

---

原 著

---

レトロウイルス遺伝子発現系を用いた  
*MLL-AF4* 融合遺伝子の機能解析

平 嶋 良 章

京都府立医科大学大学院医学研究科小児発達医学\*

Functional Analysis of *MLL-AF4* Fusion Gene Using  
Retroviral Gene Expression System

Yoshifumi Hirashima

Department of Pediatrics,

Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science

抄 録

*MLL-AF4* 陽性急性リンパ性白血病の予後は現在も不良で、その白血病発症機序の解明は新たな治療法の開発に向けて重要である。我々はレトロウイルス遺伝子発現系を用い、*MLL-AF4* 融合遺伝子の白血病発症機序の解析を行った。Myeloid transformation assayの結果、*MLL*-murine *Af4* (*mAf4*) はマウス Lineage-(Lin-) 骨髄細胞を不死化でき、変異体解析では、*mAf4* (aa.1026-1177) の領域が必須であると判明した。定量 RT-PCR で *HoxA9*, *A10*, *Meis1* の発現増強が見られ、クロマチン免疫沈降法で、*HoxA9* のプロモーター領域のヒストン H3 リジン 79 (H3K79) dimethylation が見られ、*MLL-mAf4* は *HoxA* 群遺伝子プロモーターの H3K79 dimethylation を介し *HoxA* 群遺伝子発現を増強させることで Lin- 骨髄細胞を不死化していると考えられた。本実験モデルはヒトの *MLL-AF4* 陽性白血病の白血病発症機序を良く再現しており、新規治療法の開発に向けた優れたモデルとなることが期待される。

キーワード：MLL-AF4, 急性リンパ性白血病, レトロウイルス遺伝子発現系, *HoxA* 群遺伝子, H3K79 dimethylation.

Abstract

Because the prognosis of *MLL-AF4*-positive acute lymphoblastic leukemia is still extremely poor, understanding of leukemogenic mechanism of *MLL-Af4* fusion gene is important for the development of new treatments. We analyzed the leukemogenic mechanism of *MLL-AF4* fusion gene using retroviral gene expression system. As a result of myeloid transformation assay, we revealed that *MLL*-murine *Af4* (*mAf4*) could immortalize murine lineage-depleted bone marrow (Lin-BM) cells. Using a series of hybrid mutants of human *AF4/mAf4*, we found that amino acids 1026 to 1177 of *mAf4* are essential for the leukemogenesis of *MLL-mAf4* fusion gene. Overexpression of *HoxA9*, *A10*, and *Meis1* was confirmed by quantitative RT-PCR analysis of the transduced Lin-BM cells. Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

assay demonstrated histone H3 lysine79 (H3K79) dimethylation was occurred in promoter regions of *HoxA9*. Based on these results, we considered that *MLL-mAf4* immortalized murine Lin-BM cells by induction of the overexpression of *HoxA* genes through H3K79 dimethylation in promoter regions of these genes. Our mouse model expressing MLL-mAf4 reproduces well the leukemogenic mechanism of human *MLL-AF4*-positive leukemias, it is expected to be a good model for the development of new treatments.

**Key Words:** MLL-AF4, ALL, Retroviral gene expression system, HoxA genes, H3K79 dimethylation.

## 緒 言

近年、小児急性リンパ性白血病の予後は化学療法、造血細胞移植、支持療法の発展に伴い、飛躍的に改善し、その無病生存率は著しく向上している<sup>1)</sup>。しかしながら、こうした白血病治療の進歩にも関わらず、1歳未満に発症する急性リンパ性白血病(乳児 ALL)はいまだ極めて予後不良であり<sup>2)</sup>、その治療成績の向上は小児白血病の治療における緊急の課題の一つである。乳児 ALL における最大の分子生物学的特徴は 11 番染色体 q23 に位置する Mixed lineage leukemia (*MLL*) 遺伝子の再構成であり、この *MLL* 遺伝子再構成の有無が、最大の予後因子である事が明らかにされている<sup>2,3)</sup>。*MLL* 遺伝子は、3つの染色体転座; t(4; 11), t(9; 11), t(11; 19) の共通の切断点から同定された転写因子であり<sup>4)</sup>、近年の機能解析研究から、主に *HoxA* 群遺伝子の発現を制御し、正常造血の維持に必須である事が明らかとなった<sup>5,6)</sup>。本遺伝子の再構成は、乳児 ALL の約 80%に見られ、うち t(4; 11) の核型異常を呈し、*MLL-AF4* 融合蛋白の発現を伴う群が約 70%を占め、その生存期間の中央値は 10 ヶ月と極めて予後不良なため<sup>2)</sup>、この *MLL-AF4* 融合遺伝子の機能解析が、乳児 ALL の治療成績向上には必須である。*MLL* 融合遺伝子の機能解析としては、*MLL-ENL*, *MLL-ELL* といった融合遺伝子においてレトロウイルス遺伝子発現系を用いた詳細な機能解析が行われているが<sup>7,8)</sup>、*MLL-AF4* においては、その機能解析は進んでいない。そこで、本研究において、我々は、*MLL-AF4* 融合遺伝子の白血病発症機序の解明のため、レトロウイルス遺伝子発現系を用いた、myeloid transformation assay

を行い、詳細な機能解析を行った。

## 方 法

### 1. レトロウイルス発現コンストラクトの作成

*MLL*, human AF4 (hAF4) 及び murine Af4 (mAf4) 蛋白のドメイン構造を Fig. 1 に示す。本実験系において、*MLL-AF4* 融合蛋白の白血病発症機序の解析のため、Fig. 1 に示すとおり、11 種類の *MLL-AF4/mAf4* コンストラクトを作成した。*hAF4* (アミノ酸 (a.a.) 347-1211) 及び *mAf4* (a.a. 347-1217) については Pfu DNA polymerase (Stratagene) を用いて PCR 法にて増幅し、Quick ligase (New England Bio Lab) を用いて *MLL* (a.a.1-1400) との間に融合遺伝子を作成し、pMSCVneo (Clontech) にクローニングした。同様に C-terminal homology domain (CHD) のみを含む *hAF4* CHD (a.a.952-1211) と *mAf4* CHD (a.a.956-1217) もそれぞれ、PCR 法にて増幅し、*MLL* との間に融合遺伝子を作成し、pMSCVneo にクローニングした。*hAF4/mAf4* キメラ遺伝子については、それぞれ Fig. 1 に示す位置において制限酵素及び Quick ligase を用い切断・結合し作成した。さらに、*mAf4* CHD の中央 1/3 の領域 (a.a.1026-1177) のみの断片も PCR 法にて作成した。以上の断片についても *MLL* との間に融合遺伝子を作成し、以下の実験に用いた。

尚、本研究は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(文部科学省、厚生労働省、経済産業省、平成 13 年 3 月 29 日制定、平成 16 年 12 月 28 日全部改正、平成 17 年 6 月 29 日一部改正) を遵守して行われた。

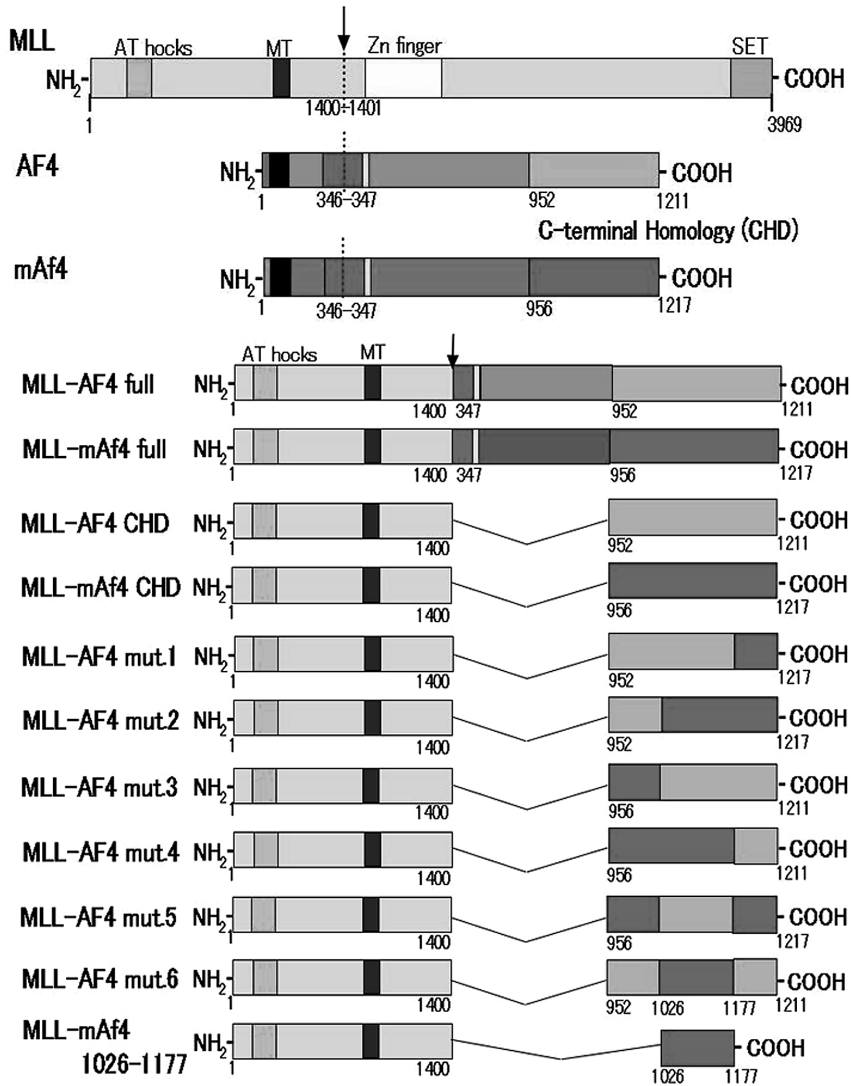


Fig. 1. Schematic representation of MLL-AF4/mAf4 and its mutants used in this study. MT indicates DNA methyltransferase homology domain; SET, SET domain. Black box indicates N-terminal homology domain of AF4/mAf4. Red box indicates transactivation domain of AF4/mAf4. Arrows indicate the fusion site. Numbers refer to amino acid positions in wild-type MLL or AF4.

## 2. マウス造血幹細胞への遺伝子導入と myeloid transformation assay

マウス造血幹細胞への遺伝子導入は Lavau C らの報告<sup>7)</sup>に基づいて行った。4 週齢 C57BL/6 系雄性マウスに対し、5-fluorouracil (5-FU; 150 mg/kg) 投与 5 日後に、骨髓細胞を採取し、Line-

age cell depletion kit (Milteny Biotec) を用いて、Lineage depleted (Lin-) 細胞を得た。レトロウイルス産生は、Platinum-E (Plat-E) 細胞を用い、Kitamura らの報告に基づいて行った<sup>9)</sup>。ウイルスタイターの測定については 3T3 細胞を用い従来の方法に基づき行った<sup>7)</sup>。こうして産

生したレトロウイルス上清を用いて、Lin-細胞にレトロウイルスを感染させ、メチルセルロース培地 (MethoCult M3231, Stem Cell Technology) に murine interleukin (mIL-3, PeproTech Inc), murine interleukin 6 (mIL-6, PeproTech Inc), murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (mGM-CSF, PeproTech Inc) (それぞれ最終濃度 10 ng/mL), murine stem cell factor (mSCF, PeproTech Inc) (最終濃度 50 ng/mL) を加え、G418 (最終濃度 1 mg/mL) 存在下で、7 日間培養した。

尚、本研究は、「実験動物の飼養及び保育等に関する基準」(昭和 55 年 3 月総理府告示第 6 号, 平成 14 年 5 月 28 日一部改正) を遵守して、また、京都府立医科大学実験動物委員会の承認を得て行われた。

### 3. 細胞標本の作製と細胞表面マーカー解析

G418 存在下メチルセルロース培地で 3 回の継代後も安定した増殖が見られた細胞を、不死化が確認できた細胞として、Cytospin 標本を Shandon Single Cytofunnel<sup>®</sup> with White Filter Card (Thermo scientific) を用いて作成し、May-Grunwald-Giemsa 染色し、鏡検した。また、細胞表面マーカーについて、FITC/PE 標識抗マウス Gr-1 抗体、PE 標識抗マウス Mac1 抗体、PE 標識抗 B220 抗体、FITC 標識抗 CD19 抗体、FITC 標識抗 c-kit 抗体、PE 標識抗 CD3 抗体 (BD biosciences) を用いて染色し、Beckmann-Coulter 社製、Epics XL MCL を用いて解析した。

### 4. マウス骨髄移植実験

*MLL-hAF4*, *MLL-hAF4* CHD, *MLL-mAf4*, *MLL-mAf4* CHD 導入 Lin- 骨髄細胞 ( $1 \times 10^5$  個) に骨髄非破壊的放射線照射を施行した、C57BL/6 マウスに移植し、体重減少や脱毛の有無等を観察した。異常の見られたマウスは安楽死させ、血液、骨髄、脾臓を採取し、鏡検及び細胞表面マーカー解析にて異常細胞の有無を検討した。

### 5. RT-PCR 及び Real time 定量 PCR

RNeasy Kit (Qiagen) を用い、total RNA を抽出後、cDNA を合成し、reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)、及び Real-

time RT-PCR を行った。Real-time RT-PCR は過去の報告<sup>10)</sup> に準拠して行った。各遺伝子の発現レベルは、glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) の発現に対する補正值を delta-delta CT method<sup>6)10)11)</sup> により算出し、評価した。(Applied Biosystems) 各実験は独立して 3 度行い、再現性を確認した。使用した primer は Table 1 に示す。

### 6. ウエスタンブロット

Plat-E 細胞から蛋白を抽出し、7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用い、電気泳動を行った。泳動蛋白を PDVF メンブレン (Immobilin-P, Millipore) に転写し、メンブレンを洗浄後、抗 Flag 抗体 (1:1000, Sigma) 及び HRP 結合抗マウス抗体にて発現蛋白を標識し、ECL kit (Amersham) を用いて検出した。

### 7. クロマチン免疫沈降法

*MLL-AF4* mutant を安定して発現する 32D 細胞株を樹立し、その *HoxA9* 遺伝子の promotor の H3K79 dimethylation の有無を検討した。免疫沈降法は Simple ChIP<sup>™</sup> Enzymatic Chromatin IP Kit (Cell Signaling Technology) を用い、付属のマニュアルに準拠して行った。精製クロマチンは、anti-dimethylH3K79 抗体 (Abcam) を用いて、免疫沈降、精製した後、定量 PCR にて検討した。Input DNA に対する percentage enrichment 値は、過去の報告<sup>12)</sup> に準拠して算定した。使用した primer は Table 1 に示す。

## 結 果

### 1. *MLL-mAf4* 融合遺伝子はマウス Lin- 骨髄細胞を不死化し、白血病発症を誘導する

*MLL-hAF4*, *MLL-mAf4*, 及び各種融合遺伝子をマウス骨髄 Lin- 細胞に導入し、不死化能を検討したところ、*MLL-hAF4* 導入細胞はコロニー形成能を維持できなかったが、*MLL-mAf4* 導入細胞は継代が可能であり、不死化能を有する事が明らかとなった。不死化能に関わる *mAf4* のドメインを明らかにする目的で、Fig. 1 に示す変異体を用い、解析を行ったところ、*mAf4* の CHD 領域が必要十分である事が示された (Fig. 2)。*MLL-mAf4* 及び *MLL-mAf4*CHD 導

Table 1. PCR primer sequences used in this study

<b>MLL-hAF4</b>	<b>F</b>	<b>5'- TCCTCAGCACTCTCTCCAATGG</b>
	<b>R</b>	<b>5'-GCTTCATCTTTTTTGCCTCCTC</b>
<b>MLL-mAf4</b>	<b>F</b>	<b>5'-TCCTCAGCACTCTCTCCAATGG</b>
	<b>R</b>	<b>5'- TGTCAGACTTCACCTGTGGCTTC</b>
<b>HoxA7</b>	<b>F</b>	<b>5'-TGGTTCCAGTTTGTGGCAGC</b>
	<b>R</b>	<b>5'-AAGACCTGATTTGATGCTCCAGC</b>
<b>HoxA9</b>	<b>F</b>	<b>5'-TCCACTCGGAAGAAGCGATG</b>
	<b>R</b>	<b>5'-TTTCGGTGAGGTTGAGCAGC</b>
<b>HoxA10</b>	<b>F</b>	<b>5'-TCCTGAATGGGCTGGGTTG</b>
	<b>R</b>	<b>5'-ACAATGGGACCTAAGGCTTCCG</b>
<b>Meis1</b>	<b>F</b>	<b>5'-GGGATAACAGCAGTGAGCAAGG</b>
	<b>R</b>	<b>5'-TGCCACGCTTTTTGTGACGC</b>
<b>GAPDH</b>	<b>F</b>	<b>5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC</b>
	<b>R</b>	<b>5'-GAAGATGGTGATGGGATTC</b>
<b>HoxA9 promoter region</b>	<b>F</b>	<b>5'- GGTCGGTAGCCCATTTAGGTG</b>
	<b>R</b>	<b>5'- GGGTCCCGCGTGTGAGCA</b>

**MLL-hAF4 : MLL-human AF4**

**MLL-mAf4 : MLL-murine Af4**

**F : forward R : reverse**

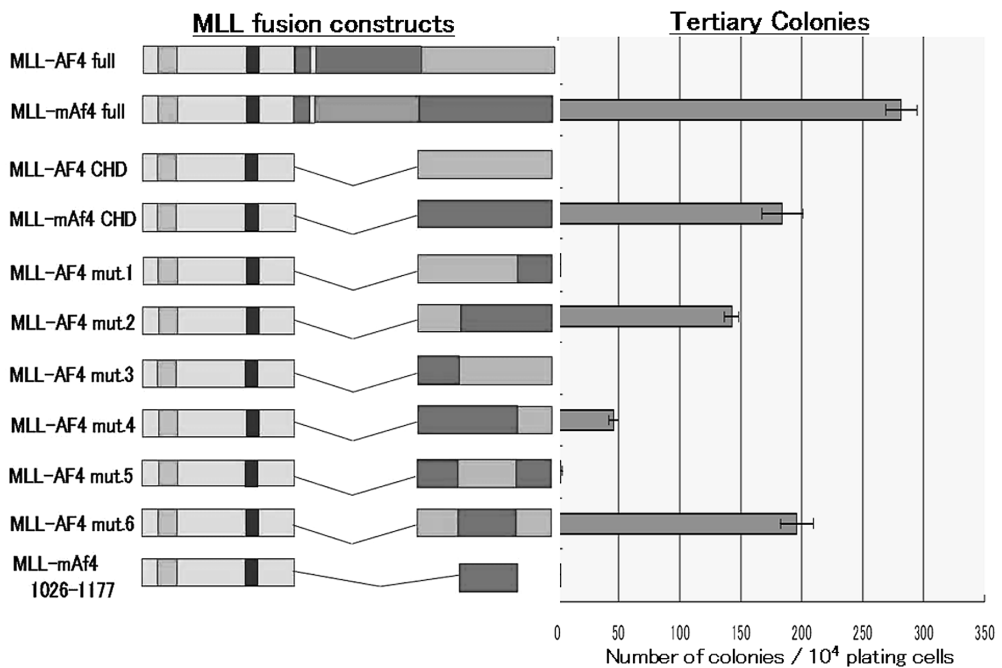


Fig. 2. Determination of the sequences of mAf4 essential to the immortalization of hematopoietic progenitor cells by MLL-mAf4 in a myeloid transformation assay. The bars in the right column represent the number of tertiary colonies generated by the respective mutants depicted in the left column.

入細胞の骨髄移植実験では何れも 120~180 日の潜伏期を経て、レシピエントマウスに体重減少、肝脾腫が出現した。マウスの骨髄、末梢血中には芽球の増加が見られ (Fig. 3A), 表面マーカー解析では Gr-1, Mac1 陽性, CD19, B220 陰性であり (Fig. 3B), 骨髄性白血病を発症したものと考えられた。尚, *MLL-hAF4* 及び, *MLL-hAF4CHD* 導入細胞の骨髄移植実験では白血病発症は認めなかった (未発表データ)。

## 2. *mAf4* 1026-1177 は *MLL-mAf4* 融合蛋白の不死化能に不可欠である

*MLL-hAF4* と *MLL-mAf4* との間に白血病誘導効果に差を認めたことから, *hAF4/mAf4CHD* 領域の差を検討する目的で以下の実験を行った。即ち, Fig. 1 に示すとおり, 両者の融合遺伝子 (mutant 1-6) を作成し, pMSCVneo により発現させ, myeloid transformation assay を行った。融合蛋白の発現については, ウェスタンブロットにより確認した (Fig. 4)。すると, Fig. 2 に示す通り, *MLL-hAF4/mAf4* mut2, 4, 6 導入細胞では 3 代継代後もコロニー形成が見られた (*MLL-hAF4/mAf4* mut2, 4, 6 のカラム) が, *MLL-hAF4/mAf4* mut1, 3, 5 導入細胞にはコロニー形成能が見られなかった (*MLL-hAF4/mAf4* mut1, 3, 5 のカラム)。以上の結果から, *MLL-mAf4* CHD の不死化能については, *mAf4CHD* の中でも, *mAf4* (a.a.1026-1177) の領域 (*mAf4*

1026-1177) が不可欠である事が明らかとなった。しかしながら, 本領域単独では不死化能は見られなかった (Fig. 2, *MLL-mAf4* 1026-1177 のカラム)。 *MLL-mAf4* 及び *MLL-hAF4/mAf4* mut6 導入細胞はいずれも, 比較的大型の細胞で, 核は分葉し, 一部細胞質に顆粒を認めた (Fig. 5 A, C)。また, 表面マーカー解析の結果では *MLL-mAf4* 導入細胞では, Mac1 弱陽性, CD19, B220 陰性であったが, *MLL-hAF4/mAf4* mut6 導入細胞では Mac-1 の発現の低下が見られた。 (Fig. 5 B, D)

## 3. *MLL-mAf4* は *HoxA* 群遺伝子発現を誘導し, *mAf4* 1026-1177 が不可欠である

*MLL-hAF4*, *MLL-mAf4*, *MLL-hAF4* CHD, *MLL-mAf4* CHD, *MLL-hAF4/mAf4* mut1-6, *MLL-hAF4/mAf4* 1026-1177 について, *HoxA* 群遺伝子の発現誘導の差異を検討し, その発現誘導に必要な領域を明らかにする目的で, 以下の実験を行った。即ち, 上記融合遺伝子をマウス Lin-骨髄細胞に導入し, G418 存在下で 5~7 日培養後に出現したコロニーから分離された細胞の *HoxA7*, *A9*, *A10*, *Meis1* の発現について定量 RT-PCR を用い検討した。すると, Fig. 6 に示す通り, *HoxA9*, *A10*, *Meis1* については, *MLL-mAf4*, *MLL-mAf4* CHD, *MLL-hAF4/mAf4* mut 2, 4, 6 導入細胞において, 著明な発現増加が見られた (*MLL-mAf4*, *MLL-mAf4* CHD, *MLL-*

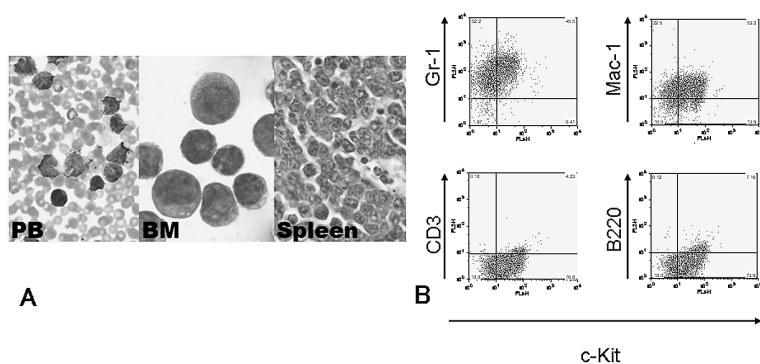


Fig. 3. (A) Morphology of the neoplastic cells in *MLL-mAf4* leukemic mice. May-Giemsa staining of PB, BM, spleen cytospin preparation.

(B) Immunophenotype of the leukemic BM of *MLL-mAf4* mice. The dot plots represent the c-Kit versus Gr-1 or Mac-1 or CD3 or B220.

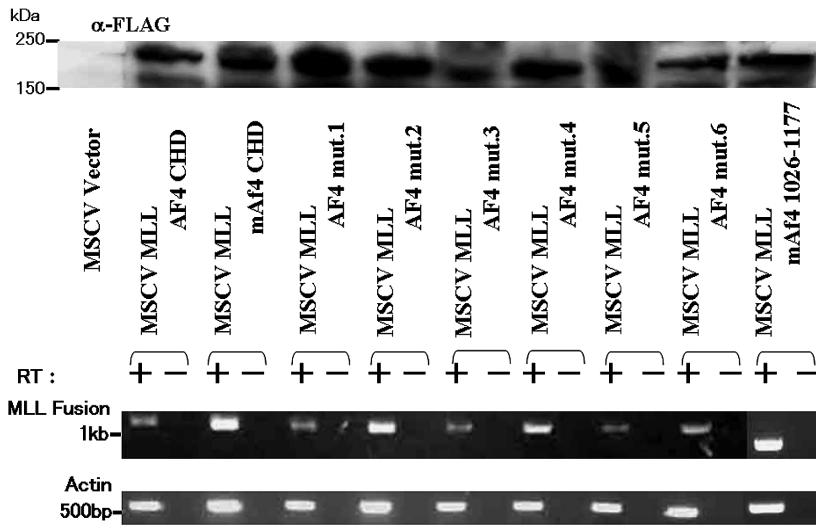


Fig. 4. Western blot and RT-PCR analysis of the expression of the various constructs. The upper panel shows expression of the various MLL fusion protein constructs in transiently transfected packaging cells. The lower panels show RT-PCR expression analysis in the transduced myeloid clonogenic cells harvested from primary methylcellulose cultures. Amplification from reverse transcribed cDNA is indicated by a plus symbol (+). To exclude amplification of integrated retroviral genomic DNA, a no-RT control is indicated by a minus symbol (-)

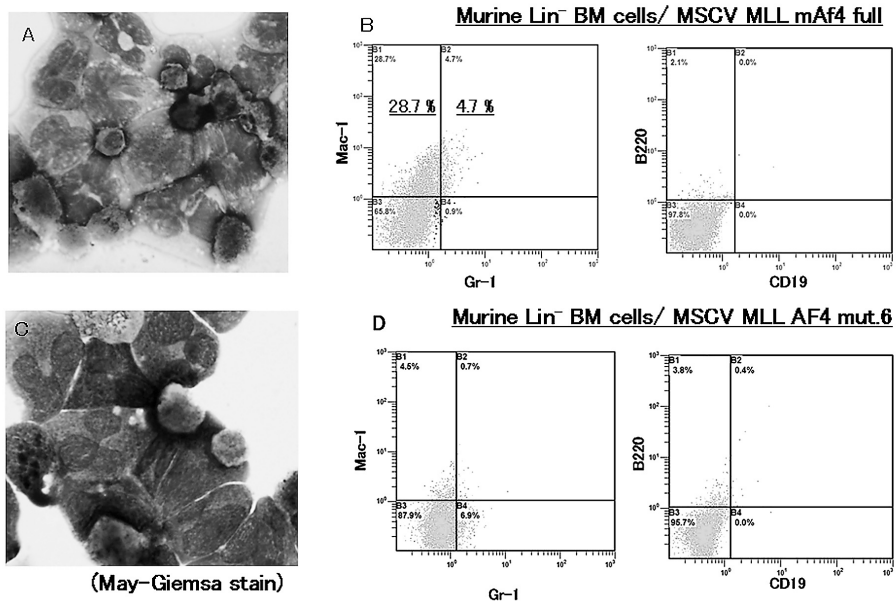


Fig. 5. Characterization of bone marrow progenitor cells transformed by MLL-mAf4 and its mutant. (A) Morphology of the murine Lin-BM cells transformed by MLL-mAf4. (B) Immunophenotype of the murine Lin-BM cells transformed by MLL-mAf4. Percentage values correspond to the content of the adjacent quadrants. (C) Morphology of the murine Lin-BM cells transformed by MLL-AF4 mut.6. (D) Immunophenotype of the murine Lin-BM cells transformed by MLL-AF4 mut.6.

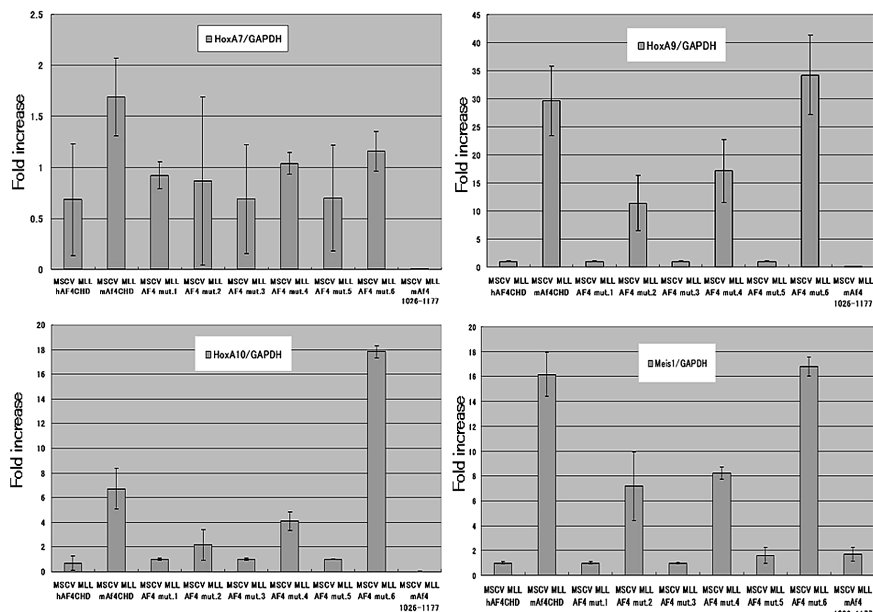


Fig. 6. *HoxA* gene expression levels/GAPDH of the murine Lin<sup>-</sup> BM cells expressing various *MLL-AF4* mutants. The horizontal axis represents the each construct, and the vertical axis the *HoxA* gene expression levels.

*AF4/mAf4* mut 2, 4, 6 のカラム) が, その他の導入細胞では発現増加が見られなかった。つまり, *mAf4* CHD 1026-1177 を *hAF4* に置換すると, 発現誘導が抑制された。 *HoxA7* については *HoxA9*, *A10*, *Meis1* に見られた発現誘導は明らかではなかった。

#### 4. *MLL-mAf4* は *HoxA9* のプロモーター領域のヒストン H3 リジン 79 (H3K79) dimethylation を誘導する

*MLL-mAf4* の *HoxA* 群遺伝子の発現誘導機序を明らかにする目的で, *HoxA9* 遺伝子のプロモーター領域の H3K79 dimethylation の有無を免疫沈降法を用いて検討した。即ち, *MLL-hAF4* CHD, *MLL-mAf4* CHD, *MLL-hAF4/mAf4* mut1-6 を安定して発現する 32D 細胞株を樹立し, 各細胞株からクロマチンを調整し, 解析したところ, Fig. 7 に示すとおり, *MLL-mAf4* CHD, *MLL-hAF4/mAf4* mut2, 4, 6 発現 32D 細胞株においてのみ, 十分な, H3K79 dimethylation が明らか (*MLL-mAf4* CHD, *MLL-hAF4/mAf4* mut2, 4, 6 のカラム) となった。一方 *MLL-hAF4*, *MLL-*

*hAF4/mAf4* mut1, 3, 5 発現細胞株においては, H3K79 dimethylation は低レベルであった。 *HoxA9* プロモーター領域の H3K79 dimethylation の程度は, *HoxA9* の発現量とよく相関していた (Fig. 6, 7)。また, 本結果からも *mAf4* 1026-1177 が *HoxA9* プロモーターの H3K79 dimethylation に不可欠である事が示された。

#### 5. *mAf4* 1026-1177 は *MLL-mAf4* 融合遺伝子の安定した発現に重要である

*mAf4* 1026-1177 の *MLL-mAf4* 融合遺伝子における役割をさらに詳しく調べる目的で, *MLL-hAF4* CHD, *MLL-mAf4* CHD, *MLL-hAF4/mAf4* mut1-6 を導入したマウス Lin<sup>-</sup> 骨髄細胞を G418 存在下で 7~10 日培養後, 融合遺伝子の発現量を定量 RT-PCR で解析した。すると, Fig. 8 に示す通り, *MLL-mAf4* CHD, mut 2, 4, 6 導入細胞では十分な融合遺伝子の発現が確認された (*MLL-mAf4* CHD, mut2, 4, 6 のカラム) が, *MLL-hAF4* CHD, mut1, 3, 5 においては上記 4 つの融合遺伝子と比較して発現量の著しい低下が見られた。 *MLL-mAf4* 1026-1177 融合遺伝子の発現量



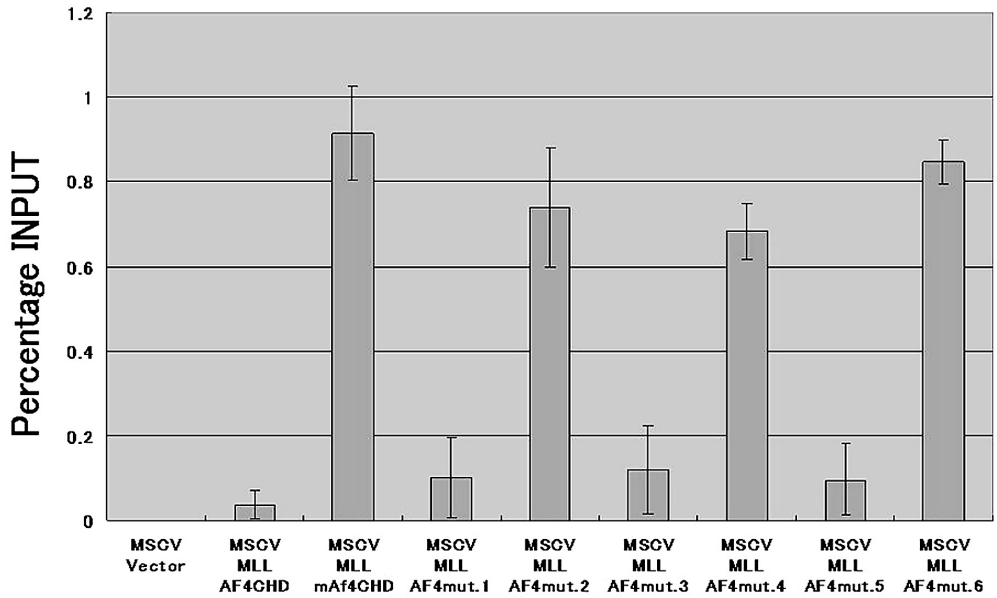


Fig. 7. ChIP assays ; Quantification of H3K79 dimethylation at *Hoxa9* promoters performed in the 32 D cells expressing various *MLL-AF4* mutants. The horizontal axis represents the each construct, and the vertical axis the Quantification of H3K79 dimethylation at *Hoxa9* promoters.

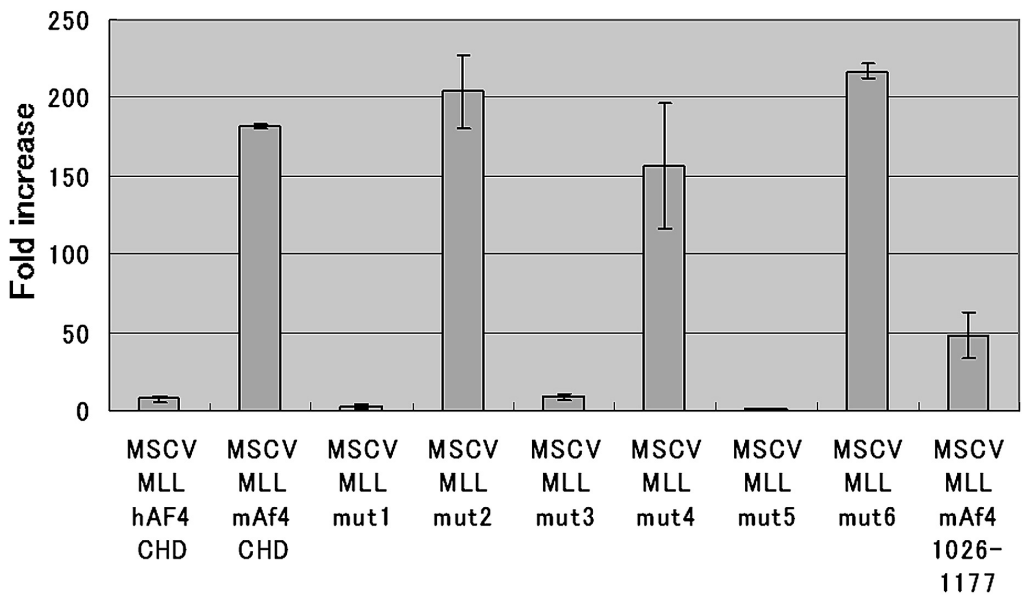


Fig. 8. Relative expression levels/GAPDH of the fusion transcript in murine Lin- BM cells transduced by various *MLL-AF4* mutants. The horizontal axis represents the each construct, and the vertical axis the relative expression levels.

も同様の手法で定量したところ、十分な発現が認められた (*MLL-mAf4* 1026-1177 のカラム)。以上より、*mAf4* 1026-1177 は導入細胞における融合遺伝子の安定した発現に不可欠であると考えられた。

## 考 察

*MLL* 融合遺伝子の白血病発症機序の解析は Lavau C らが、レトロウイルス遺伝子発現系を用いて、*MLL-ENL* の myeloid transformation assay および骨髄移植実験を行った報告が最初である<sup>7)</sup>。その後、*MLL-ELL* 等の *MLL* 融合遺伝子が、マウス Lin- 骨髄細胞を不死化する事が証明され、*MLL* 融合遺伝子が強力ながん遺伝子である事が明らかとなった<sup>8)13)</sup>。一方、Fusion partner が各々の *MLL* 融合遺伝子の白血病発症に深く関わる事は想像されていたが、その機序は長らく不明であった。Soらは、これら fusion partner が *AF4*, *AF9* 等核内蛋白をコードするものと、*AF1q*, *AF6*, 等のように細胞質内蛋白をコードするものに大別される事を報告し、*MLL* 融合蛋白の白血病発症機序に異なった2種類が存在する可能性を示した<sup>13)14)</sup>。核内蛋白をコードする fusion partner については、近年、*MLL* 融合遺伝子の fusion partner である *AF4*, *AF5q31*, *ENL*, *AF9*, *AF10* が巨大な蛋白複合体を形成し、H3K79 dimethylation 活性をもつ Dot1L をリクルートし、クロマチンリモデリングを制御し、RNA の転写伸長反応に大きく関わる事が示された<sup>15-18)</sup>。その後、*MLL-AF10*, *MLL-ENL* 陽性白血病において Dot1L による HoxA9 プロモーター領域の H3K79 dimethylation による発現誘導が白血病発症に重要である事が示され、その白血病発症機序の一端が解明された<sup>19)20)</sup>。一方、*MLL-hAF4* のレトロウイルス遺伝子発現システムによる白血病発症モデルについては、現在まで成功例の報告は無い。過去の報告において、*MLL-hAF4* の高発現はアポトーシスに対する抵抗性は誘導するが、細胞周期停止を招く事が知られており、白血病発症にはつながらず、その白血病発症機序は長らく不明であった<sup>21)</sup>。本研究で我々は、*MLL-hAF4* 及び *MLL-*

*mAf4* のレトロウイルス遺伝子発現系による myeloid transformation 及び骨髄移植実験の系を用い、(1) *MLL-hAF4* はマウスの Lin- 骨髄細胞を不死化する事はできないが、*MLL-mAf4* には不死化能が認められる事、(2) *MLL-mAf4* の不死化能には *mAf4CHD* が必要十分である事、(3) *MLL-mAf4* は標的遺伝子のプロモーター領域の H3K79 dimethylation を介して、HoxA 群遺伝子 (*HoxA9*, *A10*, *Meis1*) の発現を強く誘導する事、(4) *hAF4*1026-1177 を *mAf4* 1026-1177 に置換すると、*MLL-hAF4* は不死化能を獲得する事、(5) *mAf4* 1026-1177 はマウス Lin- 骨髄細胞内での *MLL-mAf4* 融合遺伝子の安定した発現に不可欠である事、を明らかにした。本研究からは *MLL-hAF4* は、少なくとも本実験系においてはマウス Lin- 骨髄細胞内では安定した遺伝子発現が得られず、結果的に十分な *HoxA* 群遺伝子のプロモーター領域の H3K79 dimethylation が得られず、その発現誘導が見られないため、不死化能を示さない、と考えられた。近年、がん遺伝子の発現量が白血病発症には重要である事が報告されている。例えば、*PML/RAR $\alpha$*  や *TEL-AML1* においては、その融合遺伝子の発現量が適切に制御された場合のみ、白血病発症を誘導する事が示されており<sup>22)23)</sup>、*MLL-hAF4* についても融合遺伝子発現レベルが適切に制御される必要がある可能性が考えられるが、本遺伝子発現系では、十分な発現を得る事が出来なかった。本研究では *mAf4* 1026-1177 が本融合遺伝子の安定した発現に不可欠である事が示されたが、この領域の *hAF4* との相同性については、アミノ酸配列において、この領域の前半 (1026-1109) にやや偏るかたちで約 16% の相違がある (Fig. 9)。このアミノ酸配列の差が融合遺伝子の発現量の差に関わると思われるが、その機序は本研究では明らかではなく、今後の研究課題である。また、*mAf4* 1026-1177 と *MLL* との間の融合蛋白 (*MLL-mAf4* 1026-1177) には、融合遺伝子の安定した発現は見られるが、不死化能が見られない事から、本領域は *MLL-mAf4* の不死化能にとって必要ではあるが、十分な領域ではないと考えら

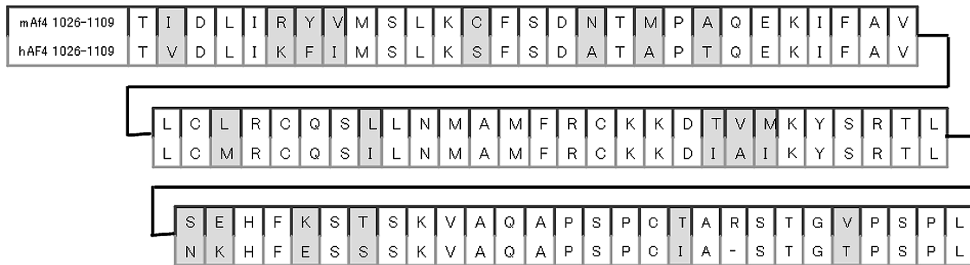


Fig. 9. Alignment of amino acids 1026-1109 of mAf4 and hAF4. The mAf4 and hAF4 exhibit extensive homology in amino acids 1026 to 1177, although there is relatively low degree of sequence homology between murine and human AF4 genes; amino acids 1026-1109.

Identical amino acid is indicated by white box, and amino acid dissimilarity is indicated by gray box.

れ、あくまで mAf4CHD が必要十分な領域であった。HoxA 群遺伝子の発現誘導の機序に関して HoxA9 については、プロモーター領域の H3K79 dimethylation が重要である事が示されたが、HoxA10、Meis1 については本研究ではプロモーター領域のクロマチン免疫沈降は行っておらず、H3K79 dimethylation の有無は不明である。Popovic R ら、および Dorrance AM らは、MLL が Hox 遺伝子の制御因子で HoxA9、HoxA10 の発現を誘導すること<sup>24)25)</sup>、また、Thomas M らは、siRNA により MLL-AF4 を抑制すると HoxA9、Meis1 の発現が抑制されることを報告した<sup>26)</sup> が、HoxA10 や Meis1 のプロモーター領域の H3K79 dimethylation の解析を行った報告は我々の調べ得た限り見られず、その発現誘導の機序が HoxA9 と同様であるか否かは今後明らかにされるべきと思われた。

本研究結果からも、MLL-mAf4 が mAf4 を介して AF9 や ENL といった蛋白と蛋白複合体を形成し、Dot1L による H3K79 dimethylation を引き起こしている事が示唆されるが、mAf4 CHD がこの蛋白複合体の形成にどのように関わっているか明らかではない。我々は mAf4 CHD は mAf5q31 CHD と結合することを、免疫沈降法で明らかにしており(未発表データ)、本領域が Dot1L のリクルートに重要な役割を果たす可能性が示唆され、今後解析をすすめる予定である。最後に、我々のモデルでは表面マーカー解析の結果から、MLL-mAf4 は AML の発症を誘

導した。ヒトの MLL-AF4 陽性白血病はその多くが ALL であり、表現型に差が見られる。我々の系では、IL-3/IL-6/SCF/GM-CSF といった骨髄系細胞の培養条件に合わせた成長因子の組み合わせを用いており、表現型に影響した可能性もある。一方、2010年に Brusén A らは、我々と同様のレトロウイルス遺伝子伝達システムを用い、MLL-AF4 及び AF4-MLL をマウス Lin-/Scal+ 細胞において発現させ、マウスに移植すると、AF4-MLL 単独、及び MLL-AF4/AF4-MLL の共発現細胞移植群においてのみ、pro-B ALL および B/T biphenotypic leukemia が発症する事を明らかにし、AF4-MLL 融合遺伝子の白血病発症における役割について報告した<sup>27)</sup>。新しい可能性を示唆する興味深い報告であるが、MLL-AF4 陽性白血病において、AF4-MLL の発現が見られない例も存在するため、AF4-MLL が白血病発症にどのように関わるのかは、今後さらに詳細に検討されるべき問題と考えられる。

レトロウイルス遺伝子伝達系以外のマウスモデルについては、2008年に Krivtsov らが MLL-AF4 の conditional knock-in マウスモデルを作成し、このモデルマウスが B 前駆型 ALL 及び急性骨髄性白血病 (AML) を発症する事を明らかにした。彼らは、MLL-AF4 陽性白血病細胞の HoxA 群遺伝子のプロモーター領域を含む、DNA の広範な領域にわたって H3K79 dimethylation が見られる事を明らかにし、shRNA により Dot1L の発現を抑制すると、H3K79 dimethylation が解

除される事を明らかにした<sup>28)</sup>。以上の結果から、*HoxA* 群遺伝子を中心とした、MLLにより転写制御を受ける遺伝子群のDot1Lによるepigeneticな変化がMLL-AF4融合遺伝子の白血病発症機序の中心をなすものである事が明らかとなった。今回我々が作成したMLL-*mAf4*のレトロウイルス遺伝子伝達系によるマウスモデルにおいてもHoxA9プロモーターのH3K79 dimethylationおよび*HoxA*群遺伝子の発現誘導が確認され、本マウスモデルは、Krivtsovらのノックインマウスと同様にヒトのMLL-AF4陽性白血病の分子病態をよく再現しており、MLL-AF4陽性白血病の解析に非常に有用であると考えられる。

ノックインモデルに比してレトロウイルス遺伝子伝達系を用いた遺伝子の機能解析の利点は、(1) 対象とする遺伝子の操作が容易であるため、遺伝子のきめ細かな機能解析が可能である点、(2) 導入細胞の樹立が容易で、樹立まで

の期間も短期間であり、結果を早期に得やすい、といった事があげられる。本研究においてもmAf4 1026-1177が安定した遺伝子発現に不可欠な領域である事を証明し得たが、今後、MLL-AF4融合遺伝子の機能解析をさらに進め、標的治療を可能にするよう研究を進めていく必要がある。

## 謝 辞

細胞表面マーカー解析にあたり御指導賜りました、京都府立医科大学 感染制御・検査医学講師 同 附属病院臨床検査部副部長 同 輸血・細胞医療部副部長 稲葉亨先生に深謝致します。また、レトロウイルス遺伝子発現系において使用したパッケージング細胞; PLAT-E細胞を分与頂きました、東京大学医科学研究所 北村俊雄先生に深謝致します。

本研究は文部科学省科学研究費及び厚生労働省科学研究補助費の助成を受けて行われた。

## 文 献

- 1) Pui CH, Campana D, Pei D, Bowman WP, Sandlund JT, Kaste SC, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Raimondi SC, Onciu M, Coustan-Smith E, Kun LE, Jeha S, Cheng C, Howard SC, Simmons V, Bayles A, Metzger ML, Boyett JM, Leung W, Handgretinger R, Downing JR, Evans WE, Relling MV. Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia without prophylactic cranial irradiation. *N Engl J Med* 2009; 360: 2730-2741.
- 2) Pui CH, Gaynon PS, Boyett JM, Chessells JM, Baruchel A, Kamps W, Silverman LB, Biondi A, Harms DO, Vilmer E, Schrappe M, Camitta B. Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. *Lancet* 2002; 359: 1909-1915.
- 3) Tomizawa D, Koh K, Sato T, Kinukawa N, Morimoto A, Isoyama K, Kosaka Y, Oda T, Oda M, Hayashi Y, Eguchi M, Horibe K, Nakahata T, Mizutani S, Ishii E. Outcome of risk-based therapy for infant acute lymphoblastic leukemia with or without an MLL gene rearrangement, with emphasis on late effects: a final report of two consecutive studies, MLL 96 and MLL 98, of the Japan infant leukemia study group. *Leukemia* 2007; 21: 2258-2263.
- 4) Ziemann-van der Poel S, McCabe NR, Gill HJ, Espinosa R 3rd, Patel Y, Harden A, Rubinelli P, Smith SD, LeBeau MM, Rowley JD. Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 10735-10739.
- 5) Yu BD, Hess JL, Horning SE, Brown GA, Korsmeyer SJ. Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice. *Nature* 1995; 378: 505-508.
- 6) Ernst P, Mabon M, Davidson AJ, Zon LI, Korsmeyer SJ. An Mll-dependent Hox program drives hematopoietic progenitor expansion. *Current Biology* 2004; 14: 2063-2069.
- 7) Lavau C, Szilvassy S, Slany R, Cleary ML. Immortalization and leukemic transformation of a myelomonocytic precursor by retrovirally transduced HRX-ENL. *EMBO J* 1997; 16: 4226-4237.
- 8) Lavau C, Luo RT, Du C, Thirman MJ. Retrovirus-mediated gene transfer of MLL-ELL transforms primary myeloid progenitors and causes acute myeloid leukemias in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 10984-10989.

- 9) Morita S, Kojima T, Kitamura T. Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* 2000; 7: 1063-1066.
- 10) S A Bustin. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000; 25: 169-193.
- 11) Yin JL, Shackel NA, Zekry A, McGuinness PH, Richards C, Putten KV, McCaughan GW, Eris JM, Bishop GA. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. *Immunol Cell Biol* 2001; 79: 213-221.
- 12) Frank SR, Schroeder M, Fernandez P, Taubert S, Amati B. Binding of c-Myc to chromatin mediates mitogen-induced acetylation of histone H4 and gene activation. *Genes Dev* 2001; 15: 2069-2082.
- 13) So CW, Lin M, Ayton PM, Chen EH, Cleary ML. Dimerization contributes to oncogenic activation of MLL chimeras in acute leukemias. *Cancer cell* 2003; 4: 99-110.
- 14) So CW, Cleary ML. Dimerization: a versatile switch for oncogenesis. *Blood* 2004; 104: 919-922.
- 15) Erfurth F, Hemenway CS, de Erkenez AC, Domer PH. MLL fusion partner AF4 and AF9 interact at subnuclear foci. *Leukemia* 2004; 18: 92-102.
- 16) Zeisig DT, Bittner CB, Zeisig BB, García-Cuellar MP, Hess JL, Slany RK. The eleven-nineteen-leukemia protein ENL connects nuclear MLL fusion partners with chromatin. *Oncogene* 2005; 24: 5525-5532.
- 17) Zhang W, Xia X, Reisenauer MR, Hemenway CS, Kone BC. Dot1a-AF9 complex mediates histone H3 Lys-79 hypermethylation and repression of ENaC $\alpha$  in an aldosterone-sensitive manner. *J. Biol. Chem* 2006; 281: 18059-18068.
- 18) Bitoun E, Oliver PL, Davies KE. The mixed-lineage leukemia fusion partner AF4 stimulates RNA polymerase II transcriptional elongation and mediates coordinated chromatin remodeling. *Hum Mol Genet* 2007; 16: 92-106.
- 19) Okada Y, Feng Q, Lin Y, Jiang Q, Li Y, Coffield VM, Su L, Xu G, Zhang Y. hDot1L links histone methylation to leukemogenesis. *Cell* 2005; 121: 167-178.
- 20) Mueller D, Bach C, Zeisig D, Garcia-Cuellar MP, Monroe S, Sreekumar A, Zhou R, Nesvizhskii A, Chinnaiyan A, Hess JL, Slany RK. A role for the MLL fusion partner ENL in transcriptional elongation and chromatin modification. *Blood* 2007; 110: 4445-4454.
- 21) Caslin C, Serna A, Rossi V, Introna M, Biondi A. Modulation of cell cycle by graded expression of MLLAF4 fusion oncoprotein. *Leukemia* 2004; 18: 1064-1071.
- 22) Ren R. Modeling the dosage effect of oncogenes in leukemogenesis. *Curr Opin Hematol* 2004; 11: 25-34.
- 23) Chen W, Kumar AR, Hudson WA, Li Q, Wu B, Staggs RA, Lund EA, Sam TN, Kersey JH. Malignant transformation initiated by Mll-AF9: gene dosage and critical target cells. *Cancer cell* 2008; 13: 432-440.
- 24) Popovic R, Riesbeck LE, Velu CS, Chaubey A, Zhang J, Achille NJ, Erfurth FE, Eaton K, Lu J, Grimes HL, Chen J, Rowley JD, Zeleznik-Le NJ. Regulation of mir-196b by MLL and its overexpression by MLL fusions contributes to immortalization. *Blood* 2009; 113: 3314-3322.
- 25) Dorrance AM, Liu S, Yuan W, Becknell B, Arnoczky KJ, Guimond M, Strout MP, Feng L, Nakamura T, Yu L, Rush LJ, Weinstein M, Leone G, Wu L, Ferketich A, Whitman SP, Marcucci G, Caligiuri MA. Mll partial tandem duplication induces aberrant Hox expression in vivo via specific epigenetic alterations. *J Clin Invest* 2006; 116: 2707-2716.
- 26) Thomas M, Gessner A, Vornlocher HP, Hadwiger P, Greil J, Heidenreich O. Targeting MLL-AF4 with short interfering RNAs inhibits clonogenicity and engraftment of t (4;11)-positive human leukemic cells. *Blood* 2005; 106: 3559-3566.
- 27) Bursen A, Schwabe K, R?ster B, Henschler R, Ruthardt M, Dingermann T, Marschalek R. The AF4.MLL fusion protein is capable of inducing ALL in mice without requirement of MLL.AF4. *Blood* 2010; 115: 3570-3579.
- 28) Krivtsov, A. V., Feng, Z, Lemieux ME, Faber J, Vempati S, Sinha AU, Xia X, Jesneck J, Bracken AP, Silverman LB, Kutok JL, Kung AL, Armstrong SA. H3K79 methylation profiles define murine and human MLL-AF4 leukemias. *Cancer Cell* 2008; 14: 355-368.