

機関番号：34419  
 研究種目：基盤研究(B)  
 研究期間：2008 ～ 2010  
 課題番号：20390269  
 研究課題名（和文） 造血幹細胞の細胞内代謝・増殖・分化制御と白血病原因遺伝子が及ぼす影響に関する研究  
 研究課題名（英文） Roles of leukemogenic oncogenes in the regulation of metabolism, growth, and differentiation of hematopoietic stem cells  
 研究代表者：  
 松村 到 (MATSUMURA ITARU)  
 近畿大学・医学部・教授  
 研究者番号：00294083

## 研究成果の概要（和文）：

1. RUNX1のC末端の変異体がGadd45aの発現を抑制してDNA修復能を低下させることを見出した。
2. FIP1L1-PDGFRαが造血幹細胞からの好酸球系前駆細胞(EoP)の発生を増加させるのみでなく、他の系統の前駆細胞からもEoPを産生させることを明らかにした。
3. BCR-ABLおよびその下流のRas/MAPKが骨髄系細胞を増殖させる一方で、p21<sup>WAF1</sup>を介して赤血球造血を抑制することを見出した。

## 研究成果の概要（英文）：

1. The C-terminal deletion mutant of *RUNX1*, RUNX1dC, attenuates DNA-damage repair responses to UV irradiation in murine c-KIT<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> cells by suppressing the expression of *Gadd45a*.
2. FIP1L1-PDGFRα not only enhanced the development of eosinophil progenitors (EoPs) from KSL cells but also aberrantly developed EoPs from progenitors in other lineages.
3. BCR-ABL inhibited erythropoiesis through the induction of p21<sup>WAF1</sup> via Ras/MAPK, while it promoted granulopoiesis.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：造血幹細胞、遺伝子変異、慢性骨髄性白血病、活性型チロシンキナーゼ、増殖シグナル

1. 研究開始当初の背景  
 白血病の起源となる白血病幹細胞 (Leukemic Stem cell, LSC) は、多くの場合 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>

の造血幹細胞レベルの未分化な細胞である。白血病の原因となる遺伝子異常はこの造血幹細胞レベルの細胞に起こるが、どのような

機構で白血病のそれぞれの病型を規定するのは明らかになっていない。  
 また、細胞、特に造血幹細胞の増殖・分化・生存においては細胞外のグルコース濃度、細胞内ATP量などのエネルギー代謝が重要な役割を担うと考えられているが、その制御機構の詳細は明らかではない。

## 2. 研究の目的

本研究では、白血病原性遺伝子が造血幹/前駆細胞の増殖・生存・自己複製におよぼす影響を検討するとともに、造血器腫瘍の病型決定機構を明らかにすることを目的とした。

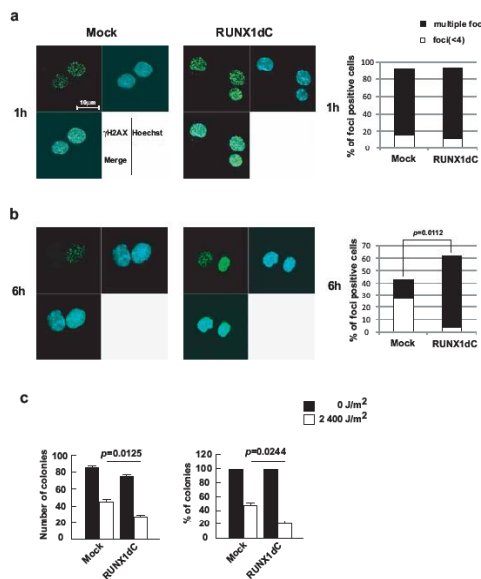
## 3. 研究の方法

野生型マウスおよび癌抑制遺伝子 (p16<sup>INK4A</sup>、p19<sup>ARF</sup>、p16<sup>INK4A</sup>p19<sup>ARF</sup> ダブル、p53) 欠損マウスの造血幹細胞分画を含め c-KIT<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>細胞および各種前駆細胞 (KSL, CMP, GMP, MEP, CLP など) に白血病化に関わる転写因子の変異体 RUNX1 の C 末端の変異 (RUNX1dC)、恒常的活性型チロシンキナーゼ FIP1L1-PDGFR (F/P)、BCR-ABL などを導入し、ゲノムの安定性、細胞の増殖・生存、系統決定がどのように影響されるのかを検討した。

## 4. 研究成果

### (1) RUNX1 変異体の機能解析

急性骨髄性白血病 (AML) や骨髄異形成症候群 (MDS) の一部において認められる RUNX1 の C 末端の変異 (RUNX1dC) をマウスの KSL 細胞に導入したところ UV や  $\gamma$  線の照射前後における DNA の 2 重鎖障害をあらわすヒストン H2AX のリン酸化が増強した。



RUNX1dC 導入と Mock 導入細胞における DNA 損傷の修復に関わる遺伝子の発現変化をスク

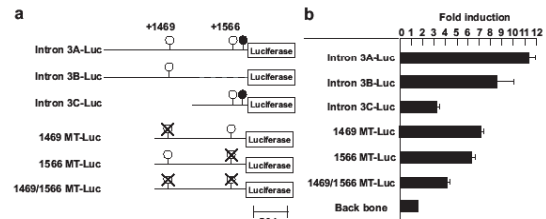
リーニングしたところ Gadd45a の発現低下が認められた。

この細胞に Gadd45a を発現させると DNA 修復能が回復した。また、マウスの未熟な造血細胞に RUNX1dC を導入しても Gadd45a の発現が

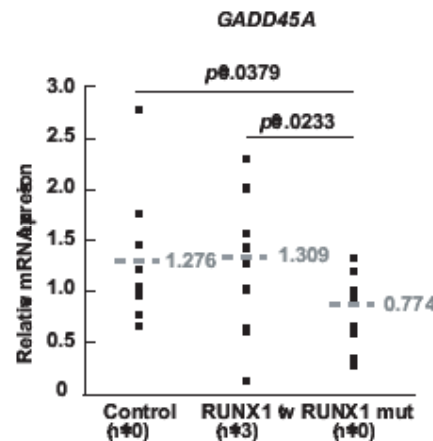
Fold differences of gene expressions (32D-RUNX1dC/32D-neo)

<b>Gadd45a</b>	<b>0.22</b>
<b>Rad51</b>	<b>0.40</b>
<b>Rad17</b>	<b>0.41</b>
<b>Dclre1a</b>	<b>0.49</b>

低下した。さらに、野生型 RUNX1 が Gadd45a のイントロン 3 に存在する RUNX1 結合配列を介して、Gadd45a の転写を制御していることをクロマチン免疫沈降法、ルシフェラーゼアッセイを用いて明らかにした。



実際、RUNX1-dC を有する AML、MDS 症例においては、コントロールの健常人、本変異を有さない MDS 症例と比較して Gadd45a の発現低下が認められることも明らかとなった。



これらの結果から、RUNX1dC の変異は DNA 修復能を低下させ、二次的な遺伝子異常の誘因になることが明らかとなった

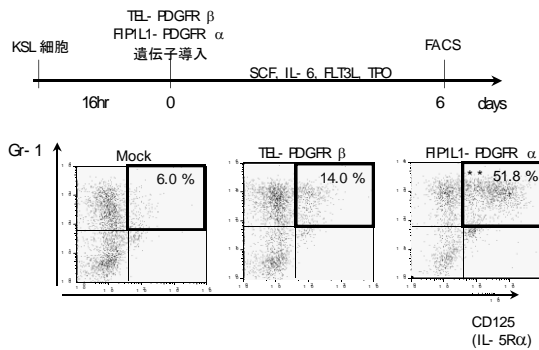
(Leukemia, revise 中)。

(2) FIP1L1-PDGFR (による慢性好酸球性白血

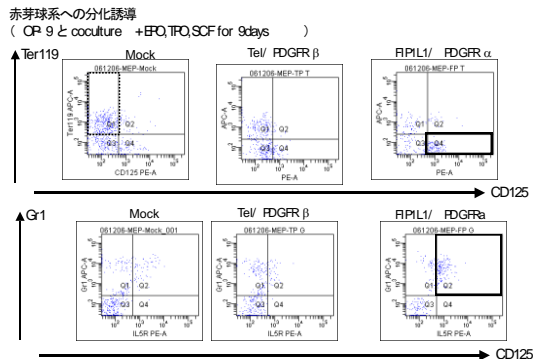
病の発症機構

好酸球系の前駆細胞 (EoP) は、Gr1+IL-5Ra+の表面形質を有し、骨髓球系共通前駆細胞 (CMP)、顆粒球単球系前駆細胞 (GMP) から産生される。F/Pおよび慢性骨髓単球性白血病 (CMML) の原因遺伝子 TEL-PDGFRB (T/P) を造血幹細胞を含むマウス KSL 細胞、および、他系統にコミットメントした、巨核球赤芽球系前駆細胞 (MEP)、リンパ系共通前駆細胞に導入し、EoP の発生に及ぼす影響について検討を行った。

F/P を KSL 細胞に導入すると、T/P 導入時と比較して EoP の発生が強く促進された。



また、MEP に導入した場合には、赤芽球分化が阻害され、系統転換により EoP が発生した。



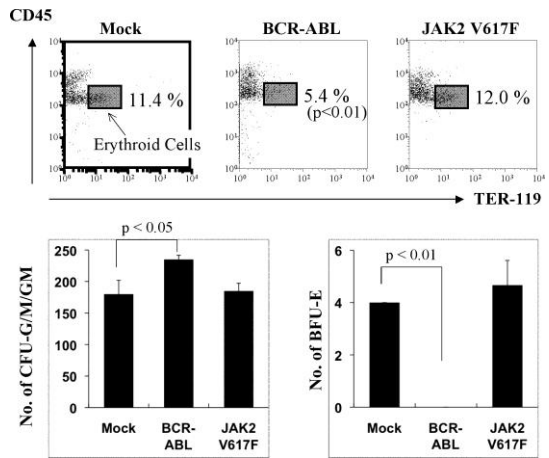
CLP に導入した場合にも、B リンパ球の発生が阻害され、系統転換により EoP が発生した。各種阻害薬を用いた結果、F/P による EoP の誘導には、Ras/MAPK、p38MAPK が関与していると考えられた。さらに、F/P は GATA-2、CEBPA の発現を誘導することも明らかとなった。

(J Biol Chem 284, 7719-7732, 2009 文献 6)

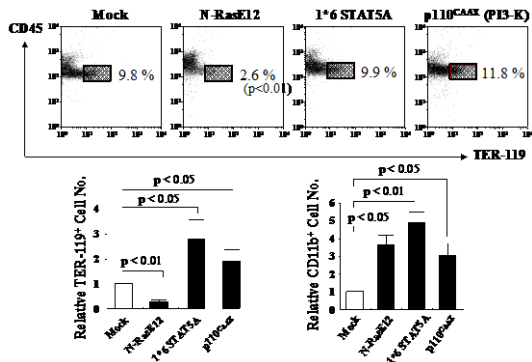
3. BCR-ABL による赤血球造血の抑制機序  
慢性骨髄性白血病 (CML) の原因遺伝子 BCR-ABL、真性多血症 (PV) の原因遺伝子 JAK2V617F は共に恒常的活性型チロシンキナーゼとして機能し Ras/MAPK、STAT、PI3-K という共通した下流分子を活性化するが BCR-ABL は貧血、JAK2V617F は多血症と異な

った病態を引き起こす。

BCR-ABL、JAK2V617F を KSL 細胞に導入すると、BCR-ABL は顆粒球系前駆細胞を有意に増加させたが、赤芽球系前駆細胞を減少させた。一方、JAK2V617F はこれらの前駆細胞数にはほとんど影響しなかった。



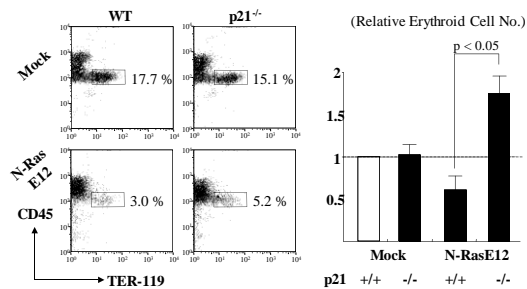
BCR-ABL の下流分子のうち、Ras の活性化変異体 (N-RasE12)、STAT5 の活性化変異体 (1\*6STAT5A)、PI3K の活性化変異体 (p110CAAX) をそれぞれ KSL 細胞に導入すると、いずれの変異体も顆粒球系前駆細胞を有意に増加させた。一方、赤芽球系前駆細胞は 1\*6STAT5A と p110CAAX によって増加したが N-RasE12 によって減少した。これらの結果から BCR-ABL 下流の Ras の経路が赤血球造血を



抑制すると考えられた。

Ras の経路が顆粒球系細胞の増殖を促進するのに対し、赤血球造血を抑制する機構として、赤血球特異的転写因子 GATA-1 が Ras の下流の MEK1 と直接結合し、Ras の増殖シグナルを阻害することを見出した。

N-RasE12 を導入した KSL 細胞では、細胞増殖を抑制する分子として p16<sup>INK4A</sup>、p19<sup>ARF</sup>、p21<sup>WAF1</sup> の発現誘導がみられたが、p16<sup>INK4A</sup>、p19<sup>ARF</sup> を共に欠損するマウスの KSL 細胞を用いても N-RasE12 による赤血球造血の抑制は回避されず、p21<sup>WAF1</sup> を欠損する KSL 細胞では赤芽球系前駆細胞の比率は減少するものの、絶対数は逆に増加した。



これらの結果から BCR-ABL は p21<sup>WAF1</sup> を介して赤血球造血を抑制すると考えられた。また、p21<sup>WAF1</sup> は p53 の標的分子であるが、p53 欠損 KSL 細胞でも N-RasE12 による赤血球造血の抑制がみられたことから BCR-ABL による p21<sup>WAF1</sup> の発現誘導は p53 非依存性であることが示された。  
(J Biol Chem 285:31774-31782, 文献 5)

## 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)

- ①Chihara T, Wada N, Matsumura I, et al. (他10名、9番目) Frequency of intravascular large B-cell lymphoma in Japan: Study of the Osaka Lymphoma Study Group. J Hematol Oncol. 査読有、2011, online publication.
- ②Shibata M, Ezoe S, Matsumura I, et al. (他8名、10番目) Predictability of the response to tyrosine kinase inhibitors via in vitro analysis of Bcr-Abl phosphorylation. Leuk Res. 査読有、2011, online publication.
- ③Fujita J, Mizuki M, Matsumura I, et al. (他7名、9番目) Myeloid neoplasm-related gene abnormalities differentially affect dendritic cell differentiation from murine hematopoietic stem/progenitor cells. Immunol Lett. 査読有、136:61-73, 2011.
- ④Maeda Y, Sasakawa A, Matsumura I, et al. (他6名、9番目) Senescence induction therapy for the treatment of adult T-cell leukemia. Leuk Lymphoma. 査読有、52:150-152, 2011.
- ⑤Tokunaga M, Ezoe S, Matsumura I, et al. (他8名中、10番目) BCR-ABL but not JAK2

V617F inhibits erythropoiesis through the Ras signal by inducing p21CIP1/WAF1. J Biol Chem. 査読有、285:31774-31782, 2010.

⑥Fukushima K, Matsumura I, Ezoe S, et al. (他13名中、2番目) FIP1L1-PDGFRalpha imposes eosinophil lineage commitment on hematopoietic stem/progenitor cells. J Biol Chem. 査読有、284:7719-7732, 2009.

⑦Sato Y, Matsumura I, Tanaka H, et al. (他9名中、2番目) AML1/RUNX1 works as a negative regulator of c-Mpl in hematopoietic stem cells. J Biol Chem. 査読有、283:30045-30056, 2008.

⑧Shizusawa T, Shibayama H, Matsumura I, et al. (他11名他、6番目) The expression of anamorsin in diffuse large B cell lymphoma: possible prognostic biomarker for low IPI patients. Leuk Lymphoma. 査読有、49:113-121, 2008.

⑨Sasaki H, Hayakawa J, Matsumura I, et al. (他10名他、9番目) Difference between genomic actions of estrogen versus raloxifene in human ovarian cancer cell lines. Oncogene. 査読有、27:2737-2745, 2008.

⑩Matsumura I, Mizuki M, Kanakura Y. Roles for deregulated receptor tyrosine kinases and their downstream signaling molecules in hematologic malignancies. Cancer Sci. 査読有、99:479-485, 2008.

(他 3 件)

[学会発表] (計 23 件)

- ① Tokunaga M, Matsumura I, et al. BCR-ABL suppresses erythropoiesis through Ras signaling by the Induction of P21cip1/waf1  
第 72 回 日本血液学会学術集会  
2010. 9. 24
- ② Tanaka H, Matsumura I, et al. Iron-overload impairs normal hematopoiesis and would contribute to disease progression of MDS  
第 72 回 日本血液学会学術集会  
2010. 9. 24

- ③ 松村 到  
慢性骨髄性白血病と第二世代 ABL チロシン  
キナーゼ阻害剤  
第 72 回 日本血液学会学術集会  
2010.9.24
- ④ 松村 到、田中宏和  
AML 幹細胞の特性解析  
第 69 回 日本癌学会学術集会  
2010.9.22
- ⑤ 松村 到  
急性骨髄性白血病の治療  
第 71 回日本血液学会総会 教育講演  
2009.10.23
- ⑥ Itaru Matsumura  
Effects of iron overload on  
hematopoiesis  
The 8th International Porphyrin-Heme  
Symposium 2008.10.16  
(他 17 件)

[図書] (計 14 件)

- ① 松村 到、医薬ジャーナル社、WH 血液  
腫瘍分類 ～WHO 分類 2008 をうまく活  
用するため～、(2010)、587、(38-45)
- ② 松村 到、中外医学社、Annual Review  
血液、(2010)、229、(107-113)  
(他 12 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松村 到 (MATSUMURA ITARU)  
近畿大学・医学部・教授  
研究者番号：00294083

### (2) 研究分担者

金倉 譲 (KANAKURA YUZURU)  
大阪大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：20177489  
(H21 まで分担者として参画)

水木 満佐央 (MIZUKI MASAO)  
大阪大学・附属病院・准教授  
研究者番号：80283761  
(H21 まで分担者として参画)

織谷 健司 (ORITANI KENJI)  
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：70324762  
(H21 まで分担者として参画)

柴山 浩彦 (SHIBAYAMA HIROHIKO)  
大阪大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：60346202  
(H21 まで分担者として参画)

芦田 隆司 (ASHIDA TAKASHI)  
近畿大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：30211006

(H22 から分担者として参画)

辰巳 陽一 (TATSUMI YOICHI)

近畿大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：60236552

(H22 から分担者として参画)

嶋田 高広 (SHIMADA TAKAHIRO)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：90319674

(H22 から分担者として参画)

### (3) 連携研究者

なし