

慢性骨髄性白血病急性転化の分子機構の解析

Analysis of molecular mechanism in blastic crisis of chronic myelocytic leukemia

代表研究者 東京大学医学部第三内科助手 三谷 絹子
Assistant Prof. Third Department of Internal Medicine, Faculty of
Medicine, University of Tokyo.
Mitani Kinuko

We have demonstrated that t(3;21)(q26;q22), which is usually found in blastic crisis of chronic myelocytic leukemia or myelodysplastic syndrome-derived leukemia, generates an AML1/EVI-1 chimeric gene and that the t(3;21)-carrying leukemic cell line, named SKH1, expresses the AML1/EVI-1 fusion protein of 180 kD containing amino-terminal half of AML1 including a runt homology domain which is fused to the entire of zinc finger EVI-1 protein. Thus, the AML1/EVI-1 fusion protein is a chimeric transcription factor including a runt homology domain from AML1 and two zinc finger domains from EVI-1, totally three DNA binding domains, and an acidic domain from EVI-1. To evaluate the effect of the AML1/EVI-1 fusion protein on cell growth of SKH1 cells, we prepared the synthetic antisense oligonucleotides with 18 nucleotides spanning the junction point between AML1 and EVI-1 sequences and those with 4 point mutations in their sequences as a negative control. The antisense oligonucleotides suppressed ³H-thymidine incorporation in SKH1 cells and decreased the cell number of the cells in comparison with those including 4 point mutations, suggesting that the AML1/EVI-1 fusion protein should play a crucial role in the growth of leukemic cells with the t(3;21) translocation. To demonstrate the transforming activity of the fusion protein, the AML1/EVI-1 cDNA was introduced retrovirally into Rat1 cells. Cells expressing the fusion product formed colonies in soft agar, indicating the oncogenic potentials of the AML1/EVI-1 fusion protein. Moreover, the introduction of AML1/EVI-1 into Rat1 clones harboring BCR/ABL conferred enhanced ability for anchorage independent growth. The analysis using deletion mutants showed that the second zinc finger domain within the EVI-1 was the functional region critical for transformation. The AML1/EVI-1 could stimulate AP-1 activity through the TRE site as in the EVI-1 itself and the second zinc finger domain was also responsible for the effect to increase AP-1 activity. The transforming ability of the fusion protein could be related to the effect to stimulate AP-1 activity. Because the AML1/EVI-1 is a chimeric transcription factor, we analyzed the function of the fusion protein as a transcription factor. The fusion protein itself did not show the transactivation ability through the PEBP2 site, which the AML1 binds, but dominantly suppressed the transactivation activity by the AML1. The dominant negative effect of the AML1/EVI-1 fusion protein against AML1 was demonstrated to depend on the runt homology domain in the AML1. All these data suggest that the AML1/EVI-1 could play an important role in leukemic progression of chronic myelocytic leukemia by this dual functions as a transcription factor.

研究経過

(1) AML1/EVI-1 の生物学的機能 (造腫瘍性) の検討

A. アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた検討

CMLの急性転化の症例より樹立し、t(9;22)及びt(3;21)を有するヒト白血病細胞株SKH1細胞の培養上清中にBCR/ABL及びAML1/EVI-1のアンチセンスオリゴヌクレオチドを添加し、細胞の増殖に対する影響を検討した。コントロールとしてt(9;22)のみを有しt(3;21)を持たないヒト白血病細胞株K562細胞を用いた。BCR/ABLアンチセンスオリゴヌクレオチドはK562細胞の³H-thymidineの取り込みを著明に低下させたが、SKH1細胞のDNA合成には影響を与えなかった。一方、AML1/EVI-1アンチセンスオリゴヌクレオチドはSKH1細胞のDNA合成を著明に低下させたが、K562細胞には効果を示さなかった。AML1/EVI-1アンチセンスオリゴヌクレオチドはSKH1細胞の増殖も明らかに抑制したが、K562の細胞増殖には影響しなかった。従って、t(3;21)を有する急性転化後の白血病細胞においてはBCR/ABL融合蛋白質よりもAML1/EVI-1融合蛋白質が細胞増殖に重要である可能性が示唆された。

B. レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入による検討

レトロウイルスベクターを用いてBCR/ABL及びAML1/EVI-1の融合cDNAをラットの絨毛膜細胞Rat-1に遺伝子導入し、軟寒天培地上でのコロニー形成能を検討した。AML1/EVI-1融合cDNAを導入されたRat-1細胞は明らかなコロニー形成能の増強を示した。BCR/ABL融合cDNAを導入されたRat-1細胞にもコロニー形成能の増強が観察され

たが、BCR/ABLとAML1/EVI-1融合遺伝子を同時に発現しているRat-1細胞ではBCR/ABL融合遺伝子のみを発現しているRat-1細胞に比べて10倍のコロニー形成能が認められた。従って、AML1/EVI-1融合蛋白質はBCR/ABL融合蛋白質の造腫瘍活性を高め、CMLを急性期に導く可能性が示唆された。さらに、欠失変異体を用いた実験より、AML1/EVI-1のコロニー形成能はEVI-1部分の第2 zinc finger domainに依存していることが明らかになった。

(2) AML1/EVI-1の転写因子としての機能の解析

A. AP-1活性に対する影響

(TRE)-luciferaseをレポータープラスミドとして用いた検討で、AML1/EVI-1融合蛋白質はEVI-1と同様にAP-1活性を上昇させることが明らかになった。AP-1活性は細胞の増殖にともない増加することが知られており、AML1/EVI-1の持つ造腫瘍活性はAP-1活性の刺激に関連した機能であることが予測された。欠失変異体を用いた実験によりAML1/EVI-1のAP-1刺激作用もそのコロニー形成能と同様、EVI-1部分の第2 zinc finger domainに依存していることが確認された。

B. AML1に対する dominant negative effect

AML1は造血細胞に広く発現しており、その分化に重要な役割を担っていると考えられている。AML1は runt homology domain で PEBP2 sites と命名されたDNAシークエンスに結合して転写因子としての機能を示すことが知られている。AML1が転写活性化を示す PEBP2 sites を含むTCRβのプロモーターを luciferase cDNAにつないだTCRβ-luciferaseをレポータープラスミドとして用いた検討では、AML1/EVI-1融合蛋白質自体にはAML1のよ

のようなPEBP2 sites を介する転写活性化能は観察されなかった。しかし、AML1とAML1/EVI-1を共発現させるとAML1/EVI-1はAML1のPEBP2 sitesを介する転写活性化能に対してdominant negative effectを示すことが明らかになった。このAML1/EVI-1のdominant negative effect はrunt homology domainに依存していた。造血細胞の分化に重要な役割を演じていると考えられるAML1に対してAML1/EVI-1はdominant negativeに作用することから、AML1/EVI-1は分化抑制機能を有することが予測された。

研究成果

CMLの急性期に特異的に出現する染色体異常t(3;21)の分子解析により、急性白血病と同様に、CMLの急性転化においても転写因子の構造異常がその発症に重要な役割を担っていることが明らかになった。キメラ型転写因子であるAML1/EVI-1には増殖と分化抑制という2つの機能が観察される。アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた検討及びレトロウィルスベクターを用いた遺伝子導入による検討で、AML1/EVI-1の増殖促進効果及び造腫瘍効果が明らかになった。一方、転写の実験によりAML1/EVI-1にはAP-1活性の刺激作用が存在することが証明されたが、この作用はAML1/EVI-1の増殖効果の一つの機序であると考えられる。AML1に対するdominant negative effectは分化に対する抑制効果を示している。AML1/EVI-1はこの2つの機序によりCMLを慢性期から急性期へと移行させるものと考えられた。

今後の課題と発展

転写因子異常（発現の異常亢進とキメラ型転写因子の形成）が多くの急性白血病あるいはCMLを含む前白血病状態の白血病化

の重要な機序になっていることが証明されている。すなわち、造血細胞の分化及び増殖に関連している転写制御の乱れが腫瘍発症の本質であると考えられる。AML1/EVI-1は白血病に観察される染色体異常の結果形成されるキメラ型転写因子の中で最も機能解析の進んだものとなった。すなわち、1つの分子の中に造腫瘍活性と分化抑制という2つの機能が同居している。しかし、問題となっているのが転写因子である以上、その標的遺伝子が同定されない限り、その分子病態は本当の意味では解明されない。AML1はmyeloperoxidase, neutrophil elastase等の骨髓系細胞の分化に伴って発現してくる遺伝子を標的遺伝子としてもつことが知られており、AML1は骨髓系細胞の分化に重要な役割を担っていることが予測される。一方、EVI-1は正常造血細胞には発現しておらず、その機能及び標的遺伝子は全く不明である。これらの白血病発症に関与していると考えられる正常の転写因子の標的遺伝子を明らかにすることは、正常造血の分化及び増殖の機序に重要な知見を与えることになる。さらには、白血病に観察される異常転写因子の標的遺伝子あるいは正常の転写因子の標的遺伝子の転写活性化能に対する影響を知ることは、白血病発症機構のより詳細な理解につながると考えられる。

発表論文リスト

- 1 MITANI, K., Ogawa, S., Tanaka, T., Miyoshi, H., Kurokawa, M., Mano, H., Yazaki, Y., Misao, O., Hirai, H. (1994): Generation of the AML1-EVI-1 fusion gene in the t(3;21)(q26;q22) causes blastic crisis in chronic myelocytic leukemia. EMBO J 13, 504-510.
- 2 MITANI, K., Ogawa, S., Tanaka, T., Kurokawa, M., Yazaki, Y., Hirai, H.: Growth inhibition of leukaemic cells carrying the t(3;21) by the AML1/EVI-1-specific antisense

oligonucleotide. *Br J Haematol* 90, 711-714.

3 Tanaka, T., Nishida, J., MITANI, K., Ogawa, S., Yazaki, Y., Hirai, H. (1994): EVI-1 raises AP-1 activity and stimulates c-fos promoter transactivation with dependence on the second zinc finger domain. *J Biol Chem* 269, 24020-24026.

4 Tanaka, T., Tanaka, K., Ogawa, S., Kurokawa, M., MITANI, K., Nishida J., Shibata Y., Yazaki, Y., Hirai, H. :An acute myeloid leukemia gene, AML1, regulates hematopoietic myeloid cell differentiation and transcriptional activation antagonistically by two alternative spliced forms. *EMBO J* 14, 341-350.

5 Tanaka, T., MITANI, K., Kurokawa, N., Ogawa, S., Tanaka, K., Nishida, J., Yazaki, Y., Shibata, Y., Hirai, H.: Dual functions of the AML1/Evi-1 chimeric protein in the mechanism of leukemogenesis in t(3;21) leukemias. *Mol Cell Biol* 15, 2383-2392.

6 Tanaka, K., Tanaka, T., Ogawa, S., Kurokawa, M., Mitani, K., Yazaki, Y., Hirai, H. (1995): Increased expression of AML1 during retinoic-acid-induced differentiation of U937 cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 211, 1023-1030.