

白血病原因遺伝子の研究

《研究の概要》

最近の分子遺伝学の進歩により、ヒトの白血病の原因遺伝子が相次いで同定され、白血病の発症機構の解明に向けて著しい研究の進歩を見ている。これら白血病の原因遺伝子の中で、多くを占めるグループとして転写因子をコードしている遺伝子群が挙げられる。本研究では、これら転写因子をコードする遺伝子の中でも我々のグループが同定したホメオボックス遺伝子を対象にその白血病発症における意義を検討した。

(1) マウス急性骨髄性白血病 (AML) において原因遺伝子となっている HOXA9、HOXB8、Meis1、Meis2 の *in vitro* における機能を分化との関係に注目して解析した。まず、これらの遺伝子は骨髄顆粒球への分化にしたがってその発現が抑制されることがわかった。逆にこれらの遺伝子をマウス骨髄細胞株に導入すると G-CSF による分化を抑制されることが示された。さらに HOX 及び Meis 蛋白は血液細胞の核内において PBX 蛋白を介して DNA と結合し複合体を形成していること、この複合体も血液細胞の分化にしたがって量を減じることが判り、マウス白血病においてこれらの遺伝子が活性化することが DNA との結合を介して下流の標的遺伝子の発現調節に以上を及ぼしている可能性が示唆された。

(2) 次に、平行してヒト白血病における新しいキメラ型ホメオボックス遺伝子を同定した。染色体転座 t(1;11)(q23;p15) を有する AML において NUP98-PMX1 を、t(7;11)(p15;p15) を有する慢性骨髄性白血病 (CML) と骨髄異形成症候群 (MDS) の症例で、それぞれ NUP98-HOXA11 と NUP98-HOXA13 のキメラを同定した。

(3) さらに、これらのホメオボックス蛋白や、軟部肉腫において白血病と同様にしばしば認められるキメラ転写因子について、それぞれ明細胞肉腫と Ewing 肉腫で見られる EWS-ATF1 と EWS-FLI1 についても標的遺伝子の同定を行った。転写因子の標的を同定する方法としては、これまでにいくつか知られていたが、何れも欠点があり効率の良い方法とは言えなかった。そこで、クロマチン免疫沈降法と GFP レポーターアッセイを組み合わせた DIGR 法を新規に開発した。対象となった転写因子 HOXA9、ATF1、FLI1 に対する特異抗体をそれぞれ作製し、これらの抗体を用いて *in vivo* における蛋白 DNA 複合体を検出した。次に、この蛋白 DNA 複合体から DNA を抽出して、これらの DNA 配列がプロモーターもしくはエンハンサーとして作用するように GFP 蛋白の上流に挿入して発現ライブラリーを作製した。このライブラリーを VP16 蛋白の転写活性化領域と融合させた対象転写因子の発現ベクターと培養細胞に導入し、GFP の蛍光を検出することで陽性クローンを得た。得られたクローンにはそれぞれの転写因子の結合配列が含まれるものが少なからず存在し、この方法の有用性が確認された。さらに、各々の陽性クローンの検討を行い、幾つかの興味深い標的遺伝子を同定した。中でも、HOXA9 の標的 Irak-m、EWS-ATF1 の標的 POSH については、腫瘍の発生と進展における意義を提示することが出来た。このように、DIGR 法は長所と意義のある方法と考えられたが、標的遺伝子の大規模かつ高効率な同定にはさらなる改良が必要で今後の検討課題であると考えられた。

研究者氏名及び所属機関

研究者氏名	所属機関及び地位	分担研究課題
中村卓郎	(財) 癌研究会 癌研究所 発がん研究部 部長	研究全般
齋木由利子	(財) 癌研究会 癌研究所 発がん研究部 研究員	遺伝子産物の機能解析

研究報告

I 研究目的

最近の分子遺伝学の進歩により、ヒトの白血病の原因遺伝子が相次いで同定され、白血病の発症機構が解明に向けて著しい進歩を見ている。我々のグループもこれまでに、ヒト白血病とマウス白血病の原因遺伝子を同定して来た。これら白血病原因遺伝子には数多くの種類があり、その機能も多岐にわたっているが、中でも骨髄性白血病原因遺伝子の多くは、転写因子と呼ばれる種類の蛋白をコードしている。転写因子は、特異的な DNA 配列を認識しここに結合することによって、下流に存在する標的遺伝子の発現調節を行うことが知られている。つまり、転写因子は自身が細胞内伝達機構や細胞回転に直接働きかけるのではなく、標的遺伝子の発現の調節を司ることによって細胞の分化や増殖をコントロールし、さらに白血病や軟部肉腫では、この調節機構の異常が腫瘍を引き起こしていると考えられている。したがって、特異的な標的遺伝子を同定しその機能を解明しない限り転写因子自身の機能の本質を見究めることが出来ず、ひいては発がん機構の解明も覚束ないが、実際そのような標的遺伝子が何かは殆どわかっていない。これは、白血病のみならず転写因子研究全般に関わる解決されるべき重要な課題でもあり、新しい方法の開発による標的遺伝子の解明が必要である。

本研究では、まず出発点としてホメオボックス蛋白の血液細胞における機能を培養系の実験を用いて、血液細胞の分化に及ぼす影響と機序を検討する。次に、白血病において異常な発現を示すことが知られている HOXA9 のようなホメオボックス蛋白や、軟部肉腫において特異的に形成されるキメラ型転写因子が、どのような遺伝子を標的とし、どのような仕組みで標的遺伝子の発現調節を行って、骨髄細胞、白血病細胞及び間葉系細胞の分化と増殖に関与しているかを知るために、標的遺伝子を同定する新しい方法を開発し実行する。同時に、さらなる白血病原因遺伝子を同定して白血病発症機序に対する理解を深める。

II 研究計画および材料と方法

1. ホメオボックス遺伝子の骨髄細胞分化における意義の検討

マウス骨髄細胞株 32Dc13 は、G-CSF により顆粒球分化を示す。この細胞を用いて顆粒球分化によって HOXA7/A9/B8 及び Meis1/Meis2 遺伝子の発現強度が変化するかを調べた。次に、HOXA9/B8 と Meis1/Meis2 の各遺伝子を発現ベクターに組み込んで 32Dc13 細胞に導入した。これらの細胞に G-CSF を再び投与してホメオボックス遺伝子の恒常的発現が分化を抑制するかどうか形態学的に調べた。さらに、これらのホメオボックス蛋白は標的 DNA と

の結合に際して hetero-oligomeric な複合体を形成していることが示されている。血液細胞におけるこれらの複合体の性状と、顆粒球分化がこれらの複合体に及ぼす影響をゲルシフトアッセイ法 (EMSA) にて検討した。

2. 発がん性転写因子の標的遺伝子の同定

転写因子の標的遺伝子の同定は、実際にこれらの転写因子が発がん重要な役割を果たしていることが確実な腫瘍細胞、すなわちこれらの転写因子に一次的な構造異常を来している腫瘍細胞を対象として行った。まず初めに HOXA9 と Meis1 が共に活性化しているマウス白血病細胞 M1 を用いて、パラフォルムアルデヒドによる蛋白質-DNA crosslinking を行い、抗 HOX 及び抗 Meis 抗体を用いた immuno-affinity purification 法により、これらのホメオボックス蛋白に特異的に結合している DNA 断片を分離した。本法は、細胞内での DNA-蛋白複合体を直接検出できる最良の方法と考えられるが、この方法のみで標的遺伝子まで到達するのは困難であると考えられた。そこで、mammalian expression system を用いて標的 DNA 同定のためスクリーニングを飛躍的に効率化し、標的遺伝子を一挙に多数同定することを以下のように計画した。

得られた DNA 断片を、Green fluorescent protein (GFP) の上流に入るように mammalian expression vector に組み込んで library を作製した。50 クローンの混合培養液から plasmid DNA を調製し、96 well plate において VP16 蛋白と融合させた目的の転写因子 HOXA9 を組み込んだ expression vector とともに HeLa 細胞に co-transfect した。この作業は、自動バイオワークステーションを利用して 96 穴プレート上で行い、効率化と大量処理を図った。VP16 蛋白の転写活性化作用によって、GFP の発現する結合配列を含む断片をもったクローンの存在する well では、GFP の蛍光が位相差蛍光顕微鏡を用いて確認された。陽性細胞の存在する well から、段階希釈によって目的のクローンを単離し、sequence 解析と genomic DNA library のスクリーニングとにより標的遺伝子を同定した。これらの候補遺伝子が、それぞれの転写因子の真の標的であることは、特異的な DNA 結合配列の存在、EMSA 法或いはクロマチン免疫沈降法による転写因子との結合の確認、ルシフェラーゼアッセイによる転写調節の有無、Northern 法や RT-PCR による遺伝子発現の変化を検討することによって判断した。

次に、HOXB8 と Meis2 が活性化しているマウス骨髄単球性白血病細胞 WEHI3B、キメラ遺伝子 EWS-ATF1 が形成されている明細胞肉腫細胞 CCSK/KAS、EWS-FLI1 が形成されている Ewing 肉腫細胞 EWS において、それぞれの転写因子の標的遺伝子を同様に DIGR 法を用いて同定した。M1 細胞や WEHI3B 細胞が、マウス由来だったのに対して CCSK/KAS 細胞と EWS 細胞はヒト由来の腫瘍細胞なので、ヒトゲノムプロジェクトが終了してゲノム DNA 配列がデータベースで公開された後は、標的遺伝子までの到達速度がアップした。標的遺伝子として同定された一部の興味深いものについては、その生物学的意義を検討して腫瘍発生における転写因子の標的遺伝子の発現調節を介した機能を考察した。

3. 新しいヒト白血病原因遺伝子 (新規キメラ遺伝子) の同定

新しいヒト白血病原因遺伝子の同定は、秋田大学医学部第三内科の三浦偉久男博士、東京医科大学第一内科の大屋敷一馬教授から提供された症例を対象として行った。これらは、

染色体転座 t (1;11) (q23;p15) を示す AML、同じく t (7;11) (p15;p15) を示す CML と MDS 各 1 例であった。これらの症例については 11p15 に存在する NUP98 遺伝子が転座切断点に存在すると考えられたので、3' -RACE 法或いは hemidegenerate RT-PCR 法を用いて融合相手の遺伝子を同定した。その後、シーケンス解析を行ってキメラ遺伝子の詳細な構造を決定し、その意義を検討した。

III 研究成果

1. ホメオボックス遺伝子の骨髄細胞分化における意義の検討

BXH2 マウス白血病では、レトロウイルスの挿入とその enhancer-activation 作用によって HOXA9 及び Meis1 遺伝子が異常発現を示していた。また、マウス白血病細胞株 M1 や WEHI3B でも HOXA9 と Meis1、或いは HOXB8 と Meis2 の発現異常が同様のメカニズムで生じていた。そこで、これらのホメオボックス遺伝子の発現が骨髄細胞の分化に与える影響をマウス骨髄細胞株 32Dc13 を用いて検討した。32Dc13 細胞に G-CSF 刺激を加えると顆粒球への分化が誘導されるが、HOXA9、HOXB8、Meis1、Meis2 各遺伝子の発現は何れも 32Dc13 細胞の分化に伴い down-regulate することがわかった。次にこれらの 4 種類の遺伝子を各々導入した 32Dc13 細胞では、G-CSF 刺激による顆粒球分化が抑制されることがわかり、ホメオボックス遺伝子の恒常的発現が下流の標的遺伝子の発現に影響を及ぼして分化を乱す可能性が示された。

BXH2 マウス白血病や M1 細胞、WEHI3B 細胞では、HOX と Meis 遺伝子が co-activate しているので、これらホメオボックス蛋白の相互作用を EMSA にて検討した。これまでに Hox 蛋白の DNA 結合における co-factor として PBX 蛋白が知られていたが、今回 Meis 蛋白が PBX 蛋白と結合して標的配列を認識し in vivo で主要な複合体として存在することがわかった。さらに、Meis 蛋白は PBX との結合を介して PBX-HOX-DNA 複合体に associate できることも示され、これらのホメオボックス蛋白が、単独で或いは複合体を形成して標的遺伝子の発現調節を行っている可能性が示された。32Dc13 細胞の核抽出物を用いて PBX-ROX-Meis 複合体を同様に EMSA を用いて検討した。G-CSF 刺激を加える前と顆粒球に分化した後とで比較すると、核内におけるホメオボックス蛋白と DNA の複合体が顆粒球分化に伴い著しく減少していることが明らかになり、転写因子としてのホメオボックス蛋白複合体の機能も分化とともに抑制されていることが示唆された。

2. 発がん性転写因子の標的遺伝子の同定

(1) DIGR 法の開発

ホメオボックス蛋白を初めとする転写因子の腫瘍細胞における標的遺伝子を確実に網羅的に同定するための手段として、蛋白-DNA クロスリンキング/免疫沈降/GFP レポーターアッセイ法 (DIGR 法) を開発した。この方法は、転写因子が生物学的に意味のある機能を示している細胞や組織において、in vivo における DNA との結合状態を反映し、e 得られた結合配列のうち転写因子により転写調節が確実に生じるものを効率良く同定する方法と考えられた。

これは、以下のような手順で実行された。HOX や Meis が活性化しているマウス白血病細胞 M1、WEHI3B を用いて、パラフォルムアルデヒドによる蛋白質-DNA crosslinking を行

い、抗 HOXA9 及び抗 HOXB8 抗体を用いた immuno-affinity purification 法により、これらのホメオボックス蛋白に特異的に結合している DNA 断片を分離した。得られた DNA 断片を、GFP の上流に入れプロモーターまたはエンハンサーとして作用するように mammalian expression vector に組み込んで library を作製した。20-50 クローンの混合培養液から plasmid DNA を調製し、96well plate において VP16 蛋白と融合させた HOXA9 或いは HOXB8 を組み込んだ expression vector とともに HeLa 細胞に co-transfect すると VP16 蛋白の転写活性化作用によって、GFP の発現する結合配列を含む断片をもったクローンの存在する well は、GFP の蛍光を位相差蛍光顕微鏡により確認できた。陽性細胞の存在する well を、2 段階の選択によって目的のクローンが単離できた。陽性クローンについてはシーケンス解析をする他に genomic DNA library をスクリーニングして近傍にある遺伝子の同定を行った。また、陽性クローンについては luciferase expression vector に挿入し直して、luciferase assay により HOX の結合能と HOX による転写制御についても検討した。この結果、M1 細胞から 4,000 クローンをスクリーニングして in vivo における結合配列を含む 9 個の陽性クローンを、WEHI3B 細胞から 10,000 クローンをスクリーニングして 7 個の陽性クローンを得た。

次にキメラ型転写因子を発現している肉腫等の細胞系・転写因子に同様の方法を適用し、その標的遺伝子を同定した。対象としてキメラ遺伝子 EWS-ATF1 が発現しているヒト明細胞肉腫細胞 CCSK/KAS、EWS-FLI1 が発現しているヒト Ewing 肉腫細胞 EWS を用いた。スクリーニングの結果 CCSK/KAS 細胞では 20,000 クローンから 62 個の陽性クローンを、EWS 細胞では 15,000 クローンから 60 個の陽性クローンをそれぞれ得て、その近傍にある遺伝子の同定を行った。CCSK/KAS 細胞における EWS-ATF1 標的候補のクローンでは、16 クローンに CREB/AP-1 結合配列が含まれ、さらにこれらのクローンについてはクロマチン免疫沈降法或いは EMSA 法で EWS-ATF1 との結合が再確認された。

(2) 標的遺伝子の同定とその生物学的意義の検討

まず、上記 CCSK/KAS 細胞から同定した 16 クローンの標的候補から、近傍に存在する遺伝子の発現が EWS-ATF1 の結合によって変化する 6 種類の遺伝子を同定した。これらは、POSH、ATM、GPP34、ARNT2、NKX6.1、NYD-SP28 の各遺伝子であり、DIGR 法により複数の標的遺伝子を一度に同定出来ることが確認された。EWS-ATF1 は、POSH 遺伝子のプロモーター領域に存在する AP-1 site に結合し POSH の発現を抑制した。POSH は Rac の結合分子として同定され、JNK 経路を活性化して線維芽細胞のアポトーシスを誘導する。そこで、CCSK/KAS 細胞に発現ベクターに組み込んだ POSH cDNA を導入して恒常的に発現させると、CCSK/KAS 細胞はアポトーシスを示すことが明かとなった。また、EWS-ATF1 は、今回同定された POSH 以外の標的遺伝子に対しては転写活性化因子として作用していることがレポーターアッセイと RT-PCR の結果から示された。一方、BCAR3、RPS18、p29 が Ewing 肉腫における EWS-FLI1 の標的遺伝子として同定され、DIGR 法の幅広い応用の可能性も示された。EWS-FLI1 は、これらの標的遺伝子に対して転写を直接の活性化や抑制は示さないが、野生型 FLI1 が示す転写抑制能を解除する現象が観察された。

一方、マウス白血病細胞 M1 では、同様に Irak-m (IL-1 receptor associated kinase-myelomonocytic type) 遺伝子が HOXA9 の標的遺伝子の一つとして同定された。Irak-m 遺伝子は、IRAK ファミリーに属するセリン/スレオニンキナーゼで、IL-1R を含む Toll-like

receptor ファミリーの下流に存在して I_κB をリン酸化すると考えられている。HOXA9 は、PBX や Meis との結合を介さないで単独に Irak-m の結合配列を認識し、その転写を活性化することが示された。

3. 新しいヒト白血病原因遺伝子（新規キメラ遺伝子）の同定

染色体転座 t (7;11) (p15;p15) を有するヒト骨髄性白血病では、nucleoporin 遺伝子 NUP98 が HOXA9 とキメラ遺伝子を形成している。最近の我々や他のグループの研究で 11p15 に染色体異常のあるヒト白血病症例が t (7;11) 以外にも少なからず存在し、これらの症例では NUP98 と他の遺伝子から成る未知のキメラが形成されている可能性が示唆された。そこで、第一の症例として t (1;11) (q23;p15) を示すヒト AML におけるキメラ遺伝子を 3' -RACE 法を用いて同定した。この症例では、NUP98 と 1q23 に存在するホメオボックス遺伝子 PMX1 とが融合していた。この結果 NUP98-HOXA9 キメラ同様 NUP98 の核細胞質間の物質輸送に重要な役割を果たしている GLFG モチーフと PMX1 のホメオドメインを有するキメラ蛋白が形成されることが分かった。

次に、新たに発見された t (7;11) (p15;p15) を有する CML 及び MDS 症例各 1 例において NUP98-HOXA9 キメラの確認を試みると、これらの症例では HOXA9 遺伝子内には転座切断点が存在しないことに気付いた。しかしながら、HOXA 遺伝子群は 7p15 上で約 100kb の範囲内で遺伝子クラスターを形成していることから、他の HOXA 遺伝子と NUP98 との間にキメラが形成されている可能性が考えられた。そこで HOXA 遺伝子のホメオドメイン内に degenerate primer を設定してキメラ遺伝子の同定を行った。その結果、CML 例において HOXA11 を、MDS 例において HOXA13 をそれぞれ NUP98 の融合相手の遺伝子として同定した。これらの症例では、ゲノムレベルでは HOXA11 と HOXA13 に切断点が存在したが、転写レベルでは NUP98-HOXA11 及び NUP98-HOXA13 のキメラに加えて NUP98-HOXA9 キメラ転写産物が特異的に検出された。

HOXA9、HOXA11、HOXA13、PMX1 に他のグループが同定した HOXD11 と HOXD13 を加えて、NUP98 はヒト白血病において 6 種類のホメオボックス遺伝子とキメラ遺伝子を形成することが最近までに判明している。これらのキメラ蛋白の構造には著しい共通点があり、中でも全てに共通して存在する NUP98 の GLFG モチーフに何らかの生物学的活性が存在することが考えられた。そこで、GAL4 蛋白の DNA 結合ドメインと、NUP98、HOXA9、PMX1、さらにキメラ蛋白との間に融合蛋白を作製してレポーターアッセイを行うと、NUP98 の GLFG モチーフには転写活性化領域が存在し、この融合の結果 NUP98-HOXA9 と NUP98-PMX1 は転写活性化因子となることがわかった。

IV 考察

1. ホメオボックス遺伝子の骨髄細胞分化における意義

HOX 遺伝子を初めとするホメオボックス遺伝子は、胎生期の体節や体軸、四肢の形成に重要な役割を果たしていることが早くから知られている。近年、HOX 遺伝子が血液細胞の分化と維持に深く関与している事実が明らかになって来た。他のグループの研究から顆粒球系前駆細胞では A-D の 4 つの HOX クラスターの内 A 及び B クラスターに属する HOX 遺伝子が優位に発現し、さらに A4 や A5 といったクラスター内で 3' 側に存在するものはより

幼若な細胞群で、5' 端に存在する A9、A10 はより分化度の進んだ細胞で発現していることが明らかとなった。さらに、HOXB2 は赤芽球系に、HOXB7 や HOXC4 は末梢血リンパ球に、それぞれ発現していることも明らかになっている。一方、HOXA10 をレトロウィルスベクターを用いてマウス或いはヒト骨髄細胞に導入すると、pre-B 細胞及びマクロファージへの分化が抑制される一方、巨核球への異常な分化が認められた。これに対して HOXB4 を同様の方法で骨髄細胞に発現させると、より骨髄幹細胞に近い幼若な細胞集団の増殖が認められた。さらに、このような HOXB4 を恒常的に発現する骨髄細胞は正常の幹細胞に近い多分化能と自己複製能を備えていた。また、HOXB7 の発現はより顆粒球系に局限した分化能を有する前駆細胞の増殖を促した。

このような研究と対応して、今回の研究では HOXA9 と HOXB8 の恒常的な発現は顆粒球への分化を途中で阻害することを明らかにした。これらの結果は、正常な血球細胞の分化と自己複製には HOX 遺伝子の統合的な発現制御が必須であり、HOX 発現系の一ヶ所に何らかの異常が生じると分化や増殖の異常が惹起され、それが白血病発症の原因となり得ることを示唆していた。さらに、HOX の co-factor と考えられる Meis1 と Meis2 も同様な効果を示したが、これらの結果は HOX、Meis、PBX がホメオボックス蛋白の複合体として血液細胞で機能していることを示していると考えられた。

2. 発がん性転写因子の標的遺伝子

HOX 蛋白やキメラ型転写因子の腫瘍細胞における機能をより深く理解するために、本研究で開発した DIGR 法を用いた標的遺伝子の同定を進めることが一つの良い手段であると考えられた。一種類の転写因子が制御する標的遺伝子は、一般に数多く存在することが予想されるが、事実 DIGR 法を利用することにより複数の遺伝子が同定され、また遺伝子には至っていないが *in vivo* における標的と考えられる DNA 断片が数多く単離された。また、この手法を利用して広く転写因子一般の標的遺伝子を同定し、転写因子一標的遺伝子の細胞特異的なネットワークを明らかにすることも可能と考えられた。

DIGR 法で同定された個々の遺伝子の発がんにおける機能についてはまだ限られた情報しか得られていない。その中で、明細胞肉腫 CCSK/KAS 細胞において EWS-ATF1 の標的遺伝子として同定された POSH は、G 蛋白である Rac に結合する分子として同定され、JNK 及び NF- κ B 経路を活性化し、線維芽細胞にアポトーシスを誘導することがわかっている。今回の研究では、EWS-ATF1 が POSH の発現を直接抑制すること、POSH を CCSK/KAS 細胞に恒常的に発現させるとアポトーシスを誘導することから EWS-ATF1 が POSH の発現抑制を介して腫瘍細胞のアポトーシスを防ぐことによって明細胞肉腫の発育進展を促している可能性が強く示された。EWS-ATF1 は、POSH 以外の他の標的遺伝子に対しては発現を促進する作用を示した。ATM 遺伝子は、がん抑制遺伝子としての機能が重視されていて発がんの初期段階においては ATM の不活性化がしばしば観察される。しかしながら、ATM 遺伝子の欠失や不活性化が生じずに腫瘍化した細胞では、ATM の発現増加が時に見られこの現象はがん細胞の放射線や抗癌剤に対する防御に重要であるとも考えられている。したがって、EWS-ATF1 による ATM 遺伝子の活性化は今後検討すべき興味ある課題と思われた。また、ARNT2 遺伝子についてはファミリー遺伝子の ARNT が血管新生を正の方向に制御することから、EWS-ATF1 による ARNT2 の活性化が腫瘍血管の増殖を促進している可能性が考えられた。他の標的遺

伝子の機能についても今後の検討課題である。

Ewing 肉腫細胞 EWS において EWS-FLI1 の標的遺伝子として同定された BCAR3、RPS18、p29 についてもさらなる検討が必要である。興味深いことに、EWS-FLI1 はこれらの標的遺伝子の転写活性に対して抑制も亢進も示さなかった。これに対して、野生型 FLI1 はこれらの遺伝子の転写抑制を示した。EWS 細胞においては野生型 FLI1 が少なからず発現していることから、EWS-FLI1 が本来の FLI1 の機能に対して拮抗的に作用している可能性が考えられた。

マウス白血病細胞 M1 においては、Irak-m 遺伝子が HOXA9 の標的として同定された。Irak-m 遺伝子は、IRAK ファミリーに属するセリン/スレオニンキナーゼで、IL-IR を含む Toll-like receptor ファミリーのシグナルを伝達すると考えられ、HOXA9 が Irak-m 遺伝子の転写活性化を介して NF- κ B 経路を活性化している可能性が考えられた。白血病細胞や悪性リンパ腫細胞では NF- κ B 経路がしばしば活性化しているが、ホメオボックス遺伝子の異常がその直接の原因となっている可能性が初めて示唆された。Irak-m における結合配列は HoxA9 単独の標的であったが、標的遺伝子の中には、HOX/PBX 或いは HOX/PBX/Meis といったホメオボックス蛋白複合体に制御されているものがあると考えられ、これらを広く捉えることによってホメオボックス遺伝子の白血病遺伝子としての本質的な機能を解明できるものと思われた。

3. 新しいヒト白血病原因遺伝子（新規キメラ遺伝子）

ヒト AML における NUP98-HOXA9 キメラは 1996 年に報告された。このキメラの原因となる染色体相互転座 t (7;11) (p15;p15) は、AML、CML、及び MDS の一部に見られる比較的稀な染色体異常である。この転座の結果 11p15 に存在し核膜孔蛋白質をコードする NUP98 遺伝子と 7p15 側の HOXA9 とがキメラ遺伝子を形成される。蛋白の構造としては、アミノ端側が NUP98 の FG モチーフ、カルボキシ端が HOXA9 のホメオドメインを含む大部分から成り、本来の HOXA9 の DNA 結合能を保ちながら NUP98 の FG モチーフの機能が付加された蛋白であることが想像される。今回の研究で、実際にこの FG モチーフには転写活性化領域の存在することが示された。この研究期間中に、NUP98 はヒト白血病、特に化学療法に続発する二次性白血病において多様な遺伝子とキメラを形成しているという報告が次々に成されてきた。これらの遺伝子は、HOXA9/A11/A13/D11/D13 及び PMX1 のホメオボックス遺伝子群と非ホメオボックス遺伝子群とに大別される。このうち NUP98—ホメオボックスキメラは全て C 端にホメオドメインを有し構造上極めて類似しているのに対して、非ホメオボックス遺伝子群は一次構造上相互の共通点に乏しい。最近これらの遺伝子がいずれも coiled-coil 構造を持つ可能性が指摘された。この情報の生物学的な意義については不明であるが、AML で転座遺伝子となっているもう一つの nucleoporin 遺伝子 NUP214 の転座相手である SET や DEK も同様の構造を取るとされ興味深い。今後さらに多様な NUP98 の転座相手が報告されてくることが予想されるが、それによりこのキメラの意義も明らかになってくるものと期待される。我々は、現在 NUP98-HOXA9 が骨髄細胞に特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製し、骨髄性白血病の発症を見ている。このモデルを利用して NUP98-HOXA9 の機能を詳細に検討出来ると考えている。

V 研究成果の発表

1. Nakamura, T., Yamazaki, Y., Hatano, Y. and Miura, I. NUP98 is fused to PMX1 homeobox gene in human acute myelogenous leukemia with chromosome translocation t(1;11) (q23;p15). *Blood*, 94, 741-747 (1999).
2. Li, J., Shen, H., Himmel, K. L., Dupuy, A. J., Largaespada, D. A., Nakamura, T., Shaughnessy, J. D., Jenkins, N. A. and Copeland, N. G. Leukaemia disease genes: large-scale cloning and pathway predictions. *Nature Genet.* 23, 348-353 (1999).
3. Hatano, Y., Miura, I., Nakamura, T., Yamazaki, Y., Takahashi, N. and Miura, A. B. Molecular heterogeneity of the NUP98/HOXA9 fusion transcript in myelodysplastic syndrome associated with t(7;11) (p15;p15). *Br. J. Haematol.*, 107, 600-604 (1999).
4. Nakamura, T., Yamazaki, Y., Saiki, Y., Moriyama, M., Largaespada, D. A., Jenkins, N. A. and Copeland, N. G. Evi9 encodes a novel zinc finger protein that physically interacts with BCL6, a known human B-cell proto-oncogene product. *Mol. Cell. Biol.*, 20, 3178-3186 (2000).
5. Saiki Y, Yamazaki Y, Yoshida M, Katoh O, Nakamura T. Human EVI9, a homologue of the mouse myeloid leukemia gene, is expressed in the hematopoietic progenitors and down-regulated during myeloid differentiation of HL60 cells. *Genomics*, 70, 387-391 (2000).
6. Fujino T, Yamazaki Y, Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland NG, Nakamura T. Inhibition of myeloid differentiation by Hoxa9, Hoxb8 and Meis homeobox genes. *Exp. Hematol.* 29:856-863 (2001).
7. Kroon. E., Thorsteinsdottir, U., Mayotte, N., Nakamura, T. Sauvageau, G. NUP98-HOXA9 expression in hemopoietic stem cells induces chronic and acute myeloid leukemias in mice. *EMBO J.*, 20, 350-361 (2001).
8. Fujino T, Suzuki A, Ito Y, Ohyashiki K, Hatano Y, Miura I and Nakamura T. Single translocation and double chimeric transcripts: Detection of NUP98-HOXA9 in myeloid leukemias with HOXA11 or HOXA13 breaks of the chromosomal translocation t(7;11) (p15;p15). *Blood*, 99, 1428-1433 (2002).
9. Suzuki A, Ito Y, Sashida G, Honda S, Katagiri T, Fujino T, Nakamura T., Ohyashiki K. t(7;11) (p15;p15) chronic myeloid leukemia developed into blastic transformation showing a novel NUP98/HOXA11 fusion. *Br. J. Haematol.*, 116, 170-172 (2002).
10. Tsuruyama T, Nakamura T., Jin G, Ozeki M, Yamada Y, Hiai H. The *Stat5a* signal pathway in mouse early pre-B lymphoma induced by retrovirus integration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.
11. 中村卓郎 HOX ファミリーと白血病 血液腫瘍科 印刷中
12. Jishage M, Fujino T, Yamazaki Y, Kuroda H, Nakamura T. Identification of target genes for EWS/ATF-1 chimeric transcription factor. submitted.

13. Jishage M, Osaka M, Nakamura T. Identification of target genes for EWS/FLI-1 chimeric transcription factor: FLI-1 functions as a repressor. in preparation.