
白血病幹細胞の自己複製能を担う分子機構と
白血病発症に至る分子機序の解明

18390278

平成 18 年度～平成 19 年度科学研究費補助金
(基盤研究(B)研究成果報告書)

平成 20 年 5 月

研究代表者 野 阪 哲 哉

三重大学大学院医学系研究科教授

[はしがき]

白血病幹細胞の存在が近年活発に論じられている。白血病にも幹細胞が存在し、癌細胞の不死化に寄与しているという考えである。その特性は正常幹細胞と同じく、自己複製能に集約されるが、その分子基盤は明らかではなく、白血病発症の分子機構の本質に迫るためには避けて通れないテーマである。白血病幹細胞の自己複製能の由来は二種類考えられる。自己複製能を持つ正常の造血幹細胞が癌化する場合と、自己複製能を持たない正常の造血前駆細胞が癌化の過程で自己複製能を新たに獲得する場合である。申請者らは前者のモデルケースに *Bcr-Abl* による CML、後者のそれに *MLL* (*Mixed Lineage Leukemia*) 融合遺伝子産物 (後述) による急性白血病を想定した。そして、癌化の過程を自己複製能の獲得という観点から解析するには後者のモデル系が極めて有用である。

ヒト染色体 11q23 に位置する *MLL* (*HRX / ALL-1*) 遺伝子は、他の染色体に存在する遺伝子 *X* との間で染色体間相互転座を起こし、*MLL-X* 融合遺伝子産物を形成することによって、造血前駆細胞の分化を阻害し、未分化な表現型の白血病を誘発する。乳児白血病においては、急性リンパ性白血病の 70% 以上、治療関連二次性白血病でも高頻度に 11q23 転座が認められ、予後も悪く、*MLL* 関連白血病の克服は臨床血液学における大きな課題の一つである。*MLL* 遺伝子は正常の状態では *Hox* (*homeobox*) 遺伝子群の発現を制御しているが、転座により他の様々な遺伝子と融合した場合の白血病発症メカニズムは不明な点が多い。*X* 遺伝子には、50 種類以上が存在し、*X* 遺伝子の性質によりある程度、病型が決まるが、どの遺伝子と融合するかには拘わらず、*MLL-X* 融合遺伝子が造血前駆細胞の分化を阻害する根本的な分子機構は共通であると考えられている。当研究課題では *X* 遺伝子として、細胞骨格蛋白である *SEPT6*、転写因子である *ENL* を中心に解析し、*MLL-SEPT6* や *MLL-ENL* の下流遺伝子の機能解析から白血病幹細胞の自己複製の分子機構に

迫ることを試みた。

本報告書は平成 18-19 年度に行われた日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究 B「白血病幹細胞の自己複製能を担う分子機構と白血病発症に至る分子機序の解明」(課題番号 18390278) の研究成果をまとめたものである。平成 18 年末に異動して研究室を新たにセットアップした時期と重なったこともあり、当初の目的をすべて達成できたとは言い難い面もあるが、本研究を通じて、当該分野の研究の進歩に貢献することができたと思われる。この場をお借りして独立行政法人日本学術振興会からの研究費の援助に対して謹んで感謝の意を表したい。

[研究組織]

研究代表者：野阪哲哉（東京大学医科学研究所・客員助教授、平成 18 年
12 月から 三重大学大学院医学系研究科・教授）
研究分担者：北村俊雄（東京大学医科学研究所・教授）
：小埜良一（三重大学大学院医学系研究科・助教）

[交付決定額(配分額)]

	(金額単位：円)		
	直接経費	間接経費	合計
平成 18 年度	9,000,000	2,462,000	11,462,000
平成 19 年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
総 計	15,600,000	4,442,000	20,042,000

[研究発表(本報告書には*で示した論文を添付する)]

〔雑誌論文〕 計 (9) 件

著者名	論文標題			
Ozaki K, Hishiya A, Hatanaka K, Nakajima H, Wang G, Hwu P, Kitamura T, Ozawa K, Leonard WJ, <u>Nosaka T.</u>	*Overexpression of Interleukin 21 induces expansion of hematopoietic progenitor cells.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
International Journal of Hematology	有	84	2 0 0 6	224-230

著者名	論文標題			
Kawashima T, Bao YC, Moon Y, Tonozuka Y, Minoshima Y, Hatori T, Kiyono M, <u>Nosaka T</u> , Nakajima H, Williams DA, Kitamura T.	*Rac 1 and a GTPase-activating protein, MgcRacGAP, are required for nuclear translocation of STAT transcription factors.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Journal of Cell Biology	有	175	2 0 0 6	937-946

著者名	論文標題			
小埜良一、野阪哲哉	*MLL関連白血病の分子病態			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
血液・腫瘍科	無	52(6)	2 0 0 6	615-624

著者名	論文標題			
Lu Y, Kitaura J, Oki T, <u>Komono Y</u> , Ozaki K, Kiyono M, Kumagai H, Nakajima H, <u>Nosaka T</u> , Aburatani H, Kitamura T.	*Identification of TSC-22 as a potential tumor suppressor that is upregulated by Flt3-D835V but not Flt3-ITD.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Leukemia	有	21	2 0 0 7	2246-2257

著者名	論文標題			
Watanabe-Okochi N, Kitaura J, Ono R, Harada H, Harada Y, Komono Y, Nakajima H, <u>Nosaka T</u> , Inaba T, Kitamura T.	*AML1 mutations induced MDS and MDS/AML in a mouse BMT model.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Blood	有	111	2 0 0 8	4297-4308

著者名	論文標題			
Kitamura T, Oki T, Watanabe-Okochi N, Komeno Y, Kato N, Yuji K, Ono R, Nakajima H, Tojo A, <u>Nosaka T</u> , Kitaura J.	Identification of leukemia-related gene alterations: Molecular pathogenesis of leukemia, myeloproliferative disorders (MPD), and myelodysplastic syndromes (MDS).			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Blood Cells, Molecules and Diseases.	無	印刷中	2 10 10 18 	

著者名	論文標題			
Nishio M, Ohtsuka J, Tsurudome M, <u>Nosaka T</u> , Kolakofsky D.	Human parainfluenza virus type 2 V protein inhibits genome replication by binding to the L protein; a possible role in promoting viral fitness.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Journal of Virology	有	印刷中	2 10 10 18 	

著者名	論文標題			
Hiwatari M, Ono R, Taki T, Hishiya A, Ishii E, Kitamura T, Hayashi Y, <u>Nosaka T</u> .	*Novel gain-of-function mutation in the extracellular domain of the <i>platelet-derived growth factor receptor α</i> (<i>PDGFRA</i>) gene in infant acute lymphoblastic leukemia with t(4;11)(q21;q23).			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
leukemia	有	印刷中	2 10 10 18 	

著者名	論文標題			
野阪哲哉	*造血器腫瘍マウスモデル			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
がん分子標的治療	無	6(2)	2 10 10 18 	25-33(101-109)

[学会発表] 計 (14) 件

発表者名	発表標題		
Watanabe-Okochi N, Kitaura J, Harada H, Ono R, Inaba T, Nakajima H, <u>Nosaka T</u> , Kitamura T	A BMT model mouse for myelodysplastic syndromes (MDS) and MDS/overt leukemia		
学会等名	発表年月日	発表場所	
35 th Annual Meeting of the International Society For Experimental Hematology	2006年9月27-30日	Minneapolis	

発表者名	発表標題		
Matsushita H, Nakajima H, Nakamura Y, Tsukamoto H, Tanaka Y, Asai S, <u>Nosaka T</u> , Ando K, Miyachi H	C/EBP α and C/EBP ϵ induce monocytic differentiation of myelomonocytic cells with MLL chimeric fusion gene		

学会等名	発表年月日	発表場所
48 th Annual Meeting of the American Society of Hematology	2006年12月9-12日	Orlando

発表者名	発表標題
Ono R, Kumagai H, Nakajima H, Tonozuka Y, Hishiya A, Taki T, Hayashi Y, Kitamura T, Nosaka T	MAP kinase activation is essential for the development of acute leukemia by MLL fusion protein and FLT3 tyrosine kinase mutation

学会等名	発表年月日	発表場所
48 th Annual Meeting of the American Society of Hematology	2006年12月9-12日	Orlando

発表者名	発表標題
Watanabe-Okochi N, Kitaura J, Harada H, Ono R, Nakajima H, Nosaka T, Inaba T, Kitamura T	A BMT model mice for myelodysplastic syndromes (MDS) and transformation to AML

学会等名	発表年月日	発表場所
48 th Annual Meeting of the American Society of Hematology	2006年12月9-12日	Orlando

発表者名	発表標題
小埜良一、熊谷英敏、中島秀明、殿塚行雄、菱谷愛、滝智彦、林泰秀、北村俊雄、野阪哲哉	MLL融合蛋白による多段階発癌モデルマウス：MAPキナーゼの重要性

学会等名	発表年月日	発表場所
第65回日本癌学会学術総会	2006年9月28-30日	横浜

発表者名	発表標題
小埜良一、熊谷英敏、中島秀明、殿塚行雄、菱谷愛、滝智彦、林泰秀、北村俊雄、野阪哲哉	MLL融合蛋白による多段階発癌にはMAPキナーゼ系の活性化が重要である

学会等名	発表年月日	発表場所
第68回日本血液学会総会	2006年10月6-8日	福岡

発表者名	発表標題
渡辺直子、北浦次郎、原田浩徳、小埜良一、米野由希子、佐藤均、稲葉俊哉、中島秀明、野阪哲哉、北村俊雄	AML1点変異はマウスBMTモデルにおいてMDS/ AMLを発症させる

学会等名	発表年月日	発表場所
第68回日本血液学会総会	2006年10月6-8日	福岡

発表者名	発表標題
小埜良一、北村俊雄、野阪哲哉 (演者)	MLL融合蛋白による多段階発癌におけるRaf-MAPキナーゼ系活性化の重要性

学会等名	発表年月日	発表場所
日本プロテインホスファターゼ研究会 第3回 国内集会	2007年3月30,31日	津

発表者名	発表標題	
渡辺・大河内直子、北浦次郎、小埜良一、原田浩徳、原田結花、中島秀明、野阪哲哉、稲葉俊哉、北村俊雄	AML1点変異はマウスBMTモデルにおいてMDS/ AMLを発症させる	
学会等名	発表年月日	発表場所
第5回幹細胞シンポジウム	2007年5月17-19日	淡路島

発表者名	発表標題	
小埜良一、熊谷英敏、中島秀明、殿塚行雄、菱谷愛、滝智彦、林泰秀、北村俊雄、野阪哲哉	Hoxa9とRas-MAPキナーゼ系の協調作用がMLL融合蛋白による急性白血病の発症に重要である	
学会等名	発表年月日	発表場所
第66回日本癌学会学術総会	2007年10月3-5日	横浜

発表者名	発表標題	
北村俊雄、野阪哲哉	白血病およびMDSの分子病態：マウス骨髄移植モデルおよび発現クロニング法を利用した解析	
学会等名	発表年月日	発表場所
第66回日本癌学会学術総会	2007年10月3-5日	横浜

発表者名	発表標題	
渡辺（大河内）直子、沖俊彦、小埜良一、原田浩徳、湯地晃一郎、東條有伸、中島秀明、野阪哲哉、稲葉俊哉、北浦次郎、北村俊雄	RasGRP4と変異型AML1はマウスBMTモデルにおいて協調的に働き、T細胞性白血病を誘発する	
学会等名	発表年月日	発表場所
第69回日本血液学会総会	2007年10月11-13日	横浜

発表者名	発表標題	
松下弘道、中島秀明、中村嘉彦、塚本秀雄、田中由美子、浅井さとみ、小埜良一、野阪哲哉、安藤潔、宮地勇人	活性誘導型C/EBP α およびC/EBP ϵ によるMLLキメラ遺伝子を有する骨髄単球性白血病細胞の単球系分化	
学会等名	発表年月日	発表場所
第69回日本血液学会総会	2007年10月11-13日	横浜

発表者名	発表標題	
小埜良一、熊谷英敏、中島秀明、殿塚行雄、菱谷愛、滝智彦、林泰秀、北村俊雄、野阪哲哉	MLL融合蛋白はRas-MAPキナーゼ系の活性化と相乗的に協調して急性白血病を発症する	

学 会 等 名	発 表 年 月 日	発 表 場 所
第69回日本血液学会総会	2007年10月11-13日	横浜

〔図 書〕 計 (0) 件

著 者 名	出 版 社		
書 名	発 行 年	総ページ数	
	↓ ↓ ↓		

研究成果による産業財産権の出願・取得状況

〔出 願〕 計 (0) 件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

〔取 得〕 計 (0) 件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別

〔研究成果〕

研究代表者のグループは *MLL* 融合遺伝子による白血病発症マウスモデル系を用いた発癌の分子機構の解析を行ってきた。我々が樹立した、*in vitro* 及び *in vivo* での、レトロウイルス発現系と初代骨髄細胞を用いた *MLL* キメラ遺伝子による白血病発症系は大変効率がよく、短期間での詳細な assay が可能である。この系を用いて、以下の結果を公表してきた。

- 1) *MLL* キメラ遺伝子単独発現では骨髄増殖性疾患 (MPD) を発症するのみであるが、付加的遺伝子異常として、受容体型チロシンキナーゼである *FLT3* の恒常的活性型変異体 ITD (internal tandem duplication) を共発現させると、急性骨髄性白血病 (AML) を発症する。

- 2) *FLT3* ITD 変異体のみでの発現では無症状もしくはMPDを発症するのみでAMLは起きない。これは *MLL* キメラ遺伝子による乳児白血病発症には少なくとも2種類の遺伝子変異が必要であることを意味する。
- 3) *MLL-SEPT6* というキメラ遺伝子を用いた *in vitro* 実験により、*MLL-SEPT6* 蛋白はホモ多量体形成により機能を発揮し、*HoxA7*、*HoxA9* などの下流の遺伝子発現を上昇させる。

(Ono R et al. J Clin Invest 115, 919-929, 2005; 同論文は Nature Reviews/Cancer において highlight paper に選出された)。

以下にその後の本研究の主要な成果を要約する。

*MLL*キメラ蛋白はRas-Raf-MAPK経路と協調して白血病を引き起こす

FLT3 ITD変異体のかわりに*FLT3* TKD (tyrosine kinase domain) 変異体を用いて同様の実験を行うと、単独発現の場合はTKDの方がITDよりも活性が弱かったにもかかわらず、*MLL-SEPT6*と共発現させると、より強い協調作用を示し、同じ潜伏期でAMLを発症させた。下流のシグナルを解析すると、ITDではSTAT5経路、TKDではRas-Raf-MAPK経路のシグナルへの依存性が強かった。すなわち、*MLL*キメラ蛋白はSTAT5よりもRas-Raf-MAPK経路との協調作用が強いことが示唆された。実際、*MLL-SEPT6*を発現するIL-3依存性細胞株において、恒常的活性型STAT5の強発現ではIL-3非依存性増殖を示さなかったのに対し、活性型Rafの強発現ではIL-3非依存性に増殖した。さらに、*MLL*キメラ蛋白の下流遺伝子の一つである*HoxA9*と活性型Rasの共発現でも、マウスにおいてAMLに近い病態が誘導された。したがって、*MLL*キメラ蛋白による白血病発症の分子機構は*HoxA9*による自己複製能とRas-Raf-MAPK経路による細胞増殖活性の両者の協調

作用に集約される可能性が示された。近年、Bcr-Ablなどのチロシンキナーゼが造血幹細胞を癌化するのに対し、MLLキメラ蛋白は造血前駆細胞も癌化することが報告されているが、この現象には、HoxA9などによる白血病幹細胞化が関与していると推定された。これら実験系と並行して、Cre-*LoxP*システムを用いた誘導発現型*MLL-ENL*トランスジェニックマウスを作成し、現在、同マウスの純化分画造血細胞を用いた骨髄移植実験による白血病幹細胞生成機構を詳細に解析中である。