

201109011A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

MLL-AF4白血病の分子標的薬創製を目指した
AF4特異的な分解経路の解明に関する研究

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 横山 明彦

平成24(2012)年 5月

目 次

I. 総括研究報告

MLL-AF4白血病の分子標的薬創製を目指したAF4特異的な分解経路の解明に
関する研究 横山明彦 ----- 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 6

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 7

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

（総括）研究報告書

MLL-AF4白血病の分子標的薬創製を目指したAF4特異的な分解経路の解明に関する研究

研究代表者 横山 明彦 京都大学 准教授

研究報告書

研究要旨： 多くの乳児白血病が現行の治療法でよく治癒する中で、*MLL-AF4* 融合遺伝子を発現する急性リンパ性白血病は生存率が悪く、新規の治療法が求められている。乳児は後の発育不良の可能性を考えると治療法が限られるため、できるだけ副作用の少ない分子標的薬を開発する事が治癒率の向上及び治癒後の QOL の改善に必要である。我々は白血病を起こす *MLL-AF4* タンパク質が多くの細胞で未知の分解経路を介して特異的に分解される事を見いだした。実際に *MLL-AF4* はこの分解経路が活性化されている骨髄系の細胞では白血病を引き起こさない。この事はリンパ性の *MLL-AF4* 白血病細胞中で、何らかの化合物／タンパク質によってこの分解経路を活性化する事ができれば、*MLL-AF4* 白血病を根絶できる事を示唆している。本研究で我々は、この *AF4* 特異的な分解経路の全容を明らかにする事を目指す。我々は平成 23 年度に *AF4* を不安定化する最小ドメイン(*A4DD:AF4 destabilization domain*)を 130 残基程にまで限定した。今後は同定した不安定化ドメインに結合するタンパク質を探索し、それを糸口にして *AF4* 分解経路上の因子を網羅的に同定する事を試みる。我々はこの未知のタンパク質分解経路を明らかにすることで、長期的には人為的にこの分解経路を活性化するような薬剤を創製することを目指す。既に細胞が持っているタンパク質分解経路を利用してがん遺伝子産物を特異的に破壊する事で、副作用が少ない新規治療法を開発できる可能性がある。この *AF4* 分解経路はリンパ系以外の多くの組織で既に活性化されており、薬剤によって人為的に活性化しても他の組織に対する細胞障害性は少ないと予想される。

A. 研究目的

乳児の急性リンパ性白血病の約3分の2がMLLキメラ遺伝子によって引き起こされ、その内80%がAF4を融合パートナーとするMLL-AF4によるものである。この白血病は予後が悪く新規の治療法の開発が切望されている。MLLキメラによる白血病は骨髄性、リンパ性、そして両者の混合型である場合があり、MLL(Mixed Lineage Leukemia)という名前の由来になっている。しかし、MLL-AF4は、なぜかリンパ性の白血病を引き起こすが骨髄性の白血病はほとんど起こさない。我々はAF4ファミリータンパクであるAF5q31とMLLのキメラ(MLL-AF5q31)とMLL-AF4の相違点を調べたところ、「MLL-AF5q31は骨髄性の造血細胞を不死化する活性を持つが、MLL-AF4にはその活性が無い事」や、「MLL-AF4タンパク質は様々な細胞で不安定化されており、未知のメカニズムで分解されてしまう事」を見いだした。これらの知見から「MLL-AF4は骨髄性の細胞ではAF4特異的な分解経路によって分解されてしまうために機能しないが、リンパ性の細胞ではその分解経路が働かないために白血病を引き起こす」と考えられる。もし細胞に元からMLL-AF4を分解する装置があるのならば、その装置をリンパ性白血病細胞において人為的に活性化することでMLL-AF4白血病細胞を根絶することができるかも知れない。このAF4特異的な分解経路はまだ明らかにされておらず、我々はその作用機序を調べる事で新規の分子標的治療法を開発するための分子基盤を見いだしたいと考えている(図1)。

B. 研究方法

我々は難治性の乳児白血病を引き起こすMLL-AF4タンパク質が多く組織・細胞でAF4特異的な分解経路によって分解される事を見いだした。長期的にはこの分解経路を利用した分子標的療法を開発する事を見据え、この分解経路の解明を試みる(図1)。そのために、様々なMLL-AF4の変異体を作成し、そのタンパク質の発現や骨髄前駆細胞を不死化する活性を調べる事で、まずAF4の不安定化に必要な最小ドメインを決定する。次に、この不安定化ドメインに結合するタンパク質を同定する事を試みる。そのために細胞内にAF4不安定化ドメインを一過性に発現させ、不安定化ドメインとその結合因子の複合体をワンステップアフィニティー精製法にて精製し、質量分析を行い、結合因子を同定する。得られた不安定化因子をsh-RNAベクターを用いてノックダウンする事によって、MLL-AF4が安定化され、骨髄前駆細胞を不死化できるようになるかを検証する。さらに、この実験系を応用してAF4の不安定化に働く因子のスクリーニング系を構築し、この経路上の作用因子を網羅的に同定する。以下にその詳細を記す。

1. AF4の不安定化に必要な最小ドメインを決定する

様々なMLL-AF4変異体を作製し、そのタンパク質安定性及びマウス骨髄前駆細胞に対するトランスフォーメーション活性を調べる事で、AF4特異的な不安定化ドメインA4DDを同定する。さら

に新たな変異体を作製して詳細な変異体解析を行う事で、最小不安定化モチーフを同定する。また、リンパ性の細胞株（Ba/F3など）にそれらの変異体遺伝子を導入し、変異体のタンパク質レベルでの発現を調べる。これによってリンパ系の細胞で確かに安定化されるかどうかを調べる。

2.AF4不安定化ドメインに結合するタンパク質を同定する（平成24年度予定）

AF4不安定化ドメインに結合するタンパク質を293T細胞に一過性に発現させ、タグに対する抗体を用いたアフィニティー精製法にてワンステップで複合体を精製する。得られた複合体を質量分析にかけ、AF4不安定化ドメインに特異的に結合するタンパク質を同定する。293T細胞は造血系の細胞ではないが、我々はこの細胞株においてもAF4の分解経路が活性化されている事を示す予備的実験結果を得ている。我々はこれまでにこのワンステップアフィニティー精製法で新規結合タンパク質を多数同定してきており、実行する上で技術的な問題はない。

3.同定したAF4不安定化因子の機能を検証し、その上流の作用因子を探索する（平成24年度予定）

得られた結合因子がAF4を不安定化するかどうかを種々のin vivoアッセイ系を用いて検証する。結合因子に対するsh-RNAによって293T細胞にてMLL-AF4が安定化されるかどうかを調べる。さらに、MLL-AF4とsh-RNAを共発現する事で骨髓前駆細胞の不死化能が回復するかどうかを調べる。これによって得られた結合因子が真にMLL-AF4を不安定化し、不活性化しているかを検証する。この実験を原理証明とし、shRNAライブラリーを用いてAF4不安定化因子の上流で働く因子群を網羅的にスクリーニングする。

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、生命の尊重と苦痛を伴う実験への十分な配慮の基に実施する。遺伝子組み換え実験は、施設内組み換え実験安全委員会の承認を受け、遺伝子組み換え実験安全管理規定に従って行う。本研究では、個人情報取り扱いの配慮を必要とするヒト検体等は用いない。ヒトES細胞は扱わない。

C. 研究結果

我々は、当初の計画通り、平成23年度中にAF4特異的な分解に必要な130残基程の最小ドメイン構造（A4DD）を決定した。今後はさらに詳細にドメインマッピングを行い、不安定化モチーフを同定する。さらに、我々はこのドメインを持つタンパク質がリンパ系の細胞株であるBa/F3細胞では安定して発現する事を見いだした。これらの結果はMLL-AF4がリンパ系では安定で骨髓系では不安定であるという知見を支持する。今後はそのドメインに特異的に結合するタンパク質を同定し、各種in vivoアッセイ系を用いてその生理的な意義を検証する。さらに、この分解経路上で働く因子を網羅的に探索するスクリーニング系を構築することで分解経路の全容を明らかにする。最終的に

はこの不安定化モチーフの点変異体を作製し、不安定性は解消されたがトランスフォーメーション活性を保持する変異体を作製し、不安定化メカニズムの存在をはっきりと示したい。平成23年度の研究目標であったA4DDの同定が達成できた事で、平成24年度にAF4不安定化因子を探索する事が可能になった。今後は計画通り、この不安定化ドメインに結合するタンパク質及びその上流因子を同定する事に取り組む。

D. 考察

今回同定されたA4DD中にAF4が特異的に認識されるモチーフがあると考えられる。今後はそのようなモチーフを同定したい。また、MLL-AF4は骨髄系の細胞では活性を示さないが、リンパ系の細胞では安定に発現される事から、組織特異的な制御を受けていると考えられる。AF4を不安定化する因子を同定し、さらにその上流で働く因子群を探索する事で分解経路に関わる因子群を網羅的に同定できる。そして、それらのAF4不安定化因子群の発現がリンパ系と骨髄系とでどのような発現パターンをとるかを調べる事で組織特異的な制御のメカニズムに迫れるだろう。

E. 結論

平成23年度に得られた結果から、当初の仮説の通り、MLL-AF4は骨髄系では不安定化を受けており、リンパ系では受けていないと結論する。今後はAF4を不安定化する因子を同定し、それがどのように組織特異的な制御を受けているかを解析する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Molecular mechanisms of leukemogenesis in MLL-leukemias Rinsho Ketsueki 2011 52(8) 679-685.

2. 学会発表

平成23年度 第3次対がん10か年総合戦略（平成16年～25年度）・文部科学省 がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動合同公開シンポジウム（招待講演）

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

研究目標: AF4特異的な分解メカニズムを解明し、 リンパ系で分解経路を活性化する分子標的薬を創製する

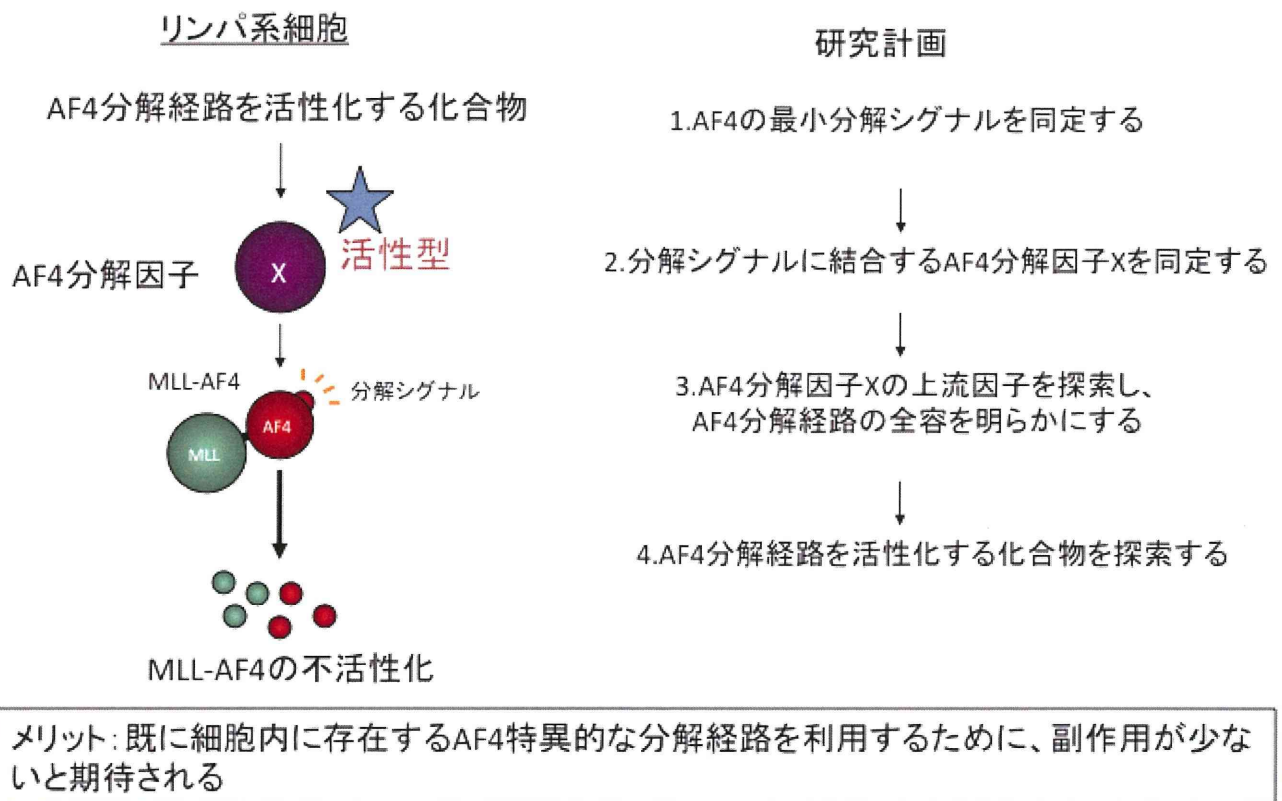


図1 研究計画の概要 長期的にはリンパ系でMLL-AF4を不安定化させ、不活性化させる化合物の同定を目指し、短期的にはAF4の分解経路の解明に取り組む。

別紙 4

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

特になし

雑誌

発表者氏	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yokoyama A	Molecular mechanisms of leukem ogenesis in MLL-leukemias	Rinsho Ketsue ki.	5 2 (8)	679- 685	2011

発表論文別刷1

Molecular mechanisms of leukemogenesis in MLL-leukemias

Akihiko Yokoyama

Rinsho Ketsueki

52(8), p679-685, 2011

MLL 白血病の分子メカニズム

横山明彦

Key words: MLL, AF4, AEP, Leukemia

1. MLL 白血病の概要

MLL 遺伝子上で染色体転座が起こり, MLL と融合パートナーが in-frame で繋がった *MLL fusion* が形成されると白血病を引き起こす (図 1A, 1B)。MLL 遺伝子の染色体転座を持つ白血病 (以下 MLL 白血病) は全急性白血病の 5~10% を占め^{1,2)}, 急性骨髄性白血病 (AML), 急性リンパ性白血病 (ALL), 混合型白血病など様々な表現型を持った白血病を含む。このことから, MLL 遺伝子は Mixed Lineage Leukemia の頭文字をとって名付けられた。MLL の融合パートナーは多岐にわたり, これまでに 60 種類以上あると報告されている^{3,4)}。また, MLL 白血病は比較的若年層に多く, 乳児の ALL において高頻度に起こる遺伝子異常であり, 予後は他の白血病に比べて悪い傾向がある^{1,5)}。

2. MLL は自己複製促進遺伝子の発現を維持する

MLL は 3969 残基のアミノ酸からなる巨大なタンパク質であり, ショウジョウバエの *HOX* 遺伝子制御因子である Trithorax (TRX) と良く似た構造を持つ。MLL や TRX のカルボキシル末端側には SET ドメインがあり, この構造はヒストン H3 の 4 番目のリジン残基をメチル化する活性を持つ⁶⁾。MLL も TRX もこれまでに遺伝子改変技術を使った解析によって, *HOX* 遺伝子の発現を維持するのに必要である事が示されている^{7~10)}。MLL は翻訳後プロセッシングを受け, MLL^N と MLL^C の二つのフラグメントに分断されるが, 両フラグメントは結合してホロコンプレックスを形成し¹¹⁾, さらに menin や WDR5 などの共作用因子と結合して MLL 複合体を形成する¹²⁾ (図 1C)。MLL は造血系の細胞においても *HOX* 遺伝子の発現を維持する働きを持ち, これまでに

HOXA7, *HOXA9*, *HOXA10*, *MEIS1* といった遺伝子の発現が MLL によって維持される事が分かっている^{9, 10)}。これらの遺伝子は造血幹細胞の自己複製を促進する働きを持つ^{13, 14)}。例えば, *HOXA9* を過剰発現させると造血幹細胞のプールサイズが大きくなる事や, *Hoxa9* ノックアウトマウスの造血幹細胞プールは縮小している事が報告されている^{14, 15)}。これらの遺伝子を本稿では「自己複製促進遺伝子」と総称する。この自己複製促進遺伝子は造血幹細胞 (HSC) やその下流の MPP で高発現しているが, CMP, GMP と分化する過程で発現が低下し, 最終分化した細胞では発現していない (図 2A)^{16, 17)}。MLL のノックアウトマウスの造血細胞においては自己複製促進遺伝子の発現が低下すると共に, HSC や MPP のプールサイズが縮小する^{9, 10, 18)}。これらの知見から, MLL は未分化な造血細胞において自己複製促進遺伝子の発現を維持する事で HSC や MPP を増幅させる働きをしていると考えられる。

3. AEP 複合体は MLL 依存性の転写を活性化する

「MLL がどのようなメカニズムで標的遺伝子の転写を活性化するのか」という事は良く分っていない。我々は近年, MLL の融合パートナーの解析から, そのメカニズムの一端を見いだした。MLL の融合パートナーは前述したように 60 種類以上あるが, その発症頻度はパートナーごとに大きく異なる^{3, 4)} (図 1D)。最も高頻度に MLL と融合するのは AF4 であり, そのホモログである AF5q31 や LAF4 も MLL fusion を形成する。この AF4 ファミリーは MLL 白血病症例の約 3 分の 1 で融合パートナーとなっている。次に高頻度に MLL と融合するのは AF9 であり, そのホモログである ENL もまた比較的高頻度に MLL と融合タンパク質を形成する。この二つを含む ENL ファミリーも MLL 白血病の約 3 分の 1 の症例で融合パートナーとなっている。我々は AF4 の複

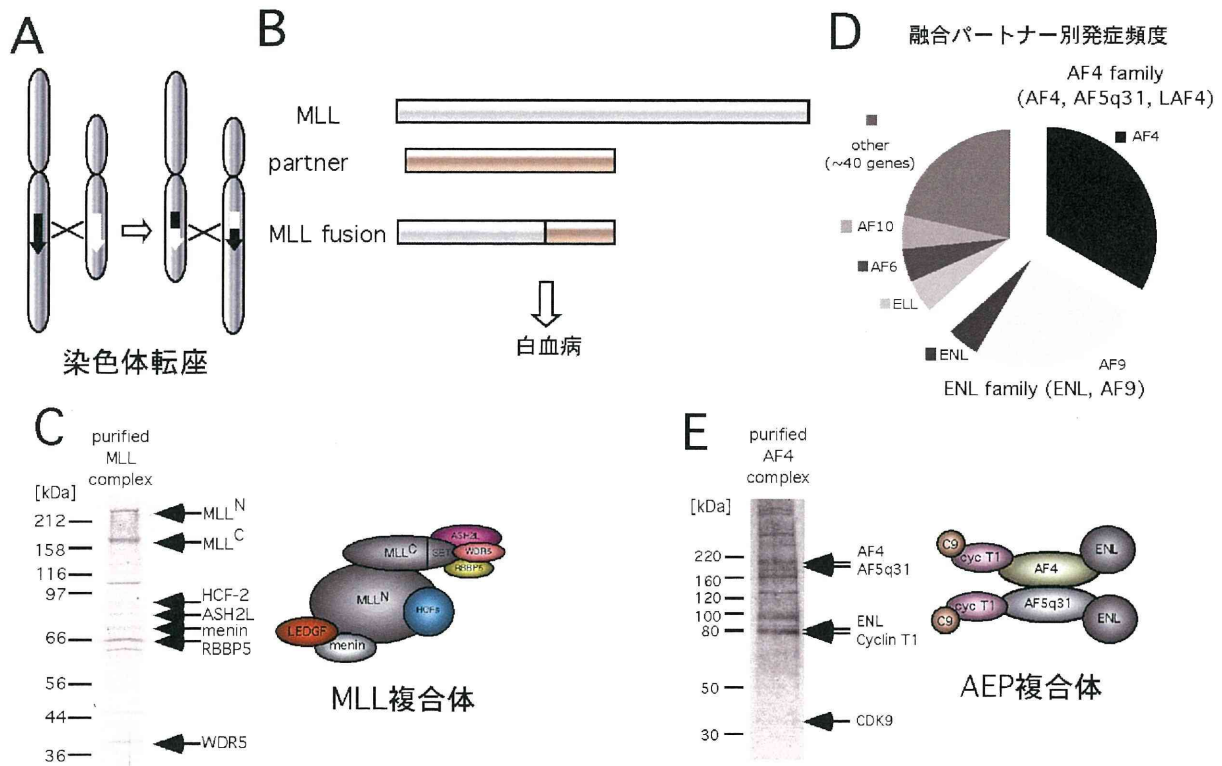


図1 A. 染色体転座による融合遺伝子の形成
B. MLLとpartner遺伝子が融合してMLL fusionを形成する
C. MLLの融合パートナー別発症頻度³⁾
D. MLL複合体¹²⁾精製したMLL複合体をSDS-PAGEによって分離し、CBB染色した。
E. AEP複合体¹⁹⁾精製したAEP複合体をSDS-PAGEによって分離し、銀染色した。

合体を生化学的に分離精製して質量分析を行い¹⁹⁾、AF4がそのホモログであるAF5q31と、ENL、CDK9及びCyclinT1と複合体を形成している事を見いだした(図1E)。即ち、MLL白血病症例の3分の2を占めるAF4ファミリーとENLファミリーが同一複合体に含まれるという事になる。CDK9とCyclinT1は結合してP-TEFbと呼ばれる複合体を形成する事が知られている²⁰⁾。P-TEFbはRNAPolymeraseIIのHeptapeptide repeatのセリン2をリン酸化し、転写伸長を促進する働きを持つ。従ってこのAF4複合体もRNAPolymeraseIIに直接作用して転写を促進する働きがあると予想される。我々はこの複合体をAEP複合体(AF4 family/ENL family/P-TEFb complex)と呼ぶ。

MLL依存性の転写におけるAEP複合体の役割を調べるために、野生型のMLLを発現する細胞株であるU937細胞を用いてクロマチン免疫沈降実験(ChIP)を行ったところ、MLL複合体とAEP複合体がHOXA9やMEIS1などの遺伝子領域で共局在している事が明らかになった(図3A)¹⁹⁾。さらにsh-RNAを用いてAEP複

合体の一因子であるENLをノックダウンしたところ、HOXA9やMEIS1の発現が低下した¹⁹⁾。この結果はMLL複合体とAEP複合体が協調的に作用して転写を活性化しているという事を示唆した(図2B)。一方で、HOXA7の遺伝子領域にはMLL複合体は局在していたが、AEP複合体は局在していなかった(図3A)。またこの領域ではあまりリン酸化型RNAPolymeraseIIの局在も見られないことから、転写が活発に起こっていない事が示唆された。さらに、HOXA7の発現はENLをノックダウンしても変化しなかった。これらの結果はMLL複合体の局在は必ずしもAEP複合体の局在を伴うものではなく、AEP複合体は何らかのシグナルに依存してMLL複合体が局在するクロマチンにリクルートされるという事を示唆している。自己複製促進遺伝子の転写は分化の進んだ細胞においては抑制されている事から、MLL依存性の転写は分化の進行に伴ってONからOFFになると予想される(図2B)。このようにMLL依存性の転写が分化に伴って調節される事により、細胞の自己複製が適度に活性化され、HSCの適切なプールサイズ

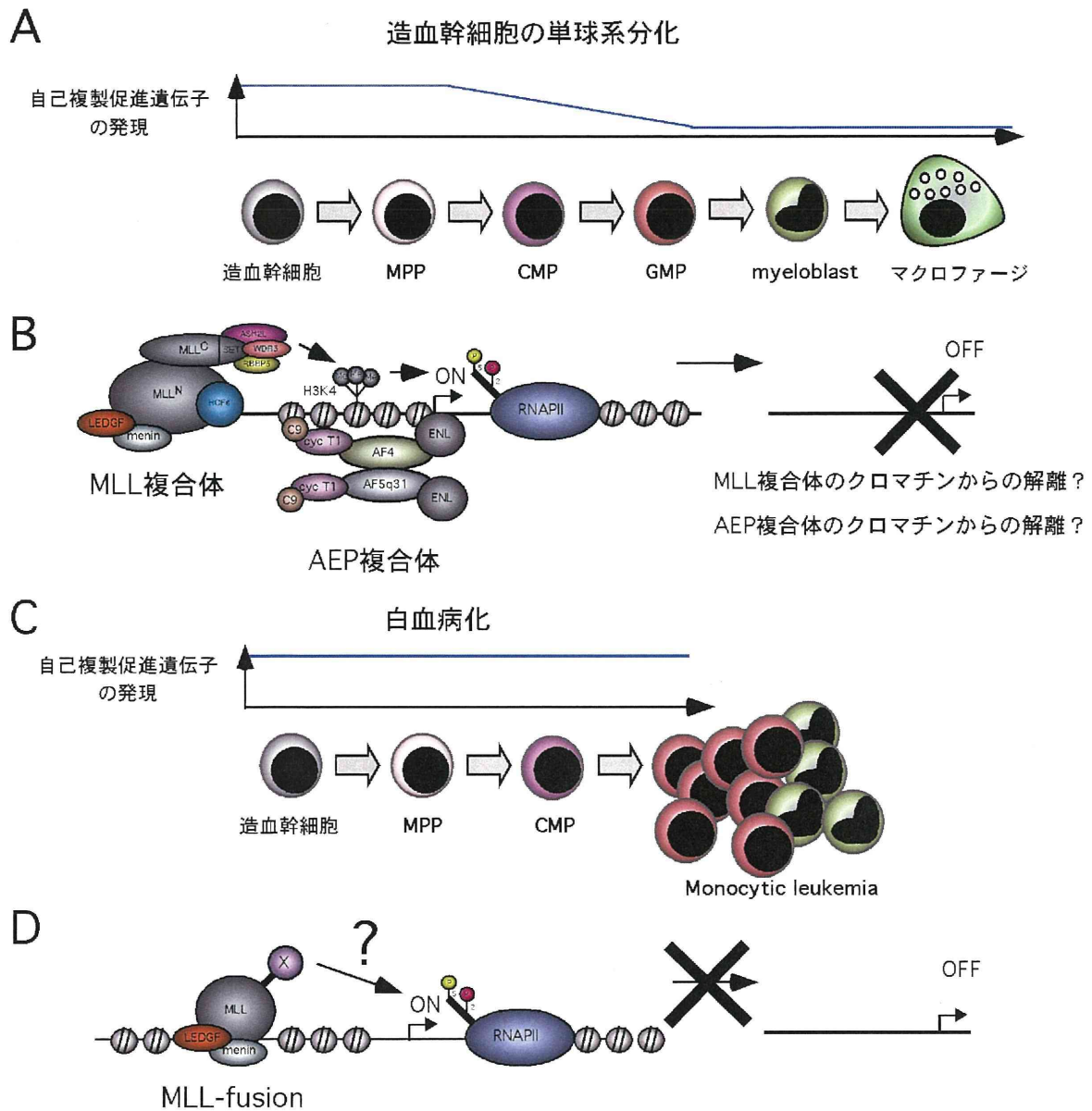


図2 A. 単球分化における自己複製促進遺伝子の発現パターン
 B. MLL 複合体及び AEP 複合体の協調作用による自己複製促進遺伝子の発現とその分化の進行に伴う不活性化モデル
 C. 白血病化における自己複製促進遺伝子の発現パターン
 D. MLL fusion による未知のメカニズムを介した恒常的な転写活性化

が維持されるのであろう。分化の進行に伴ってどのようなメカニズムで転写が OFF になるのかはまだ分かっていないが、何らかのシグナルに呼応して MLL 複合体や AEP 複合体がクロマチンから解離するなどして、MLL 依存性の転写活性が失われるのであろうと予想される(図 2B)。

4. MLL fusion は AEP 複合体を介して自己複製促進遺伝子を恒常的に活性化して造血細胞を不死化する

MLL 白血病患者の芽球において *HOXA9* や *MEIS1* などの自己複製促進遺伝子が高発現している事が、遺伝子発現プロファイリングによって明らかにされている¹⁵⁾。この事から、MLL fusion は、通常であれば分化の進行

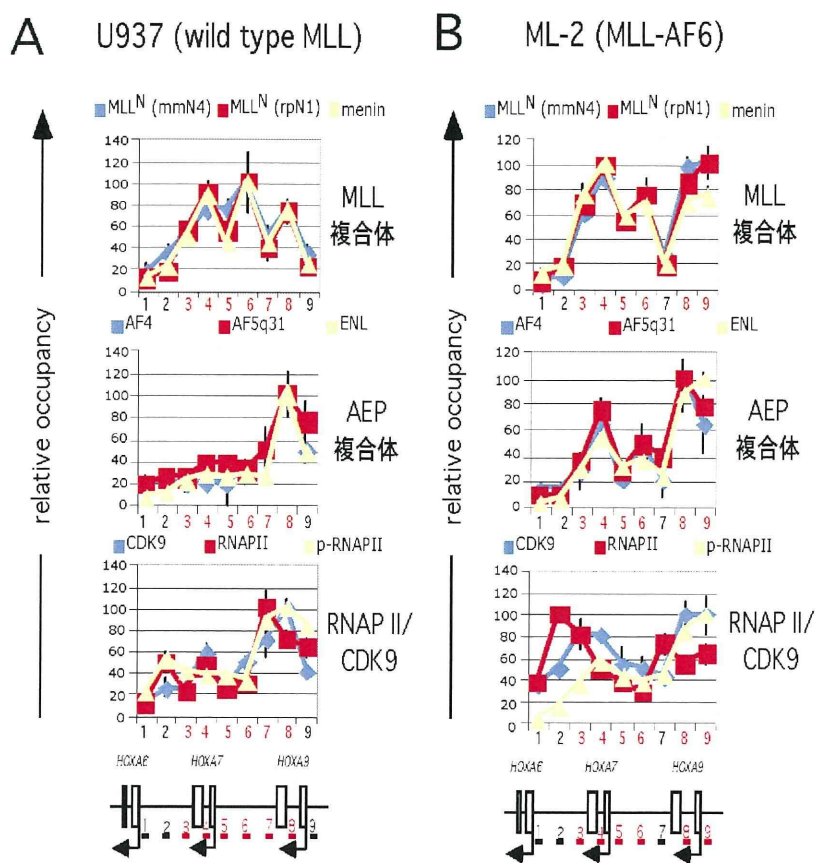


図3 A. 野生型 MLL を発現する U937 細胞における ChIP アッセイ MLL 複合体の構成因子に対する抗体 (上段), AEP 複合体構成因子に対する抗体 (中段), CDK9, RNAPolymeraseII, リン酸化型 RNAPolymeraseII に対する抗体 (下段) により ChIP アッセイを行った。プライマーのポジションを下に示す¹⁹⁾。
 B. MLL-AF6 を発現する ML-2 細胞における ChIP アッセイ A と同様に実験を行った¹⁹⁾。

に伴って低下するはずの自己複製促進遺伝子の発現を恒常的に活性化することによって、異常な自己複製を引き起こし、白血病化へと導いていると予想された (図 2C, 2D)。実際、マウス骨髄から採取した未分化造血前駆細胞にレトロウイルスベクターを用いて *HOXA9* 遺伝子を導入してやると、細胞は未分化性を維持したまま増殖し、継代を重ねても半固形培地中でコロニーを形成し続けるようになる (図 4A, 4B, 4C)²¹⁾。従って、自己複製促進遺伝子の恒常的な発現は造血細胞を不死化するといえる。同様にして MLL fusion である *MLL-ENL* や *MLL-AF5q31* を造血前駆細胞に導入すると、細胞は *Hoxa9* の高発現を伴って不死化した (図 4D, 4E, 4F)。従って、確かに MLL fusion は自己複製促進遺伝子の発現を恒常的に活性化することによって、造血細胞を不死化すると思われる。では、MLL fusion はどのようなメカニズムで恒常的に転写を活性化するのか？

MLL と AF4 ファミリーの fusion である MLL-AF4 や MLL-AF5q31 を発現する細胞株において、抗 MLL 抗体を用いて免疫沈降実験 (IP) を行うと、MLL-AF4 や MLL-AF5q31 に AEP 複合体構成因子が共沈殿してくる¹⁹⁾。AF4 ファミリーはカルボキシル末端側の進化上保存された領域である CHD ドメインを介して AF4/AF5q31 ヘテロダイマーを形成する¹⁹⁾。従って MLL-AF5q31 は AF4 と結合し、さらに AF4 上の構造を介して ENL や P-TEFb と結合する。その結果、MLL と AF4 ファミリーから成る MLL fusion は MLL 複合体と AEP 複合体を足したような複合体である MLL/AEP hybrid 複合体を形成する (図 5A)。MLL-AF5q31 の CHD に変異を導入して AF4 と結合できなくした変異体はマウス造血前駆細胞に対するトランスフォーメーション活性 (不死化能) を失っていた¹⁹⁾。また、MLL-AF5q31 で不死化した細胞において、*Enl* をノックダウンすると

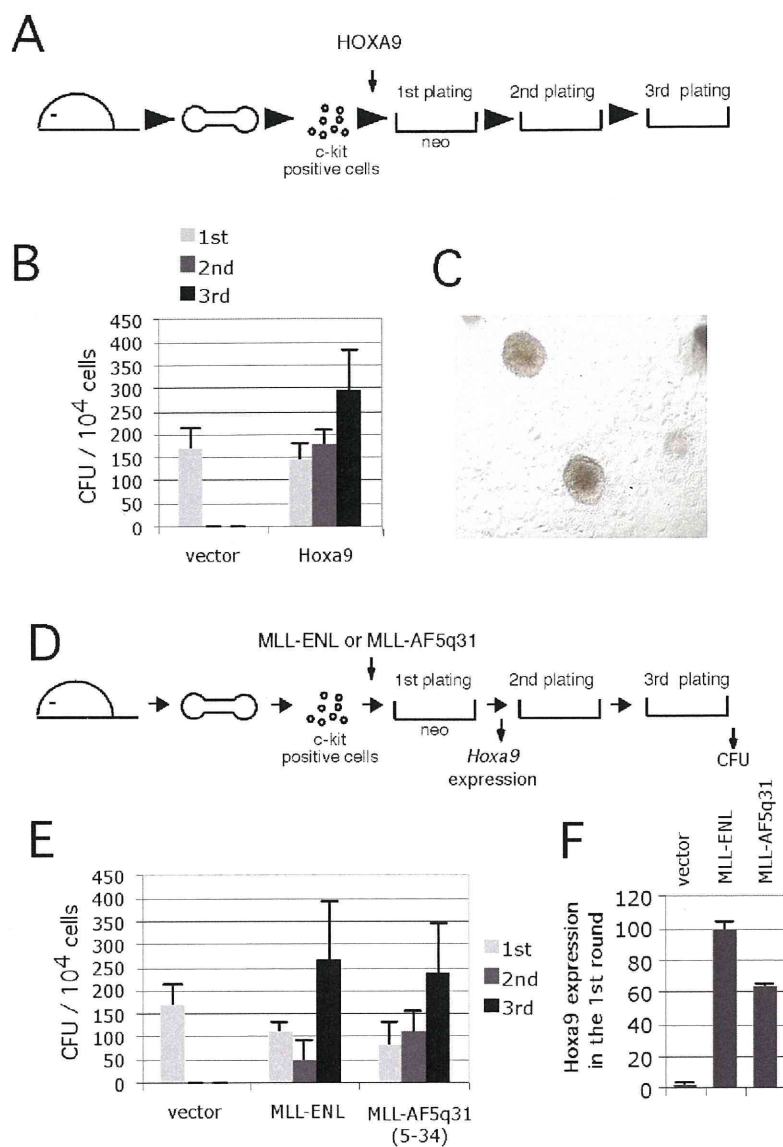


図4 A. HOXA9によるマウス骨髄前駆細胞のトランスフォーメーションアッセイ
 B. 各継代ごとの10⁴細胞あたりのコロニー数
 C. コロニーの形態
 D. MLL-ENL及びMLL-AF5q31によるマウス骨髄前駆細胞のトランスフォーメーションアッセイ
 E. 各継代ごとのコロニー形成能¹⁹⁾
 F. 1stラウンド後のHOXA9の発現¹⁹⁾

*Hoxa9*の発現の低下を伴ってコロニー形成能が消失した¹⁹⁾。これらの結果から、MLL-AF5q31はAEP複合体構成因子と結合してMLL/AEP hybrid複合体を形成する事で、恒常的に転写を活性化している事がわかった(図5B)。同様にMLL-ENLを発現する細胞株であるHB1119細胞においてIPを行うと、MLL-ENLにAEP複合体構成因子が共沈殿してきた¹⁹⁾。また、ENLのカルボキシル末端にあるAHDドメインを欠損させるとAF4ファミリーとの結合能が無くなり、トランスフォー

メーション活性を失う事が観察された¹⁹⁾。従ってMLL-ENLもまた、MLL/AEP hybrid複合体を形成する事によって自己複製促進遺伝子の転写を恒常的に活性化し、造血細胞を不死化するといえる。以上の知見から、全MLL白血病症例の約3分の2の原因となっているMLLとAEP複合体構成因子とのfusionは、通常ならば条件的に標的クロマチンにリクルートされるAEP複合体を、恒常的にリクルートする事によって転写を恒常的に活性化し、白血病を引き起こすという事が示唆された(図

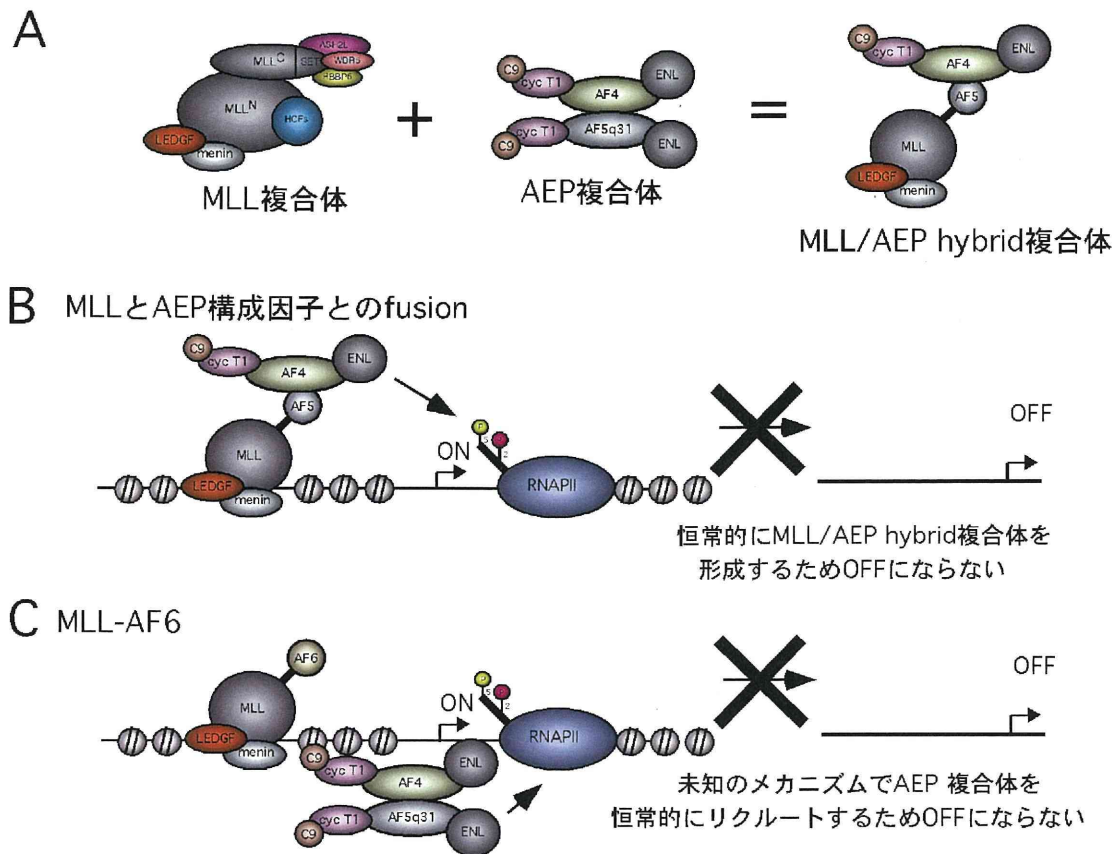


図5 A. MLL/AEP hybrid 複合体
 B. MLLとAEP複合体構成因子のfusionによる恒常的な転写活性化のメカニズム(モデル)
 C. MLL-AF6による恒常的な転写活性化のメカニズム(モデル)

5B)。

MLLの融合パートナーは60種類以上あり、そのほとんどはAEP複合体構成因子ではないため、MLL/AEP hybrid複合体を形成しないと予想される。実際に代表的な非AEP複合体構成因子とのfusionであるMLL-AF6は、AEP複合体と結合しない事が観察された¹⁹⁾。これらのMLL fusionはどのようにして造血細胞を不死化するのだろうか？ MLL-AF6を発現する細胞株であるML-2細胞を用いてChIPを行ったところ、MLL-AF6複合体が局在するクロマチンにAEP複合体も共局在する事が分かった(図3B)。この結果は、MLL-AF6はAEP複合体と直接的に結合しないけれども、何らかの間接的なメカニズムを介してAEP複合体を恒常的にリクルートしているという事を示唆した(図5C)。また、MLL-AF6によって不死化した造血細胞において*Enl*をノックダウンすると*Hoxa9*の発現が減弱し、コロニー形成能が低下した¹⁹⁾。従ってMLL-AF6もまたAEP複合体依存的に転写を活性化することで造血細胞を不死化していると思われる。

5. MLL白血病の分子メカニズム

MLL依存性の転写はAEP複合体が条件的にリクルートされる事で活性化される。MLL依存性の転写は分化が進むと低下する事から、MLL複合体やAEP複体の活性は、分化の進行に伴って低下すると予想される。MLL fusionは、通常は分化の進行に伴って抑制される自己複製促進遺伝子の発現を恒常的に活性化する事で、過剰に自己複製を促進し、白血病を引き起こす。MLL fusionによる恒常的な転写活性化のメカニズムは少なくとも二種類あるといえる。一つはMLLとAEP複合体構成因子とのfusionが、直接的な結合を介してMLL/AEP hybrid複合体を形成する事で転写を恒常的に活性化するというメカニズムであり、MLL白血病の3分の2の症例がこのメカニズムを介している(図5B)。もう一つはMLL fusionが間接的にAEP複合体をリクルートする事で転写を活性化するメカニズムである(図5C)。このメカニズムの詳細はまだ不明であり、MLL-AF6とAEP複合体が同一クロマチン上で共局在しているとい

う観察結果と, MLL-AF6 によるトランスフォーメーションに AEP 複合体が必要であるという観察結果があるだけだ。今後, AEP 複合体が標的クロマチンにリクルートされるメカニズムを明らかにしていかなければならない。この二つの不死化メカニズムのうちどちらかを採用する MLL fusion は, 今回検証されたものだけで MLL 白血病の 4 分の 3 近くを占める。まだ解析されていない他の MLL fusion もいずれかのメカニズムを介している可能性が高い。

6. まとめ

今回, 我々は直接的もしくは間接的に AEP 複合体を恒常的にリクルートする事が転写を活性化し異常な自己複製を引き起こす引き金となるという事を示した。これらの知見は, 本来の MLL 複合体の機能は転写を活性化するのではなく, 標的クロマチンを将来的に転写活性化可能な dormant な状態に維持することであり, AEP 複合体がリクルートされることによりはじめて十分な転写活性化が起こるという事を示唆している。この意味では転写活性化の実行部隊は MLL 複合体ではなく AEP 複合体であり, 今後 AEP 複合体特異的に作用する薬剤の開発を試みる事で, MLL 白血病の分子標的薬を創製できるかもしれない。

著者の COI (conflicts of interest) 開示 : 本論文発表内容に関連して特に申告なし

文 献

- DiMartino JF, Cleary ML. MLL rearrangements in hematological malignancies: lessons from clinical and biological studies. *Br J Haematol.* 1999; **106**: 614-626.
- Krivtsov AV, Armstrong SA. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer.* 2007; **7**: 823-833.
- Huret JL, Dessen P, Bernheim A. An atlas of chromosomes in hematological malignancies. Example: 11q23 and MLL partners. *Leukemia.* 2001; **15**: 987-989.
- Meyer C, Kowarz E, Hofmann J, et al. New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia.* 2009; **23**: 1490-1499.
- Nagayama J, Tomizawa D, Koh K, et al. Infants with acute lymphoblastic leukemia and a germline MLL gene are highly curable with use of chemotherapy alone: results from the Japan Infant Leukemia Study Group. *Blood.* 2006; **107**: 4663-4665.
- Hess JL. MLL: a histone methyltransferase disrupted in leukemia. *Trends Mol Med.* 2004; **10**: 500-507.
- Sedkov Y, Tillib S, Mizrokhi L, Mazo A. The bithorax complex is regulated by trithorax earlier during Drosophila embryogenesis than is the Antennapedia complex, correlating with a bithorax-like expression pattern of distinct early trithorax transcripts. *Development.* 1994; **120**: 1907-1917.
- 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.
- Yagi H, Deguchi K, Aono A, Tani Y, Kishimoto T, Komori T. Growth disturbance in fetal liver hematopoiesis of *Mll*-mutant mice. *Blood.* 1998; **92**: 108-117.
- Jude CD, Climer L, Xu D, Artinger E, Fisher JK, Ernst P. Unique and independent roles for MLL in adult hematopoietic stem cells and progenitors. *Cell Stem Cell.* 2007; **1**: 324-337.
- Yokoyama A, Kitabayashi I, Ayton PM, Cleary ML, Ohki M. Leukemia proto-oncoprotein MLL is proteolytically processed into 2 fragments with opposite transcriptional properties. *Blood.* 2002; **100**: 3710-3718.
- Yokoyama A, Wang Z, Wysocka J, et al. Leukemia proto-oncoprotein MLL forms a SET1-like histone methyltransferase complex with menin to regulate Hox gene expression. *Mol Cell Biol.* 2004; **24**: 5639-5649.
- Hisa T, Spence SE, Rachel RA, et al. Hematopoietic, angiogenic and eye defects in *Meis1* mutant animals. *Embo J.* 2004; **23**: 450-459.
- Lawrence HJ, Christensen J, Fong S, et al. Loss of expression of the *Hoxa-9* homeobox gene impairs the proliferation and repopulating ability of hematopoietic stem cells. *Blood.* 2005; **106**: 3988-3994.
- Thorsteinsdottir U, Mamo A, Kroon E, et al. Overexpression of the myeloid leukemia-associated *Hoxa9* gene in bone marrow cells induces stem cell expansion. *Blood.* 2002; **99**: 121-129.
- Somerville TC, Cleary ML. Identification and characterization of leukemia stem cells in murine MLL-AF9 acute myeloid leukemia. *Cancer Cell.* 2006; **10**: 257-268.
- Krivtsov AV, Twomey D, Feng Z, et al. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature.* 2006; **442**: 818-822.
- McMahon KA, Hiew SY, Hadjur S, et al. *Mll* has a critical role in fetal and adult hematopoietic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell.* 2007; **1**: 338-345.
- Yokoyama A, Lin M, Naresh A, Kitabayashi I, Cleary ML. A higher-order complex containing AF4 and ENL family proteins with P-TEFb facilitates oncogenic and physiologic MLL-dependent transcription. *Cancer Cell.* 2010; **17**: 198-212.
- Peterlin BM, Price DH. Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Mol Cell.* 2006; **23**: 297-305.
- Kroon E, Kros J, Thorsteinsdottir U, Baban S, Buchberg AM, Sauvageau G. *Hoxa9* transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with *Meis1a* but not *Pbx1b*. *Embo J.* 1998; **17**: 3714-3725.

