それぞれおよそ2千万リードを各100bp読み取り配列を決定した。解析は、CLC genomics workbench v8.0を用いてコンピューター解析を行い、遺伝子発現を比較した。

4. 研究成果

- (1) ETV6-LPXNの構造

ETV6 プローブによる FISH 検査にてスプリットシグナルが認められたことから、RACE-PCR 法により ETV6 の 3' 側に位置するパートナー遺伝子を検索したところ、LPXN との融合が確認された。融合遺伝子は ETV6 のエクソン 4 と LPXN のエクソン 2 との融合で翻訳フレームも合致しており融合タンパクとして発現すると考えられた (図 1)。LPXN-ETV6 の発現も認められた。

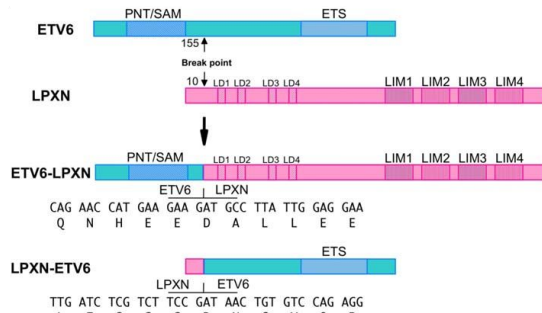


図 1

(2) G-CSF に対する増殖反応性

32D 細胞に、FLAG-tag をつけた EL と HA-tag をつけた NH を遺伝子導入し 32D/EL/NH, 32D/EL, 32D/NH を樹立した。いずれの細胞も IL-3 非存在下には自律的な増殖は認められなかったが、各種サイトカインに対する反応性を調べたところ、G-CSF を加えた場合に遺伝子導入細胞では 32D/mock と比較し強い増殖が認められ、32D/EL/NH において最も強い細胞増殖効果が認められた (図 2)。このことから、ETV6-LPXN のみには増殖を維持する活性はないが、G-CSF の増殖シグナルを増強し NUP98-HOXA9 と協調して G-CSF による強い細胞増殖を引き起こすと考えられた。

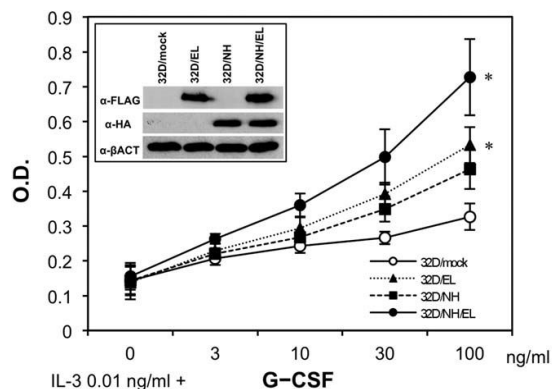


図 2

(3) ETV6-LPXN が顆粒球分化に与える影響

32D/EL/NH, 32D/EL, 32D/NH において、IL-3 非存在下に G-CSF を添加して 7 日間培養した後、顆粒球への分化を Gr-1 発現によって解析し

たところ、EL による分化の抑制は認められなかった (図 3)。

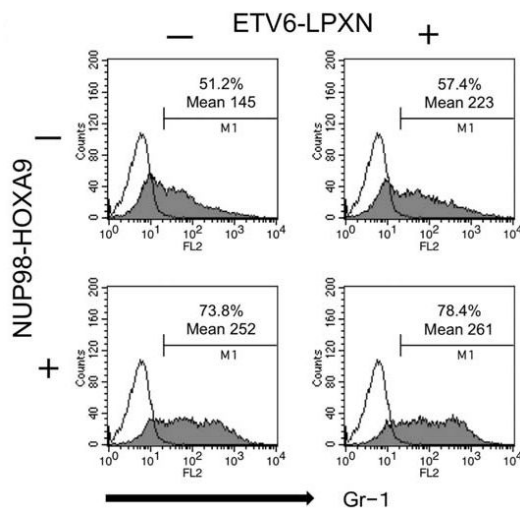


図 3

(4) 細胞遊走に与える影響

LPXN が細胞遊走・接着に関与することから、CXCL12/CXCR4 における細胞遊走活性について、低濃度の IL-3 存在下および非存在下に G-CSF と比較し解析した。32D/EL では、32D/mock と比較して、IL-3 の有無にかかわらず遊走活性が増強した (図 4)。マウス B 細胞性白血病細胞株 Ba/F3、ヒト急性骨髄性白血病由来細胞株 NKM-1、ヒト白血病由来サイトカイン依存性細胞株 TF-1 に EL を遺伝子導入し CXCL12 に対する過剰反応性を調べたところ、いずれの細胞においてもコントロール細胞に比べ、より強い細胞遊走性が認められた。ETV6-LPXN は CXCL12/CXCR4 における細胞遊走性を増強することが明らかとなった。

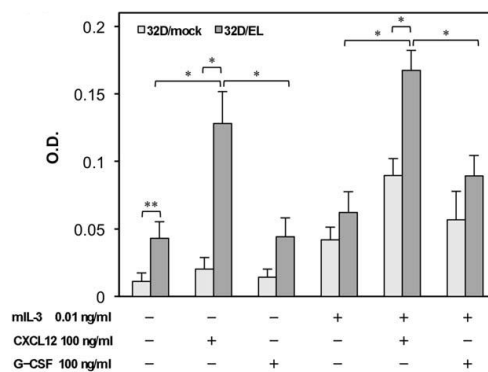


図 4

(5) シグナル分子の解析

G-CSF および CXCL12 における下流シグナル分子の違いを解析するため、G-CSF, CXCL12 添加後、経時的に細胞タンパクを抽出し、リン酸化チロシン、リン酸化 LPXN, ERK, PYK2, STATs, JAKs 等についてリン酸化シグナルを調べた

が明らかな違いは得られなかった。チロシン以外のリン酸化シグナルが関与する可能性が考えられた。

(6) 細胞内局在の変化

293細胞にEL-TomatoとLPXN-GFP, EL-GFP, EL-GFPを共発現させTomato(赤色)とGFP(緑色)の発現を、蛍光顕微鏡で観察した。LPXNが細胞質に均一に存在するのに対し、ELは細胞質に1個から数個のスポットとして局在が認められた。ETV6の多量体領域を欠失したELでは細胞質に均一に存在した。また、EL-TomatoとEL-GFPの共発現では、両者が同一部位に認められたことからELではETV6を介して多量体化し局在が変化していると考えられた(図5)。

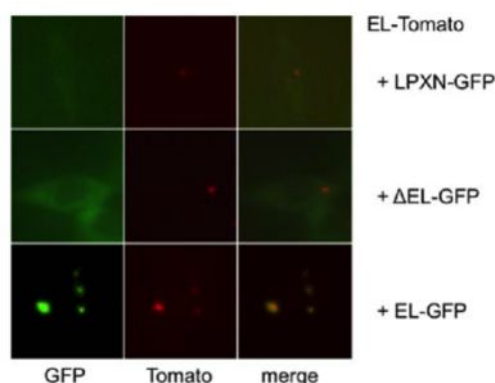


図5

(7) 遺伝子発現の変化

ETV6-LPXNによる遺伝子発現の変化を網羅的に調べるため、初診時と再発時の患者検体を用いてRNA-seq解析を行い遺伝子発現の変化を解析した。発現の増加した遺伝子として、ケモカイン(*CCL2*, *CCL5*, *CCL22*, *CCL1*, *CXCR2*)、抗アポトーシス分子(*PIM-1*, *MYC*)、白血球走化性因子(*IL-8*)などが認められた。*CXCR4*の発現は1.4倍に増加していた。発現の減少した遺伝子としては、腫瘍抑制遺伝子(*TP53*, *PTEN*)、顆粒球分化関連分子(*MPO*, *CD36*, *MMP8*)などが認められた。抗アポトーシス遺伝子の減少と腫瘍抑制遺伝子の増加は、白血病の進行と密接に関わっていると考えられる。また、ケモカイン遺伝子の発現増加は、ETV6-LPXNとの関連性が疑われた。

結語

ETV6-LPXNにおいては、ETV6を介した多量体化が生じG-CSFに対する増殖反応性が増強するとともに、CXCL12/CXCR4における細胞遊走能亢進による白血病ニッチへの関与の増強が、白血病悪化の機序と推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

1. Niwa Y, Minami Y, Abe A, Hayakawa F, Yamada K, Naoe T. Wnt signaling is associated with cell survival in the interaction between acute myeloid leukemia cells and stromal cells. *Leuk Lymphoma*. 2016 4:1-3. 査読有
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10428194.2015.1124995?journalCode=ilal20#.V0-MSFztJJc>
2. Abe A, Mizuta S, Okamoto A, Yamamoto Y, Kameyama T, Mayeda A, Emi N. Transcriptional activation of platelet-derived growth factor receptor and GS homeobox 2 resulting from E26 transformation-specific variant 6 translocation in a case of acute myeloid leukemia with t(4;12)(q12;p13). *Int J Lab Hematol*. 2016 38:e15-8. 査読有
doi: 10.1111/ijlh.12450.
3. Abe A, Yamamoto Y, Iba S, Kanie T, Okamoto A, Tokuda M, Inaguma Y, Yanada M, Morishima S, Mizuta S, Akatsuka Y, Okamoto M, Kameyama T, Mayeda A, Emi N. ETV6-LPXN Fusion Transcript Generated by Gain of t(11;12)(q12.1;p13) in a Patient with Relapsing Acute Myeloid Leukemia with NUP98-HOXA9. *Genes Chromosomes Cancer*. 2016 55:242-50. 査読有
doi: 10.1002/gcc.22327.
4. Abe A, Yamamoto Y, Iba S, Okamoto A, Tokuda M, Inaguma Y, Yanada M, Morishima S, Kanie T, Tsuzuki M, Akatsuka Y, Mizuta S, Okamoto M, Kameyama T, Mayeda A, Emi N. NUP214-RAC1 and RAC1-COL12A1 fusion in complex variant translocations involving chromosomes 6, 7, and 9 in an AML case with DEK-NUP214. *Cytogenetic and Genome Research*. 2015 146:279-84. 査読有
doi: 10.1159/000441464.
5. Kajiguchi T, Okuno S, Ohno T, Abe A. Molecular Response to Nilotinib in a Patient with Imatinib-intolerant e19a2-positive Chronic Myeloid Leukemia. *Intern Med*. 2014 53:2801-4. 査読有
https://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/53/24/53_53.2578/_article
6. Okamoto A, Abe A, Okamoto M, Kobayashi T, Inaguma Y, Tokuda M, Yanada M, Morishima S, Kanie T, Yamamoto Y, Tsuzuki M, Mizuta S, Akatsuka Y, Yatsuya H, Yoshikawa T, Emi N. A varicella outbreak in B-cell lymphoma patients receiving rituximab-

- containing chemotherapy.J Infect Chemother. 2014 20:774-7. 査読有
doi: 10.1016/j.jiac.2014.08.006.
7. Yamamoto Y, Abe A, Emi N. Clarifying the impact of polycomb complex component disruption in human cancers. Mol Cancer Res. 2014 12:479-84. 査読有
doi: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0596.
8. Yamamoto K, Tsuzuki S, Minami Y, Yamamoto Y, Abe A, Ohshima K, Seto M, Naoe T. Functionally deregulated AML1/RUNX1 cooperates with BCR-ABL to induce a blastic phase-like phenotype of chronic myelogenous leukemia in mice. PLoS One. 2013 8:e74864. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0074864.

〔学会発表〕(計3件)

1. Molecular response to nilotinib in a patient with imatinib-intolerant e19a2 chronic myeloid leukemia
梶口 智弘、奥野 真吾、大野 稔人、安部明弘 第75回日本血液学会学術集会第75回日本血液学会学術集会 札幌市 ロイトン札幌、他 (会長 澤田 賢一)
2013年10月11日(金)~13日(日)
2. DEK-NUP214を有する急性骨髄性白血病に付加的に認められた NUP214-RAC1 融合遺伝子
安部明弘、山本幸也、岡本晃直、徳田倍将、稲熊容子、柳田正光、森島聡子、蟹江匡治、都築基弘、赤塚美樹、水田秀一、岡本昌隆、亀山俊樹、前田 明、恵美宣彦
第76回日本血液学会学術集会 大阪市 大阪国際会議場 (会長 金倉 譲)
2014年10月31日(金)~11月2日(日)
3. t(8;12;21)(q22;p12;q22)を有する RUNX1-RUNX1T1 白血病に認められた TM7SF4-VPS13B 融合遺伝子
安部明弘、山本幸也、岡本晃直、徳田倍将、稲熊容子、山本起代子、柳田正光、森島聡子、蟹江匡治、赤塚美樹、水田秀一、岡本昌 1、亀山俊樹 2、前田 明、恵美宣彦
第77回日本血液学会学術集会 金沢市 石川県立音楽堂他 (会長 中尾 眞二)
2015年10月16日(金)~18日(日)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

- 出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.fujita-hu.ac.jp/~blood/v.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

安部 明弘 (AKIHIRO Abe)

藤田保健衛生大学・血液内科・客員准教授

研究者番号：00432261

(2)研究分担者

恵美 宣彦 (NOBUHIKO Emi)

藤田保健衛生大学・血液内科・教授

研究者番号：30185144