

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659494

研究課題名(和文) 時空特異的白血病幹細胞発生モデルと病態特性

研究課題名(英文) Model for generation of leukemic stem cells: spatio-temporal properties in pathogenesis

研究代表者

野阪 哲哉 (Nosaka, Tetsuya)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30218309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は当研究室で独自に樹立した遺伝子改変マウスを用いて造血細胞において特定の時期にMLL-ENLキメラ遺伝子を誘導発現することによって白血病幹細胞を発生させ、白血病発症の分子機構を探ることを目的とする。MLL-ENLの発現だけでは、胎仔肝細胞から白血病はできにくく、成獣骨髄細胞の方ができやすかった。さらに、白血病細胞が生じる際には、胚性幹細胞の自己複製において重要な役割を担うTet1と呼ばれる遺伝子が、がん化には抑制的に働いているらしい所見が得られた。

研究成果の概要(英文)：The goal of this study is to clarify the molecular mechanism for generation of leukemic stem cells by using the inducible MLL-ENL transgenic mice which we made.

The efficiency of immortalization of fetal liver cells was lower than that of adult bone marrow cells when MLL-ENL was inducibly expressed. In addition, we found that Tet1 which is known to be involved in self renewal of embryonic stem cells, negatively regulates the leukemogenesis in this model system.

研究分野：血液学

キーワード：白血病 白血病幹細胞 MLL MLL-ENL

1. 研究開始当初の背景

MLL (Mixed Lineage Leukemia) 遺伝子はハエの形態形成関連遺伝子 *trithorax* と相同性があり、ヒトにおいては 60 種類以上の遺伝子と染色体相互転座を生じ、難治性白血病を引き起こす。

当研究室では Cre-*loxP* を用いた誘導発現型 MLL-ENL トランスジェニック (Tg) マウスを開発し、MLL-ENL の下流で PLZF が白血病幹細胞の生成において重要な働きをすることを見出した(文献 1)。しかし、PLZF だけでは MLL-ENL による多彩な白血病の病態(骨髄性、B 細胞系統、T 細胞系統の全ての白血病を引き起こし、発症年齢も様々)は説明できず、他の分子機構の解析が必要とされた。

2. 研究の目的

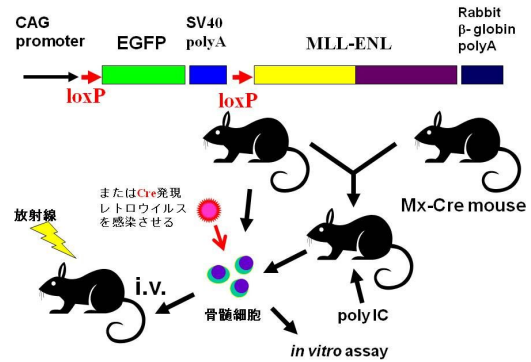
MLL-ENL キメラ蛋白による白血病発症をモデル系とし、発症年齢に応じて、細胞系統、予後の異なる病態を呈する分子機構を明らかにすることによって、細胞運命制御の謎に迫ることを目的とする。

3. 研究の方法

白血病の発生時期をコントロールできる独自の遺伝子改変マウスを用いて、時空の異なる組織から同一条件で白血病幹細胞を発生させ、発生学・エピジェネティクスの観点から病態を解析する。

具体的には、上記 Tg マウス由来の造血幹細胞分画 (*c-kit*⁺、*Sca-1*⁺、*Lineage*⁻; KSL 細胞) を用いて、コロニー継代アッセイを行った。遺伝子発現誘導に関しては、Cre が供給されると *loxP* 部位で EGFP カセットが切断され、後方に位置する MLL-ENL 遺伝子が発現する仕組みである(右上図)。

Tg 由来胎生 14.5 日の肝 (FL) 細胞または生後 8 週齢の Tg 骨髄細胞を用い、KSL 細胞を FACS にて単離し、*in vitro* で SCF、FLT3



ligand、IL-6、TPO 存在下に Cre 発現レトロウイルスを感染させ、その細胞の性質をコロニー継代アッセイにて解析した。培養は骨髄系条件 (SCF、IL-6、IL-3、GM-CSF 存在下) とリンパ系条件 (SCF、FLT3 ligand、IL-7 存在下) で行った。また、KSL 細胞以外に、共通リンパ系前駆 (CLP) 細胞を用いた同様の実験も行った。上記以外に MLL-ENL 誘導発現によって発現が誘導される遺伝子として *Tet1* を同定したので、当研究室で独自に作製した *Tet1* コンディショナルノックアウトマウス (小埜ら、未発表) と MLL-ENL 誘導発現型 Tg マウスとの交配マウスを用いた解析も行った。

4. 研究成果

MLL-ENL の単独発現にて、骨髄 KSL/骨髄系培養条件は不死化した。骨髄 KSL/リンパ系培養、骨髄 CLP/骨髄系培養、骨髄 CLP/リンパ系培養では不死化は見られず、FL KSL/骨髄系培養では弱い不死化が見られた (FL KSL/リンパ系培養は未施行)。胎仔肝細胞は成獣骨髄細胞より不死化しにくい傾向が見られ、ヒトの MLL 関連白血病の胎児期発症説と我々が提唱した MLL 多段階発がんモデル (Ono R et al., Dimerization of MLL fusion proteins and FLT3 activation synergize to induce multiple lineage leukemogenesis. *J Clin Invest* 115:919-929, 2005) との関連を考える上で興味深い。

次にエピジェネティクスの見地からのア

アプローチとして Tet1 コンディショナルノックアウトマウスと MLL-ENL 誘導発現型 Tg マウスとを交配し、その Floxed ホモ/MLL-ENL 誘導型 Tg マウスをさらに Mx-Cre マウスと交配し、Tet1 欠損が白血病幹細胞生成・増殖に与える影響を解析した。その結果、コロニー継代アッセイでは MLL-ENL を発現する、Tet1 欠損細胞が Tet1 非欠損細胞に対して優勢的に増殖することから、造血幹細胞のがん化に対して Tet1 は負に働く可能性が高いことが示唆された。これは 2013 年に報告された論文 (Huang H et al., *TET1* plays an essential oncogenic role in *MLL*-rearranged leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:11994-11999, 2013) とは全く逆の結果であり、現在、正常造血・異常造血における Tet1 の役割を詳細に解析している。

白血病発生源地という観点から見ると、未分化細胞におけるエピジェネティクス制御の重要性が示唆されたわけであるが、造血幹細胞において Tet1 の有無で発現が変動する遺伝子の中に MLL-ENL の重要な標的・共役遺伝子が潜んでいる可能性がある。それらの遺伝子に対する Tet1 などのエピジェネティクス制御因子による時空特異的 DNA メチル化制御を明らかにすることが MLL 白血病の病態特性に迫る鍵になると考えられた。PLZF 下流遺伝子の解析とともに今後、さらなる研究が必要であろう。

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 13 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 122: 1271-1283, 2013. doi: 10.1182/blood-2012-09-456665.

- 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 41: 367-376, 2013. doi:10.1016/j.exphem.2012.12.001.
- 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: 金倉讓 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.

〔学会発表〕(計9件)

- 1 Kobayashi K, Yamaguchi M, Miyazaki K, Imai H, Yokoe K, Ono R, Nosaka T, Katayama N. Expression of LMO3 and SNAP25 in diffuse large B-cell lymphoma cells and its relation to clinical features. 56th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition 2014年12月7日 San Francisco, USA
- 2 Ono R, Masuya M, Katayama N, Nosaka T. Analysis of novel molecular mechanisms leading to an aberrant self-renewal by Plzf in leukemogenesis. **第76回日本血液学会学術集会** 2014年 11月2日 大阪国際会議場(大阪市)
- 3 小埜良一、野阪哲哉. MLL融合遺伝子による造血幹細胞の癌化にはPlzfを介した異常な自己複製能が重要である。第65回日本細胞生物学会大会 2013年 6月19日 シンポジウム6 幹細胞研究の新展開 ~組織発生から病態まで~ ウィンクあいち(名古屋市)
- 4 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 国立京都国際会館(京都市)

〔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〕

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

なし

(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