

研究の分類・属性

基礎系

研究の概要

急性骨髄性白血病 AML の約半数には染色体転座等の染色体異常がみられ、その結果生じる融合遺伝子産物が AML 発症に重要であることが明らかになってきた。一方で、染色体転座を伴わない正常核型 AML では高頻度に *NPM* 遺伝子の変異が見られることが知られていたが、その発症メカニズムは不明であった。申請者らは、これまでに *NPM* 変異体は造血前駆細胞を *in vitro* でトランスフォームするが、白血病誘導には十分でないことを明らかにし、付加的な遺伝子変異の蓄積が AML 発症には必要であることを示してきた。近年の網羅的なゲノム解析により、正常核型 AML では *FLT3*, *IDH1/2*, *TET2*, *DNMT3A* などの特異的な遺伝子の変異が複合的に見られることが報告され、これらの遺伝子変異の蓄積が AML の原因である可能性が示唆されている。本研究では、正常核型 AML の分子メカニズムを明らかにすることにより AML の維持に必須な分子を特定し、新規 AML 治療の分子標的薬開発への基盤作りを行うことを目指す。そのため、①原因となる変異遺伝子を複数発現させることにより AML 発症マウスを作製する。また、②AML 発症に必要な分子を同定し、治療標的としての可能性を検証する。

まず、*NPM* 変異体の作用機序の解析を行うために、*NPM* 変異体の活性を調べることが出来る系を確立する。*NPM* 変異遺伝子に加えて上記の変異遺伝子を複数組み合わせる造血系前駆細胞に発現させ、*in vitro* コロニー形成アッセイを行い、細胞のトランスフォーム能を調べる。また、同様の細胞をマウスに移植することにより AML を発症する変異遺伝子の組み合わせを特定する。

NPM 変異体のアッセイ系が確立したら、その系を用いて AML 発症に必要な分子の同定を行う。変異遺伝子産物の下流制御遺伝子や *NPM* 結合因子の解析を行ない、候補となる因子の探索を行う。申請者らはこれまでに *NPM* が幹細胞制御に関与することが示唆される YB-1 に結合し、YB-1 が *NPM* 変異体のトランスフォーム能に必須である事を明らかにしている。そこで、YB-1 の作用機序を解明し、AML 発症における役割を明らかにする。そして、YB-1 以外の標的分子の候補についても、*NPM* 変異体のアッセイ系を用いて、標的分子の発現や機能を遺伝子欠損マウスや発現抑制することにより治療標的としての可能性を検証する。さらに、これらを標的とした新たな治療薬の開発へと展開する。

研究経費

5,000 千円

研究班の組織

小川原陽子

研究員

AML分子機能の解析、分子標的の同定

AMLモデルの確立と解析

相川祐規子

非常勤職員
(研究員)

研究の目的と到達目標及び実績要点

全期間

(目的と到達目標)：

急性骨髄性白血病 AML の約半数は染色体転座等の染色体異常を伴い、その結果生じる異常な融合遺伝子産物が AML の原因となることが知られている。申請者らは、このような染色体転座により生じる MOZ 融合遺伝子や MLL 融合遺伝子が M-CSF 受容体の発現を誘導することにより造血前駆細胞を白血病幹細胞にトランスフォームすることを明らかにしている。一方で、染色体異常が見られない正常核型の AML の発症メカニズムは不明である。本研究は、このような正常核型 AML の分子機構を解析することにより AML の維持に必須な分子を特定し、これらを標的とした新規 AML 治療薬を開発することを目的とする。

正常核型 AML では、核小体タンパク質 *NPM* 遺伝子の変異が高頻度に見られることが知られていたが、近年のゲノム解析の急激な進展により、この他に代謝を制御する *IDH1/2*、DNA のメチル化状態を制御する *TET2* および *DNMT3A*、チロシンキナーゼ *FLT3* などの複数の遺伝子変異を高頻度に伴うことが明らかになってきた。申請者はこれまでの研究により *NPM* 変異体が造血前駆細胞を *in vitro* でトランスフォームするが、*NPM* 変異体の単独の発現では白血病誘導には十分でないことを明らかにしている。この結果は、*NPM* 遺伝子変異の他に、付加的な遺伝子変異の蓄積が AML 発症には必要であることを強く示唆している。実際、*NPM* 変異を有する AML では、高頻度に *FLT3*、*IDH1/2*、*TET2*、*DNMT3A* の変異が見られ、これらの変異が AML 発症に複合的に寄与していると考えられる。

そこで本研究では、①マウスの造血系前駆細胞に *NPM* 変異遺伝子およびその他の変異遺伝子を導入し、正常核型 AML モデルマウスを作製する。② *NPM* 結合因子や *NPM* その他の変異遺伝子産物の下流制御遺伝子を明らかにし、上記 AML モデルマウスを用いて AML 発症に必須な因子の絞り込みを行い、治療標的分子を同定する。申請者らはこれまでの研究で *NPM* に結合する因子を網羅的に解析し、その中の 1 つとして YB-1 を同定し、YB-1 が *NPM* 変異体の *in vitro* におけるトランスフォーム能に必要である事を明らかにした。そこで、YB-1 結合因子や下流制御遺伝子の解析から YB-1 の作用機序を解明することにより標的分子を同定し、モデルマウスによりそれらの必要性を検証する。以上のアプローチにより AML 発症に必須な因子を同定し、これらを分子標的とした新たな治療薬の開発へと発展させる。また、チロシンキナーゼ *FLT3* の変異体は恒常的活性型となり、*IDH1/2* 変異体は新たな酵素活性を獲得していることが明らかになっているため、それぞれに対する阻害剤を用いて AML を抑制する効果があるかどうかを調べ、治療薬としての可能性を検証する。

第 1 年次

(到達目標)

- 1 *NPM* 変異体を伴う AML では、変異は片側の染色体のみで起こる。そこで、より患者の状態に近い系で *NPM* 変異体の持つトランスフォーム能を調べるために、*NPM*+/-マウスから採取した造血系前駆細胞に *NPM* 変異体を感染させて *in vitro* のコロニー形成アッセイを行う。野生型のマウスから採取した細胞を用いた場合に比べてトランスフォーム能が変化するかどうかを調べる。
- 2 *NPM*+/-マウスから採取した造血系前駆細胞に、*NPM* 変異体と共に正常核型 AML で高頻度に変異が見られる *IDH2*、*DNMT3A*、*FLT3* 遺伝子の変異体を感染させてマウスに移植する。定期的に採血を行い、末梢血中の移植した細胞由来の細胞の割合を調べる。

(年次評価時点の実績要点)

- 1 *NPM* 変異体は、野生型よりも *NPM*+/-マウス由来の造血系前駆細胞を強くトランスフォームした。
- 2 *NPM* 変異体と共に *IDH2*、*DNMT3A*、*FLT3* の変異遺伝子を共発現させた細胞は、*NPM* 変異体のみを発現させた細胞に比べ、マウスに移植すると末梢血中に占める割合が増加した。

研究成果と考察

第 1 年次評価時点

- 1 *NPM* 変異体は野生型よりも *NPM*+/-マウス由来の造血系前駆細胞を強くトランスフォームした

NPM 変異体はその局在が核小体から細胞質に変化するという特徴を持つ。*NPM* 変異体を持つ AML では *NPM* 変異は片側の染色体でのみおこり、必ず片側で野生型の *NPM* が保持されている。*NPM* は多量対形成ドメインを持っているため、*NPM* 変異体は野生型の *NPM* に結合してその局在を核小体から細胞質に変えてしまう。このことから、*NPM* 変異体は、野生型の *NPM* の局在を細胞質に変えることにより機能している可能性が考えられる。申請者らは今までの

研究から、NPM 変異体を造血系前駆細胞に発現させるとコロニー形成能が長く維持されるようになり、Hoxa9 遺伝子の発現が上昇することをすでに明らかにしている。しかしながら、この影響は一過的であり、しばらくすると細胞は分化してしまう。より実際の患者で起こっている現象に実験系を近づけるために、NPM+/-マウスから造血系前駆細胞を採取して NPM 変異体を発現させたところ、Hoxa9 の発現量が野生型の細胞を用いた場合よりも顕著に増加し、コロニー形成能もより長く維持されるようになることが明らかになった。NPM 変異体は野生型の細胞よりも NPM+/-マウス由来の細胞をより強くトランスフォームしたことから、NPM 変異体は野生型の NPM の機能を阻害することにより AML 発症に寄与している可能性が示唆された。現在、NPM+/-マウス由来の造血系前駆細胞に NPM 変異体と共に IDH2、DNMT3A、FLT3 の変異遺伝子を発現させて *in vitro* のコロニー形成能を解析中である。

2 NPM 変異体と共に IDH2、DNMT3A、FLT3 の変異遺伝子を共発現させた細胞は、NPM 変異体のみを発現させた細胞に比べ、マウスに移植すると末梢血中に占める割合が増加した

NPM 変異体を伴う AML では、高頻度に IDH2、DNMT3A、FLT3 等の遺伝子変異を伴う。一部の AML 患者は、NPM、IDH2、DNMT3A、FLT3 全ての変異を同時に持つことが報告されている。そこで、NPM、IDH2、DNMT3A、FLT3 の変異遺伝子全てをレトロウイルスを用いて造血系前駆細胞に感染させ、マウスに移植した。その結果、NPM 変異体のみを感染させた場合に比べて、移植した細胞が末梢血中に占める割合が非常に高くなることが明らかになった。この結果は、NPM 変異体と共に他の変異遺伝子を発現させることにより、細胞の骨髄再構築能もしくは増殖能が増加していることを示唆している。移植マウスが AML を発症するかどうか、現在経過を観察中である。

倫理面への配慮

動物実験は、「厚生労働省における動物実験等の実施に関する基本指針」及び「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に従い、施設内動物倫理委員会の承認を受けて、生命の尊重の十分な配慮のもとに実施する。遺伝子組換え実験は、施設内組換え実験安全委員会の承認を受け、遺伝子組換え実験安全管理規定に従って行う。

本研究では、その他の承認手続きが必要となる調査、研究、実験は行わない。

本研究に関連する、本研究期間中の主な発表論文等

第1年次

(雑誌論文)

実験医学 2011 年 12 月増刊号

「白血病の発生と進展の制御機構」日本語総説

小川原陽子、北林一生

(学会発表)

第73回日本血液学会学術総会 「The critical role of YB-1 in NPMc-induced acute myeloid leukemia.」口頭発表

Yoko Ogawara, Takuo Katsumoto, Takeshi Uchiumi, Kimitoshi Kohno and Issay Kitabayashi

2011 年 10 月名古屋