

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 25 日現在

機関番号： 14101
 研究種目： 基盤研究 (B)
 研究期間： 2010 ～ 2012
 課題番号： 22390206
 研究課題名 (和文) 新規がん幹細胞モデルマウスの作製と MLL 関連白血病発生の分子基盤
 研究課題名 (英文) Molecular mechanism of MLL-related leukemogenesis in a mouse model
 for generation of cancer stem cells

研究代表者

野阪 哲哉 (NOSAKA TETSUYA)
 三重大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号： 30218309

研究成果の概要 (和文)：我々は乳幼児白血病において高頻度に見られる異常 *MLL* 遺伝子 (*MLL* キメラ遺伝子) を誘導発現することによって白血病が発生する遺伝子改変マウスを新たに作製した。このマウスにおいては、最も未分化な造血細胞である造血幹細胞に *MLL* キメラ遺伝子を発現させた場合においてのみ白血病幹細胞とそれに基づく白血病が生じた。その際、*PLZF* という遺伝子が重要な役割を担っていることを見出した。

研究成果の概要 (英文)：We developed a transgenic mouse conditionally expressing an *MLL* chimeric gene which is frequently found in infantile and childhood leukemia patients. In this model system, leukemic stem cells were found to derive from only a hematopoietic stem cell population inducibly expressing *MLL-ENL*. *PLZF* gene was shown to play a pivotal role in development of *MLL-ENL*-mediated stem cell leukemia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2011 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2012 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：血液学、分子生物学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児血液学、白血病幹細胞、白血病モデルマウス、MLL、乳児白血病

1. 研究開始当初の背景

MLL (*Mixed Lineage Leukemia, HRX/ ALL-1*) 遺伝子は、50 種類以上の遺伝子との染色体間相互転座により *MLL* キメラ遺伝子産物を形成することによって、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、急性骨髄性白血病の 50%以上に、また、成人の治療関連二次性白血病でも高頻度に *MLL* キメラ遺伝子が認められ、それらの白

血病は予後も悪く、*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* キメラ遺伝子は白血病幹細胞学的見地から、近年、レトロウイルス発現系を使ったマウスモデル実験にしばしば用いられてきた。純化分画した造血細胞に遺伝子を導入した後、放射線照射したマウスに骨髄移植する実験系において、*MLL* キメラの標的細胞は造血幹細胞 (HSC)、骨髄系共通前駆細胞 (CMP)、

顆粒球単球系前駆細胞(GMP) であることがコンセンサスになっている。ところが、2008年、Chen Wらは *MLL-AF9* ノックインマウス細胞を用いた骨髄移植実験により、同遺伝子産物が白血病を引き起こすのは GMP/CMP ではなく、HSC/CLP(造血幹細胞/リンパ系共通前駆細胞)が標的となっており、それはキメラ遺伝子の発現レベルを反映していることを報告した。すなわち、レトロウイルスによる強発現系では、時として、非生理的な病態を誘導してしまうことが示されたのである。さらに、レトロウイルスゲノムの染色体への組み込みによるセカンドヒットの影響もありうる。上記論文で使用されたノックインマウスも誘導発現型ではないので、まだ完全なモデルとは言い難い。したがって、生理的環境に近い条件下で実験を行い、*MLL* キメラ遺伝子の真の標的細胞を明らかにすることが *MLL* 関連白血病研究の最重要課題の一つである。

我々はこれまでに *MLL* キメラ遺伝子による発がんは多段階であることを、レトロウイルス発現系を用いたマウス骨髄移植実験で示してきたが (Ono R et al., *J Clin Invest*, 2005)、今回、独自の誘導発現型 *MLL-ENL* トランスジェニックマウスを開発した。このマウス由来骨髄細胞の特定の分化段階の造血細胞に *MLL-ENL* 遺伝子を誘導発現させ、詳細に解析することにより、白血病幹細胞生成の分子機構に迫った。

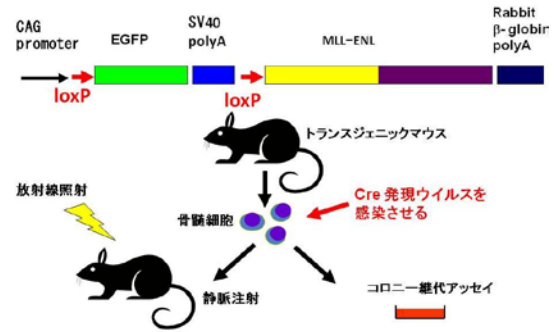
2. 研究の目的

生理的条件に近い発がん過程を再現することによって *MLL* キメラ遺伝子の真の標的細胞を同定し、白血病幹細胞発生の分子基盤を明らかにすることを目的とする。最終的には、がん幹細胞選択的分子標的療法への応用を目指す。

3. 研究の方法

MLL-ENL short form を誘導発現するトランスジェニックマウスを作製した。Cre が供給されると *loxP* 部位で切断され、*EGFP* 遺伝子が抜け落ち、*MLL-ENL* 遺伝子が発現する。Cre 蛋白は Cre 発現レトロウイルスの骨髄細胞への感染によって供給される。このトランスジェニックマウスから、骨髄細胞の CD34⁺KSL (c-kit⁺Scal⁺Lineage⁻) 分画 (LTR(長期骨髄再構築可能)-HSC) と CD34⁺KSL 分画 (STR(短期骨髄再構築可能)-HSC)、CLP、CMP、GMP 分画を単離し、コロニー継代アッセイ及び骨髄移植

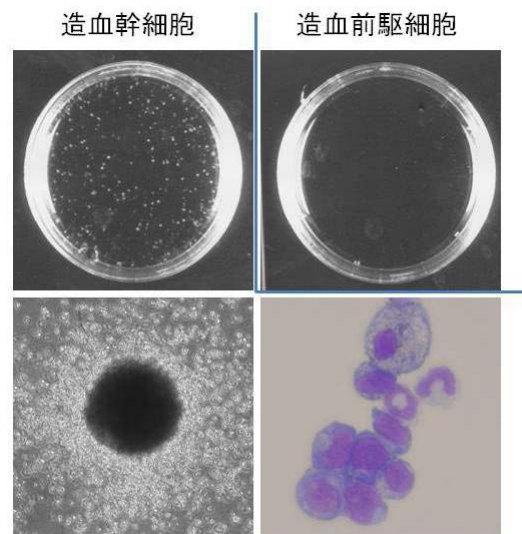
実験にてどの分画に *MLL-ENL* が誘導発現されればがん化するのかを解析した (下図参照)。



また、cDNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、*MLL-ENL* 下流でがん化に直接貢献している遺伝子を探索した。

4. 研究成果

トランスジェニックマウスの骨髄細胞から LTR-HSC(造血幹細胞)と STR-HSC(造血前駆細胞)を単離し、Cre 発現レトロウイルスを感染させて、それらの細胞集団に *MLL-ENL* を誘導発現させ、コロニー継代アッセイを行ったところ、*MLL-ENL* は造血幹細胞のみをトランスフォーム (不死化) した (下図)。



造血幹細胞のみが *MLL-ENL* によりがん化し、継代可能なコロニーを形成する(左上、左下)。右下はコロニーを形成する一個一個の細胞。

cDNA マイクロアレイ解析にて、造血幹細胞特異的に発現し、*MLL-ENL* によって発現が増強するいくつかの遺伝子が同定され、そのうちの一つ、*PLZF* に関してさらに解析した。

PLZF は生殖細胞で自己複製への関与が知られている転写因子であり、*MLL-ENL* 発現によってその発現が増加し、short hairpin-RNA

で *PLZF* の発現をノックダウンすることによって、*MLL-ENL* が造血幹細胞をトランスフォームする活性が低下した。同様の現象は *in vivo* の二次移植実験においても観察された。さらに、野生型 *PLZF* を強制発現すると、マウス骨髄細胞が不死化され、ポリコーム分子 *Bmi-1* との相互作用が消失する *PLZF* 変異体では不死化は起こらなかった。また、*PLZF* プロモーターを用いたレポーターアッセイとクロマチン免疫沈降法により *MLL-ENL* 発現が *PLZF* 転写を増強すること、公共データベース上のヒト白血病細胞における遺伝子発現プロファイル解析 (GSEA) にて *PLZF* の発現が高い *MLL* 関連急性骨髄性白血病は、造血幹細胞に近いプロファイルを持つことを明らかにした。

以上の結果は、*MLL-ENL* による造血幹細胞のがん化において、*PLZF* の発現が重要な役割を果たしていることを示唆しており、これは世界初の知見である。さらに、従来のレトロウイルスによる強発現実験により報告されてきた、*MLL* キメラ遺伝子は造血幹細胞及び造血前駆細胞の分化を阻害し、自己複製活性を賦与することによって白血病を発症させるという概念と異なり、同遺伝子産物は正常造血幹細胞の不死化/異常増殖を促すことによってがん化を引き起こす可能性を示唆する。

従来より、*MLL* キメラの標的遺伝子として、*Hox* 遺伝子群、*Meis1*、*Evi-1* が明らかにされているが、我々が新たに同定した *PLZF* が、これら遺伝子を含めて、どのような分子機構により、造血幹細胞を特異的にがん化するかを明らかにすることが今後の検討課題である。

以上、当研究は、独自の実験モデル動物を用いて、*MLL* 関連白血病の少なくとも一部は正常造血幹細胞から生じている可能性を提示したものであり、がん幹細胞学的見地、さらには将来の分子標的療法的観点からも興味深い発見であると言えよう。

最後に、我々はまた、*MLL-ENL* により発現が増強する別の造血幹細胞特異的発現遺伝子 *X* にも着目し、当該遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスを作製した。現在 *Floxed* ホモの状態、*Cre* 誘導実験の準備完了である。この遺伝子 *X* のノックアウト細胞を用いた骨髄移植実験にて *MLL-ENL* による造血幹細胞のがん化における遺伝子 *X* の役割を

解析する予定である。

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)

- [雑誌論文] (計 14 件)
- ① Ono R, Masuya M, Nakajima H, Enomoto Y, Miyata E, Nakamura A, Ishii S, Suzuki K, Shibata-Minoshima F, Katayama N, Kitamura T, Nosaka T. *Plzf* drives *MLL*-fusion-mediated leukemogenesis specifically in long term hematopoietic stem cells. *Blood* 査読有 掲載確定.
doi: 10.1016/j.exphem.2012.12.001.
 - ② Liu B, Ohishi K, Orito Y, Nakamori Y, Nishikawa H, Ino K, Suzuki K, Matsumoto T, Masuya M, Hamada H, Mineno J, Ono R, Nosaka T, Shiku H, Katayama N. Manipulation of human early T lymphopoiesis by coculture on human bone marrow stromal cells: Potential utility for adoptive immunotherapy. *Exp Hematol* 査読有 掲載確定.
doi: 10.1016/j.jbc.M112.367854.
 - ③ Komori T, Doi A, Nosaka T, Furuta H, Akamizu T, Kitamura T, Senba E, Morikawa Y. Regulation of AMP-activated Protein Kinase Signaling by *AFF4*, a Member of the *AF4* (*ALL1*-fused Gene from Chromosome 4) Family of Transcription Factors, in Hypothalamic Neurons. *J Biol Chem* 査読有 287: 19985-19996, 2012.
doi: 10.1074/jbc.M112.367854.
 - ④ Suzuki K, Ono R, Ohishi K, Masuya M, Kataoka I, Liu B, Nakamori Y, Ino K, Monma F, Hamada H, Kitamura T, Katayama N, Nosaka T. *IKAROS* isoform 6 enhances *BCR-ABL1*-mediated proliferation of human *CD34⁺* hematopoietic cells on stromal cells. *Int J Oncol* 査読有 40: 53-62, 2012.
doi: 10.3892/ijo.2011.1192.
 - ⑤ 野阪哲哉. 血液腫瘍モデル動物の現状と展望. In: 金倉謙 編集. 造血器腫瘍学-基礎と臨床の最新研究動向- *日本臨床* 査読無 2012年4月増刊 (70 Suppl 2) pp159-164.

- ⑥ Minobe K, Ono R, Matsumine A, Shibata-Minoshima F, Izawa K, Oki T, Kitaura J, Iino T, Takita J, Iwamoto S, Hori H, Komada Y, Uchida A, Hayashi Y, Kitamura T, Nosaka T. Expression of ADAMTS4 in Ewing's sarcoma. *Int J Oncol* 査読有 37: 569-581, 2010.
- ⑦ 野阪哲哉、小埜良一. *MLL* 融合遺伝子による白血病発症機構. *血液・腫瘍科* 査読無 61(2): 217-223, 2010.

[学会発表] (計 13 件)

- ① Ono R, Masuya M, Nakajima H, Enomoto Y, Miyata E, Nakamura A, Ishii S, Suzuki K, Katayama N, Kitamura T, Nosaka T. MLL fusion genes transform hematopoietic stem cells through an aberrant self-renewal program by Plzf. 第74回日本血液学会学術集会 2012年 10月19日 京都
- ② Ono R, Masuya M, Nakajima H, Enomoto Y, Miyata E, Kamisako T, Ito M, Nakamura A, Suzuki K, Katayama N, Kitamura T, Nosaka T. Novel molecular mechanism of MLL-mediated leukemogenesis via a self-renewal transcription factor. 第73回日本血液学会学術集会 2011年 10月15日 名古屋
- ③ Fukuchi Y, Sadahira K, Kunimoto H, Sakurai M, Masuda A, Kawakita J, Ono R, Kitamura T, Nosaka T, Okamaoto S, Nakajima H. Differential role of PU.1 in leukemogenesis by HoxA9-Meis1 or MLL-fusion oncogene. 第73回日本血液学会学術集会 2011年 10月15日 名古屋
- ④ Fukuchi Y, Kuroda K, Sadahira K, Ono R, Tenen DG, Kitamura T, Nosaka T, Okamaoto S, Nakajima H. Differential role of myeloid transcription factors, C/EBP α and PU.1 in Leukemogenesis by MLL-fusion oncogenes. 第52回アメリカ血液学会 2010年12月4日 Orlando, FL, USA
- ⑤ Suzuki K, Ono R, Ohishi K, Kataoka I, Masuya M, Hamada H, Kitamura T, Katayama N, Nosaka T. Ikaros isoform 6

enhances proliferative effect by BCR-ABL1 in human CD34+ hematopoietic cells. 第72回日本血液学会学術集会 2010年9月26日 横浜

- ⑥ Ono R, Masuya M, Nakajima H, Enomoto Y, Miyata E, Kamisako T, Ito M, Suzuki K, Katayama N, Kitamura T, Nosaka T. Analysis of novel molecular mechanism in transformation by *MLL-ENL* targeting long-term hematopoietic stem cells. 第69回日本癌学会学術総会 2010年9月22日 大阪

[その他]

三重大学大学院 医学系研究科 感染症制御医学・分子遺伝学分野 ホームページ：
<http://www.medic.mie-u.ac.jp/microbiol/>

6. 研究組織
- (1) 研究代表者
野阪 哲哉 (NOSAKA TETSUYA)
三重大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号： 30218309
- (2) 研究分担者
北村 俊雄 (KITAMURA TOSHIO)
東京大学・医科学研究所・教授
研究者番号： 20282527
- (3) 連携研究者
小埜 良一 (ONO RYOICHI)
三重大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号： 40422414