

201118072A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

ヒトATL及びHBZトランスジェニックATL発症マウスを用いた
比較ゲノム解析によるATL発症機構の解析

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 森下 和広

平成24(2012)年 5月

目 次

I. 総括研究報告		
ヒトATL及びHBZトランスジェニックATL発症マウスを用いた 比較ゲノム解析によるATL発症機構の解析	-----	1
森下和広		
II. 分担研究報告		
1. ヒトATLに関する研究	-----	6
森下和広		
2. HTLV-1/HBZに関する研究	-----	9
安永純一郎		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	12
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	14

ヒトATL及びHBZトランスジェニックATL発症マウスを用いた比較ゲノム解析による
ATL発症機構の解析

研究代表者：森下 和広 宮崎大学・医学部 教授

研究要旨

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1) は感染後 50-60 年という長い潜伏期間の後に、一部のキャリアに成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) を引き起こす。従って ATL が宿主側のゲノム異常やエピゲノム異常の蓄積による多段階発がん機構に基づき発症することを示唆している。一方、HTLV-1 のマイナス鎖にコードされる HBZ は全ての ATL 細胞で発現しており、ATL 細胞の増殖に必須であると考えられる。さらに HBZ トランスジェニックマウスが T リンパ腫および全身性の炎症を発症することから、HTLV-1 の病原性に重要かつ不可欠な役割を果たしていると考えられる。本研究では ATL の統合的ゲノム解析、および HTLV-1/HBZ による発がんにおけるゲノム異常、エピゲノム異常を解析し、両者におけるゲノム異常を比較検討することで、HTLV-1 感染から ATL 発症機構を明らかにする。成人 T 細胞白血病(ATL)の発症機構を解明するため、統合的ゲノム解析を行い、ATL の原因遺伝子群の単離を行っている。これまでに 10p11、14q11、14q32 領域に転座集中領域を同定し、それぞれの領域から候補遺伝子として、ZEB1(TCF8)、EPC1、NDRG2、BCL11B、TSLC1/CADM1 を同定した。これらの機能として機能解析として、臓器浸潤性の亢進、TGFbeta 情報伝達系の阻止、PI3K/AKT の恒常的活性化があり、EPC1 は AXSL2 と融合遺伝子を形成しておりポリコム遺伝子として転写制御異常に関わることがわかった。一方で酵母ツーハイブリッドにより、HBZ 結合タンパクとして EPC-1 を同定し、HBZ が EPC-1 を介してヒストンアセチル化酵素 TIP60 と複合体を形成することを見出した。HBZ は EPC-1 との結合を介し TIP60 の活性に影響を及ぼすことで、宿主細胞にゲノム、エピゲノム異常の発生、蓄積を誘導する可能性が示唆される。このようにゲノム異常で同定した EPC1 構造異常とウイルスタンパク質 HBZ の標的としての EPC1 が一致したことから、EPC1 を介した細胞内異常が HTLV-1 ウイルス感染症から ATL 発症に大きな役割を有することが示唆される。さらなる両者のゲノム解析から共通した異常を同定し、ATL の段階的発症機構を明らかにする。

研究分担者

京都大学ウイルス研究所 講師 安永純一郎

A. 研究目的

成人 T 細胞白血病(ATL)は HTLV-1 感染より数十年を経て白血病化する難治性白血病であるが、ゲノム異常の蓄積が著しく、固形癌に近い複雑核型を示す。このため ATL における白血病発症には HTLV-1 感染後に多くのゲノム異常、エピゲノム異常が蓄積し多因子による発症が考えられる。さらに HTLV-1 ウイルスの HTLV-1 bZIP factor (HBZ) は全ての ATL 細胞で発現し、ATL 細胞における HBZ のノックダウンは細胞増殖を抑制する。さらには HBZ トランスジェニックマウスが T 細胞リンパ腫を発症することから HBZ は ATL の発がんにも必須であると考えられる。本研究ではそこで我々は ATL 細胞および HBZ トランスジェニックマウスを用いて全ゲノム、エピゲノム解析を行い、発症の分子メカニズムを明らかにすることを目的としている。

B. 研究方法

1. ATL におけるゲノム異常の探索と発症関連遺伝子群の機能解析

ATL のゲノム解析のため、急性型 ATL60 症例を用いて、Spectral karyotyping (SKY) 法を行い、染色多切断点集中領域を同定した。その領域を中心に、高密度 SNP アレイ解析を用いて、ゲノム欠失増幅領域を同定し、cDNA オリゴヌクレオチドアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析との組み合わせで、ATL 発症関連因子群を同定した。さらにこれら因子群に対して機能解析、遺伝子改変マウスの作成を行いそれぞれのマウスにおけるがん発症機構について、病理学的分子生物学的解析を行う。さらに新規診断治療法開発に向けて特異的抗体の開発並びに、その抗体機能について検討する。

2. HBZ-TG に発症する T リンパ腫におけるゲノム異常の探索

現在、複数の HBZ-TG 由来 T リンパ腫細胞株を樹立中である。複数の T リンパ腫株を NSG マウスの生体内で継代・維持すると同時に、次世代遺伝子解析装置を用いて全エクソームシーケンシング (エクソーム解析) を行い、発がんに関与すると考えられる遺伝子変異の同定を試みる。さらに同定した遺伝子の野生型を腫瘍細胞株に導入後にマウスに接種し腫瘍形成能を評価する、機能相補実験を行う予定である。

3. HBZ 発現によるエピゲノム変化の解析

本研究では HBZ-TG 由来の T リンパ球におけるヒストンアセチル化の変化を、次世代遺伝子解析装置による ChIP シーケンシングの手法を用いて包括的に比較解析する。具体的には、以下のサンプルを用いてヒストンアセチル化レベルを検討する予定である。

- 1) HBZ-TG 由来 T リンパ球
- 2) 野生型マウス由来 T リンパ球

さらに、HBZ-TG に発症した T リンパ腫細胞におけるヒストン修飾変化と TIP60 および EPC-1 の役割について解析を行う。具体的には HBZ の存在下で TIP60 および EPC-1 の機能評価を行い、DNA 損傷やアポトーシスに対する影響を検証する。

(倫理面への配慮)

患者検体の使用に関しては、宮崎大学医学部医の倫理審査会の承認(承認番号 784)をうけ、同意 (インフォームドコンセント) の上に使用を行っている。組み換え DNA 実験を行うにあたり、宮崎大学 (承認番号: 268) 及び京都大学遺伝子組み換え実験委員会(承認番号: 2100182)の承認を受けて実施している。実験動物に関しては宮崎大学動物実験委員会の承認 (2010-509-3、510-3、525-5、534-3、505-3) 及び京都大学動物実験委員会の承認 (承認番号: D11-19、D11-20) を受け使用を行っている。利益相反に関しては、宮崎大学及び京都大学利益相反委員会が設置され適切に処理されている。

C. 研究結果

1. ATLにおけるゲノム異常の探索と発症関連遺伝子群の機能解析

急性型ATLに対する高頻度染色体切断転座中領域として、10p11、14q11、14q32領域を同定した。その転座集中部位近傍より、ZEB1/TCF8を10p11ゲノム共通欠失領域より癌抑制遺伝子候補として、

NDRG2を14q11領域近傍より、BCL11Bを14q32領域より同定した。ZEB1は末梢Tリンパ球においてTGFbeta情報伝達系を促進させnegative selectionに関与しているが、ATLでは発現低下によりTGFbeta情報伝達系を負に制御する方向に働く。さらにSmad7の高発現によりTGFbeta情報伝達はほぼ阻害されていた。ZEB1欠損マウスの解析により高率にTリンパ腫が発症した。10p11領域の転座点集中部位にはEPC1ポリコーム遺伝子があり、転座によりEPC1/AXSL2融合遺伝子を同定した。さらにNDRG2低発現はPI3K/AKT情報伝達系の恒常的活性化に繋がっており、NDRG2欠損マウスにおいて多種類のがんとリンパ腫を発症した。一方網羅的遺伝子発現解析よりATL新規細胞表面マーカーとして細胞接着因子TSLC1/CADM1を同定した。診断用抗体を開発し、FACS解析、病理組織診断等を行った。CD4+TSLC1+がATL細胞として同定でき、またリンパ腫型ATLにおいても陽性であった。TSLC1高発現により細胞接着能の亢進、in vivo臓器浸潤性に関わり、特に肝転移との関連性が示唆された。TSLC1 TGマウスを作成し、腫瘍形成能を検討したところ、生後1年半より高頻度に皮膚炎症脱毛が、半数ほどにTリンパ腫が出現するようになった。現在さらに経過を観察、病理的分子生物学的検討を進めている。

2. HBZ-TG に発症する T リンパ腫におけるゲノム異常の探索

HBZ-TG に発症した T リンパ腫細胞をマウスから分離した後、免疫不全マウス (NSG マウス) に接種することで生体内にて継代する方法を確立した。さらに複数の HBZ-TG 由来 T リンパ腫細胞株を樹立するために、HBZ-TG に発症した腫瘍を複数の NSG マウスに接種し、腫瘍の生着および継代を試みた。今後は樹立した細胞株を用いてエクソーム解析を予定している。

3. HBZ 発現による in vivo エピゲノム変化の解析
酵母ツーハイブリッドスクリーニングの結果を基に、HBZ が宿主のヒストンアセチル化酵素である TIP60、EPC-1 と複合体を形成することを見出した。加えて、EPC-1 は TIP60 タンパクの安定性を向上させるが、HBZ は EPC-1 と競合することにより TIP60 の安定性を低下させる可能性が示唆

された。現在、その生物学的意義について解析を進めている。

D. 考察

急性型 ATL の発症因子群として統合的ゲノム解析より、5 遺伝子を同定し、その機能解析を行っている。ATL 細胞の有する特徴を表す形質として TGFbeta 耐性に関して ZEB1 失活と Smad7 高発現が、PI3K/AKT 情報伝達活性化に NDRG2 失活が、臓器浸潤能には TSLC1 高発現が関与していた。このように ATL で見られる白血病の特徴と分子機構が合致するため、これらの因子を網羅的に単離しその機能を総合的に明らかにすることで新たな診断法や治療法の開発に繋がる事が期待される。また、EPC-1 は TIP60 と複合体を形成しヒストンやその他のタンパクのアセチル化修飾に関与している。一方で、酵母での研究では DNA 修復にも重要な役割を果たすことが示されている。急性型 ATL では EPC1 融合遺伝子の発現を同定したが HBZ は EPC-1 との結合を介し、宿主細胞にゲノム、エピゲノム異常の発生、蓄積に関与する可能性が示唆される。今後は ATL 細胞および HBZ-TG 由来の腫瘍細胞を用いて包括的ゲノム、エピゲノム解析を行う予定である。

E. 結論

急性型 ATL 発症関連因子として複数個の因子を同定しその機能解析を行った。ゲノム異常に伴う遺伝子構造異常(EPC-1)、発現異常(ZEB1、NDRG2、BCL11B、TSLC1)を同定したが、その中の EPC-1 ポリコーム遺伝子は EPC-1/AXSL2 融合遺伝子を作る異常であった。一方で HBZ は EPC-1、TIP60 と複合体を形成することを見出した。従ってゲノム異常とウイルス感染により同じ EPC-1 の昨日異常があるため、この複合体形成の発がんにおける意義について現在解析中である。HBZ-TG 由来 T リンパ腫細胞のマウス生体内継代法を確立した。今回の結果を基にさらにくすぶり型慢性型 ATL 等の発症に関わる因子群を同定し、HTLV-1 感染症から ATL への発症の道筋を明らかにすることが可能である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ichihara E, Kaneda K, Saito Y, Yamakawa N, Morishita K. A ngiopoietin1 contributes to the maintenance of cell quiescence in EVI1(high) leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 416:239-45. 2011
- 2) Nishikata I, Nakahata S, Saito Y, Kaneda K, Ichihara E, Yamakawa N, Morishita K. Sumoylation of MEL1S at lysine 568 and its interaction with CtBP facilitates its repressor activity and the blockade of G-CSF-induced myeloid differentiation. *Oncogene.* 30:4194-207. 2011
- 3) Saito Y, Nakahata S, Yamakawa N, Kaneda K, Ichihara E, Suekane A, Morishita K. CD52 as a molecular target for immunotherapy to treat acute myeloid leukemia with high EVI1 expression. *Leukemia.* 25:921-31 2011
- 4) Kai H, Akamatsu E, Torii E, Kodama H, Yukizaki C, Sakakibara Y, Suiko M, Morishita K, Kataoka H, Matsuno K. Inhibition of proliferation by agricultural plant extracts in seven human adult T-cell leukaemia (ATL)-related cell lines. *J Nat Med.* 65:651-5. 2011
- 5) Takenouchi H, Umeki K, Sasaki D, Yamamoto I, Nomura H, Takajo I, Ueno S, Umekita K, Kamihira S, Morishita K, Okayama A. Defective human T-lymphotropic virus type 1 provirus in asymptomatic carriers. *Int J Cancer.* 128:1335-43.
- 6) Hagiya K, Yasunaga J, Satou Y, Oshima K, Matsuoka M. ATF3, an HTLV-1 bZip factor binding protein, promotes proliferation of adult T-cell leukemia cells. *Retrovirology*, 8; 19, 2011
- 7) Yasunaga J, Lin FC, Lu X, Jeang KT. Ubiquitin-specific peptidase 20 (USP20) targets TRAF6 and HTLV-1 Tax to negatively regulate NF-kB signaling. *J Virol*, 85; 6212-6219, 2011
- 8) Yasunaga J and Matsuoka M. Molecular mechanisms of HTLV-1 infection and pathogenesis. *Int. J. Hematol*, 94; 435-442, 2011.
- 9) ugata K, Satou Y, Yasunaga JI, Hara H, Ohshima K, Utsunomiya A, Mitsuyama M, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor impairs cell-mediated immunity by suppressing production of Th1

cytokines. *Blood*, 119; 434-444; 2012.

2. 学会発表

- 1) 市川朝永、中畑新吾、近藤雄大、長井健太郎、迫田隅男、森下和広：癌抑制遺伝子 NDRG2 による炎症抑制作用. 第 32 回日本炎症・再生医学会. 京都市左京区. 2011.6.3 (ポスター)
- 2) Morishita K : the 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Retroviruses Clinical significance of TSLC1/CADM1 expression in ATL Belgium(Leuven) 2011.June.5-8
- 3) 中畑新吾、市川朝永、齋藤祐介、新井康仁、滝智彦、谷脇雅史、森下和広：NDRG2 は成人 T 細胞白血病リンパ腫においてがん抑制遺伝子として働く. 第 4 回 HTLV-1 研究会. 東京都文京区. 2011.9.19
- 4) 大隈和、館山誠司、森下和広、広瀬国孝、山本直樹、山口一成、浜口功：腫瘍溶解性ウイルス VSV を用いた ATL にたいする TSLC1 分子標的療法の開発. 第 4 回 HTLV-1 研究会. 東京都文京区. 2011.9.19
- 5) 市川朝永、中畑新吾、山口良二、西片一朗、森下和広：T 細胞特異的 TSLC1 Tg マウスは ATL 様病態を示す. 第 4 回 HTLV-1 研究会. 東京都文京区. 2011.9.19
- 6) 市原絵美、兼田加珠子、齋藤祐介、森下和広：EVII 高発現白血病細胞において自己分泌型 Ang1/Tie2 シグナル亢進は細胞周期を負に制御している. 第 84 回日本生化学会大会. 京都府左京区. 2011.9.22.
- 7) 中畑新吾、市川朝永、齋藤祐介、新井康仁、滝智彦、谷脇雅史、森下和広：成人 T 細胞白血病におけるがん抑制遺伝子候補 NDRG2 の同定. 第 70 回日本癌学会学術総会. 名古屋市. 2011.10.3
- 8) 近藤雄大、中畑新吾、長井健太郎、齋藤祐介、市川朝永、滝智彦、岩川麗香、江成政人、谷脇雅史、横田純、迫田隅男、森下和広：DNA センサータンパクである AIM2 と IFI16 の高発現が、p53 の不活化している口腔扁平上皮癌の癌化に寄与している. 第 70 回日本癌学会学術総会. 名古屋市. 2011.10.3 (ポスター)
- 9) 市川朝永、中畑新吾、近藤雄大、長井健太郎、迫田隅男、森下和広：癌抑制遺伝子 NDRG2 の炎症反応制御機構. 第 70 回日本癌学会学術総会. 名古屋市. 2011
- 10) Saito Y, Kaneda K, Ichihara E, and Morishita K : GPR56 integrate signals regulating HSC and EVII high AML niche interaction in the bone marrow. 第 73 回日本血液学会学術集会. 名古屋市熱田区. 2011
- 11) Ichihara E, Kaneda K, Saito Y, and Morishita K : Autocrine angiotensin-1/Tie2 signaling promotes cell quiescence in EVII^{high} leukemia cells. 第 73 回日本血液学会学術集会. 名古屋市熱田区. 2011
- 12) Saito Y, Kaneda K, Ichihara E, Mizuno N, Itoh H, Morishita K : Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by GPR56 signaling in bone marrow stromal cell niches. 第 34 回日本分子生物学会年会. 横浜. 2011
- 13) Kaneda-Nakashima K, Yamakawa N, Ichihara E, Saito Y, Morishita K : Modulation of drug-resistance derived from high expression of ITGA6 and ITGB4 via EVII in leukemia cell lines s. 第 34 回日本分子生物学会年会. 横浜. 2011
- 14) Sugata K, Satou Y, Yasunaga J, Nosaka K, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor perturbs immune response to the pathogens in vivo by inhibiting IFN-gamma production: 15th INTERNATIONAL CONFERENCE ON HUMAN RETROVIROLOGY HTLV AND RELATED VIRUSES. Leuven, Belgium. 4-8 June, 2011
- 15) Yasunaga J, Lin FC, Lu X, Jeang KT. HTLV-1 Tax-induced NF-kB activation is negatively regulated by Ubiquitin-specific peptidase 20(USP20): 15th INTERNATIONAL CONFERENCE ON HUMAN RETROVIROLOGY HTLV AND RELATED VIRUSES. Leuven, Belgium. 4-8 June, 2011
- 16) Yasunaga J, Lin FC, Lu X, Jeang KT. Ubiquitin-specific peptidase 20(USP20) suppresses NF-kB pathway by targeting TRAF6 and HTLV-1 Tax: 2011 ASBMB Special Symposia Series. Guangzhou Baiyun

International Convention Center, China. July 24-26, 2011

- 17) Yasunaga J, Lin FC, Lu X, Jeang KT. UBIQUITIN-SPECIFIC PEPTIDASE 20 TARGETS HTLV-1 TAX AND NEGATIVELY REGULATES NF-kB PATHWAY: International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sappaoro Convention Center, Japan. September 11-16, 2011
- 18) 安永純一朗 : Ubiquitin-specific peptidase 20(USP20) suppresses NF-kB pathway by targeting TRAF6 and HTLV-1 Tax: 第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月3-5日
- 19) Yasunaga J, Tiejun Zhao, Miyazato Paola, Satou Y, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor (HBZ) induces functionally impaired regulatory T-cells in vivo: 第73回日本血液学会学術集会、名古屋、2011年10月14-16日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

細胞接着阻害剤、細胞増殖阻害剤、並びに癌の検査方法および検査用キット、特許申請 2011-108685

2. 実用新案登録

3. その他

ヒトATL及びHBZトランスジェニックATL発症マウスを用いた比較ゲノム解析による
ATL発症機構の解析
(ヒトATLに関する研究)

研究分担者：森下 和広 宮崎大学・医学部 教授

研究要旨

成人 T 細胞白血病(ATL)の発症機構を解明するため、統合的ゲノム解析を行い、ATL の原因遺伝子群の単離を行っている。これまでに 10p11、14q11、14q32 領域に転座集中領域を同定し、それぞれの領域から候補遺伝子として、ZEB1(TCF8)、EPC1、NDRG2、BCL11B を同定した。機能解析として、ZEB1 失活は SMAD7 高発現と協調して TGFbeta 情報伝達系の阻止、NDRG2 は PI3K/AKT の恒常的活性化を行っており、EPC1 はポリコム遺伝子として転写制御異常に関わることがわかった。また TSLC1 を ATL の新規マーカーとして同定し、CD4+TSLC1+分画を ATL 細胞と同定した。リンパ腫型 ATL に ZEB1 欠損マウスは高頻度に T リンパ腫を引き起こし、NDRG2 欠損マウスも全身性の癌を引き起こすことがわかり、さらなる機能解析を継続中である。この研究を進めることで、HTLV-1 感染から ATL への段階的な白血病発症機構を明らかにしていく。

A. 研究目的

成人T細胞白血病(ATL)はHTLV-1感染より数十年を経て白血病化する難治性白血病であるが、ゲノム異常の蓄積が著しく、固形癌に近い複雑核型を示す。このためATLにおける白血病発症にはHTLV-1感染後に多くのゲノム異常、エピゲノム異常が蓄積し多因子による発症が考えられる。そこで我々は難治性急性骨髄性白血病に対する統合的ゲノム解析を行い、染色体転座集中領域の同定、並びに高密度SNPアレイを用いたゲノム欠失増幅領域の同定、並びに網羅的遺伝子発現解析を通じてATL発症関連遺伝子を複数個単離してきた。これらの遺伝子群の機能異常を明らかにし、ATL病態に即した新規診断法や治療法の開発につなげる。

B. 研究方法

ATLのゲノム解析のため、急性型ATL60症例を用いて、Spectral karyotyping (SKY)法を行い、染色多切断点集中領域を同定した。その領域を中心に、高密度SNPアレイ解析を用いて、ゲノム欠失増幅領域を同定し、cDNAオリゴヌクレオチドアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析との組み合わせで、ATL発症関連因子群を同定した。さらにこれら因子群に対して機能解析、遺伝子改変マウスの作成を行いそれぞれのマウスにおけるがん発症機構について、病理学的分子生物学的解析を行う。さらに新規診断治療法開発に向けて特異的抗体の開発並びに、その抗体機能について検討する。(倫理面への配慮)

患者検体の使用に関しては、宮崎大学医学部医の倫理審査会の承認(承認番号 784)をうけ、同意(インフォームドコンセント)の上で使用を行っている。

る。組み換え DNA 実験を行うにあたり、宮崎大学(承認番号: 268)の承認を受けて実施している。実験動物に関しては宮崎大学動物実験委員会の承認(2010-509-3、510-3、525-5、534-3、505-3)を受け使用を行っている。利益相反に関しては、宮崎大学利益相反委員会が設置され適切に処理されている。

C. 研究成果

急性型ATLに対する高頻度染色体切断転座中領域として、10p11、14q11、14q32領域を同定した。その転座集中部位近傍より、ZEB1/TCF8を10p11ゲノム共通欠失領域より癌抑制遺伝子候補として、NDRG2を14q11領域近傍より、BCL11Bを14q32領域より同定した。ZEB1は末梢Tリンパ球においてTGFbeta情報伝達系を促進させnegative selectionに関与しているが、ATLでは発現低下によりTGFbeta情報伝達系を負に制御する方向に働く。さらにSmad7の高発現によりTGFbeta情報伝達はほぼ阻害されていた。ZEB1欠損マウスの解析により高率にTリンパ腫が発症した。10p11領域の転座点集中部位にはEPC1ポリコム遺伝子があり、転座によりEPC1/AXSL2融合遺伝子を同定した。さらにNDRG2低発現はPI3K/AKT情報伝達系の恒常的活性化に繋がっており、NDRG2欠損マウスにおいて多種類のがんとリンパ腫を発症した。一方網羅的遺伝子発現解析よりATL新規細胞表面マーカーとして細胞接着因子TSLC1/CADM1を同定した。診断用抗体を開発し、FACS解析、病理組織診断等を行った。CD4+TSLC1+がATL細胞として同定でき、またリンパ腫型ATLにおいても陽性であった。TSLC1高発現により細胞接着能の亢進、in vivo臓器浸潤性に関わり、特に肝転

移との関連性が示唆された。TSLC1 Tgマウスを作成し、腫瘍形成能を検討したところ、生後1年半より高頻度に皮膚炎症脱毛が、半数ほどにTリンパ腫が出現するようになった。現在さらに経過を観察、病理的分子生物学的検討を進めている。

D. 考察

急性型 ATL の発症因子群として統合的ゲノム解析より、5 遺伝子を同定し、その機能解析を行っている。ATL 細胞の有する特徴を表す形質として TGFbeta 耐性に関して ZEB1 失活と Smad7 高発現が、PI3K/AKT 情報伝達活性化に NDRG2 失活が、臓器浸潤能には TSLC1 高発現が関与していた。このように ATL で見られる白血病の特徴と分子機構が合致するため、これらの因子を網羅的に単離しその機能を総合的に明らかにすることで新たな診断法や治療法の開発に繋がる事が期待される。

E. 結論

急性型 ATL 発症関連因子として複数個の因子を同定しその機能解析を行った。今回の結果を基にさらにくすぶり型慢性型 ATL 等の発症に関わる因子群を同定し、HTLV-1 感染症から ATL への発症の道筋を明らかにすることが可能である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ichihara E, Kaneda K, Saito Y, Yamakawa N, Morishita K. A ngiopoietin1 contributes to the maintenance of cell quiescence in EVI1(high) leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 416:239-45. 2011
- 2) Nishikata I, Nakahata S, Saito Y, Kaneda K, Ichihara E, Yamakawa N, Morishita K. Sumoylation of MEL1S at lysine 568 and its interaction with CtBP facilitates its repressor activity and the blockade of G-CSF-induced myeloid differentiation. *Oncogene*. 30:4194-207. 2011
- 3) Saito Y, Nakahata S, Yamakawa N, Kaneda K, Ichihara E, Suekane A, Morishita K. CD52 as a molecular target for immunotherapy to treat acute myeloid leukemia with high EVI1 expression.. *Leukemia*. 25:921-31 2011
- 4) Kai H, Akamatsu E, Torii E, Kodama H, Yukizaki C, Sakakibara Y, Suiko M, Morishita K, Kataoka H, Matsuno K. Inhibition of proliferation by agricultural plant extracts in seven human adult T-cell leukaemia (ATL)-related cell lines. *J Nat Med*. 65:651-5. 2011
- 5) Takenouchi H, Umeki K, Sasaki D, Yamamoto I, Nomura H, Takajo I, Ueno S, Umekita K, Kamihira S, Morishita K, Okayama A. Defective human

T-lymphotropic virus type 1 provirus in asymptomatic carriers. *Int J Cancer*. 128:1335-43. 2011

2. 学会発表

- 1) 市川朝永、中畑新吾、近藤雄大、長井健太郎、迫田隅男、森下和広：癌抑制遺伝子 NDRG2 による炎症抑制作用。第 32 回日本炎症・再生医学会。京都市左京区。2011.6.3 (ポスター)
- 2) Morishita K : the 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Retroviruses ATL 関連の発表 Belgium(Leuven) 2011.June.5-8
- 3) 中畑新吾、市川朝永、齋藤祐介、新井康仁、滝智彦、谷脇雅史、森下和広：NDRG2 は成人 T 細胞白血病リンパ腫においてがん抑制遺伝子として働く。第 4 回 HTLV-1 研究会。東京都文京区。2011.9.19
- 4) 大隈和、館山誠司、森下和広、広瀬国孝、山本直樹、山口一成、浜口功：腫瘍溶解性ウイルス VSV を用いた ATL にたいする TSLC1 分子標的療法の開発。第 4 回 HTLV-1 研究会。東京都文京区。2011.9.19
- 5) 市川朝永、中畑新吾、山口良二、西片一朗、森下和広：T 細胞特異的 TSLC1 Tg マウスは ATL 様病態を示す。第 4 回 HTLV-1 研究会。東京都文京区。2011.9.19
- 6) 市原絵美、兼田加珠子、齋藤祐介、森下和広：EVI1 高発現白血病細胞において自己分泌型 Ang1/Tie2 シグナル亢進は細胞周期を負に制御している。第 84 回日本生化学会大会。京都府左京区。2011.9.22.
- 7) 中畑新吾、市川朝永、齋藤祐介、新井康仁、滝智彦、谷脇雅史、森下和広：成人 T 細胞白血病におけるがん抑制遺伝子候補 NDRG2 の同定。第 70 回日本癌学会学術総会。名古屋市。2011.10.3 Identification of NDRG2 as a candidate tumor suppressor gene in adult T-cell leukemia Nakahata S, Ichikawa T, Saito Y, Arai Y, Taki T, Taniwaki M, and Morishita K 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association Nagoya 2011.10.3
- 8) 近藤雄大、中畑新吾、長井健太郎、齋藤祐介、市川朝永、滝智彦、岩川麗香、江成政人、谷脇雅史、横田純、迫田隅男、森下和広：DNA センサータンパクである AIM2 と IFI16 の高発現が、p53 の不活化している口腔扁平上皮癌の癌化に寄与している。第 70 回日本癌学会学術総会。名古屋市。2011.10.3 (ポスター) Overexpression of DNA sensor proteins, AIM2 and IFI16, contributes to tumorigenesis of OSCC with p53 inactivation. Kondo Y, Nakahata S, Nagai K, Saito Y, Ichikawa T, Taki T, Iwakawa R, Enari M, Taniwaki M, Yokota J, Sakoda S, Morishita K 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association Nagoya 2011.10.3
- 9) 市川朝永、中畑新吾、近藤雄大、長井健太郎、迫田隅男、森下和広：癌抑制遺伝子 NDRG2 の炎症反応制御機構。第 70 回日本癌学会学術総会。

名古屋市. 2011.10.3 (ポスター) A critical role of tumor-suppressor NDRG2 for anti-inflammatory function in oral squamous-cell carcinoma Ichikawa T, Nakahata S, Kondo Y, Nagai K, Sakoda S, Morishita K. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association Nagoya 2011.10.3

10) Saito Y, Kaneda K, Ichihara E, and Morishita K : GPR56 integrate signals regulating HSC and EVI1 high AML niche interaction in the bone marrow. 第73回日本血液学会学術集会. 名古屋市熱田区. 2011.10.14.

11) Ichihara E, Kaneda K, Saito Y, and Morishita K. : Autocrine angiopoietin-1/Tie2 signaling promotes cell quiescence in EVI1^{high} leukemia cells. 第73回日本血液学会学術集会. 名古屋市熱田区. 2011.10.15 (ポスター)

12) Saito Y, Kaneda K, Ichihara E, Mizuno N, Itoh H, Morishita K : Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by GPR56 signaling in bone marrow stromal cell niches. 第34回日本分子生物学会年会. 横浜. 2011.12.13. (Talk, ポスター)

13) Kaneda-Nakashima K, Yamakawa N, Ichihara E, Saito Y, Morishita K. : Modulation of drug-resistance derived from high expression of ITGA6 and ITGB4 via EVI1 in leukemia cell lines s. 第34回日本分子生物学会年会. 横浜. 2011.12.15. (ポスター)

H.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

細胞接着阻害剤、細胞増殖阻害剤、並びに癌の検査方法および検査用キット、特許申請 2011-108685

2. 実用新案登録

3. その他

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

ヒトATL及びHBZトランスジェニックATL発症マウスを用いた比較ゲノム解析による
ATL発症機構の解析
(HTLV1/HBZに関する研究)

研究分担者：安永 純一郎 京都大学ウイルス研究所 講師

研究要旨

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1) は感染後 50-60 年という長い潜伏期間の後に、一部のキャリアに成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) を引き起こす。このことは、ATL が宿主側のゲノム異常やエピゲノム異常の蓄積による多段階発がん機構に基づき発症することを示唆している。一方、HTLV-1 のマイナス鎖にコードされる HBZ は全ての ATL 細胞で発現しており、ATL 細胞の増殖に必須であると考えられる。さらに HBZ トランスジェニックマウスが T リンパ腫および全身性の炎症を発症することから、HTLV-1 の病原性に重要かつ不可欠な役割を果たしていると考えられる。本研究では HBZ による発がんにおけるゲノム異常、エピゲノム異常の関与を解析している。

ヒストンアセチル化は遺伝子発現をエピジェネティックに制御する修飾であり、数多くのヒストンアセチル化酵素が知られている。我々は酵母ツーハイブリッドにより、HBZ 結合タンパクとして EPC-1 を同定し、HBZ が EPC-1 を介してヒストンアセチル化酵素 TIP60 と複合体を形成することを見出した。EPC-1 は TIP60 タンパクの安定性を向上させるが、HBZ は EPC-1 と競合することにより TIP60 の安定性を低下させる可能性が示唆された。EPC-1 は TIP60 とヒストンのアセチル化に関与する一方で、酵母では DNA 修復にも重要な役割を果たすことが示されている。HBZ は EPC-1 との結合を介し TIP60 の活性に影響を及ぼすことで、宿主細胞にゲノム、エピゲノム異常の発生、蓄積を誘導する可能性が示唆される。

A. 研究目的

HTLV-1 bZIP factor (HBZ) は全ての ATL 細胞で発現し、ATL 細胞における HBZ のノックダウンは細胞増殖を抑制する。さらには HBZ トランスジェニックマウスが T 細胞リンパ腫を発症することから HBZ は ATL の発がんにも必須であると考えられる。本研究では ATL 細胞および HBZ トランスジェニックマウスを用いて全ゲノム、エピゲノム解析を行い、発症の分子メカニズムを明らかにすることを目的としている。

B. 研究方法

1. HBZ-TG に発症する T リンパ腫におけるゲノム異常の探索

現在、複数の HBZ-TG 由来 T リンパ腫細胞株を樹立中である。複数の T リンパ腫株を NSG マウスの生

体内で継代・維持すると同時に、次世代遺伝子解析装置を用いて全エクソンシーケンシング (エクソーム解析) を行い、発がんにも重要であると考えられる遺伝子変異の同定を試みる。さらに同定した遺伝子の野生型を腫瘍細胞株に導入後にマウスに接種し腫瘍形成能を評価する、機能相補実験を行う予定である。

2. HBZ 発現によるエピゲノム変化の解析

本研究では HBZ-TG 由来の T リンパ球におけるヒストンアセチル化の変化を、次世代遺伝子解析装置による ChIP シーケンスの手法を用いて包括的に比較解析する。具体的には、以下のサンプルを用いてヒストンアセチル化レベルを検討する予定である。

1) HBZ-TG 由来 T リンパ球

2) 野生型マウス由来 T リンパ球

さらに、HBZ-TG に発症した T リンパ腫細胞にお

けるヒストン修飾変化と TIP60 および EPC-1 の役割について解析を行う。具体的には HBZ の存在下で TIP60 および EPC-1 の機能評価を行い、DNA 損傷やアポトーシスに対する影響を検証する。

(倫理面への配慮)

組み換え DNA 実験を行うにあたり、京都大学遺伝子組み換え実験委員会の承認を受けて実施している(承認番号:100182)。また、動物実験を行うにあたり、京都大学動物実験委員会の承認の下に行っている(承認番号:D11-19、D11-20)。

C. 研究結果

1. HBZ-TG に発症する T リンパ腫におけるゲノム異常の探索

HBZ-TG に発症した T リンパ腫細胞をマウスから分離した後、免疫不全マウス (NSG マウス) に接種することで生体内にて継代する方法を確立した。さらに複数の HBZ-TG 由来 T リンパ腫細胞株を樹立するために、HBZ-TG に発症した腫瘍を複数の NSG マウスに接種し、腫瘍の生着および継代を試みた。今後は樹立した細胞株を用いてエクソーム解析を予定している。

2. HBZ 発現による in vivo エピゲノム変化の解析
酵母ツーハイブリッドスクリーニングの結果を基に、HBZ が宿主のヒストンアセチル化酵素である TIP60、EPC-1 と複合体を形成することを見出した。加えて、EPC-1 は TIP60 タンパクの安定性を向上させるが、HBZ は EPC-1 と競合することにより TIP60 の安定性を低下させる可能性が示唆された。現在、その生物学的意義について解析を進めている。

D. 考察

EPC-1 は TIP60 と複合体を形成しヒストンやその他のタンパクのアセチル化修飾に関与している。一方、酵母での研究では DNA 修復にも重要な役割を果たすことが示されている。HBZ は EPC-1 との結合を介し、宿主細胞にゲノム、エピゲノム異常の発生、蓄積に関与する可能性が示唆される。今後は ATL 細胞および HBZ-TG 由来の腫瘍細胞を用いて包括的ゲノム、エピゲノム解析を行う予定である。

E. 結論

HBZ は EPC-1、TIP60 と複合体を形成することを見出した。この複合体形成の発がんにおける意義について現在解析中である。HBZ-TG 由来 T リンパ腫

細胞のマウス生体内継代法を確立した。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hagiya K, Yasunaga J, Satou Y, Oshima K, Matsuoka M. ATF3, an HTLV-1 bZip factor binding protein, promotes proliferation of adult T-cell leukemia cells. *Retrovirology*, 8; 19, 2011
2. Yasunaga J, Lin FC, Lu X, Jeang KT. Ubiquitin-specific peptidase 20 (USP20) targets TRAF6 and HTLV-1 Tax to negatively regulate NF-kB signaling. *J Virol*, 85; 6212-6219, 2011
3. Yasunaga J and Matsuoka M. Molecular mechanisms of HTLV-1 infection and pathogenesis. *Int. J. Hematol*, 94; 435-442, 2011.
4. Sugata K, Satou Y, Yasunaga J, Hara H, Oshima K, Utsunomiya A, Mitsuyama M, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor impairs cell-mediated immunity by suppressing production of Th1 cytokines. *Blood*, 119; 434-444, 2012.

2. 学会発表

1. Sugata K, Satou Y, Yasunaga J, Nosaka K, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor perturbs immune response to the pathogens in vivo by inhibiting IFN-gamma production: 15th INTERNATIONAL CONFERENCE ON HUMAN RETROVIROLOGY HTLV AND RELATED VIRUSES. Leuven, Belgium. 4-8 June, 2011
2. Yasunaga J, Lin FC, Lu X, Jeang KT. HTLV-1 Tax-induced NF-kB activation is negatively regulated by Ubiquitin-specific peptidase 20(USP20): 15th INTERNATIONAL CONFERENCE ON HUMAN RETROVIROLOGY HTLV AND RELATED VIRUSES. Leuven, Belgium. 4-8 June, 2011
3. Yasunaga J, Lin FC, Lu X, Jeang KT. Ubiquitin-specific peptidase 20(USP20) suppresses NF-kB pathway by targeting TRAF6 and HTLV-1 Tax: 2011 ASBMB Special Symposia Series. Guangzhou Baiyun International Convention Center, China. July 24-26, 2011
4. Yasunaga J, Lin FC, Lu X, Jeang KT. UBIQUITIN-SPECIFIC PEPTIDASE 20 TARGETS HTLV-1 TAX AND NEGATIVELY REGULATES NF-kB PATHWAY: International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo

Convention Center, Japan. September 11-16, 2011

5. 安永純一朗 : Ubiquitin-specific peptidase 20(USP20) suppresses NF-kB pathway by targeting TRAF6 and HTLV-1 Tax: 第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月3-5日
6. Yasunaga J, Tiejun Zhao, Miyazato Paola, Satou Y, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor (HBZ) induces functionally impaired regulatory T-cells in vivo: 第73回日本血液学会学術集会、名古屋、2011年10月14-16日

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ichihara E, Kaneda K, Saito Y, Yamakawa N, <u>Morishita K.</u>	Angiopoietin1 contributes to the maintenance of cell quiescence in EVI1(high) leukemia cells.	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	416	239-245	2011
Nishikata I, Nakahata S, Saito Y, Kaneda K, Ichihara E, Yamakawa N, <u>Morishita K.</u>	Sumoylation of MEL1S at lysine 568 and its interaction with CtBP facilitates its repressor activity and the blockade of G-CSF-induced myeloid differentiation.	<i>Oncogene.</i>	30	4194-4207	2011
Saito Y, Nakahata S, Yamakawa N, Kaneda K, Ichihara E, Suekane A, <u>Morishita K.</u>	CD52 as a molecular target for immunotherapy to treat acute myeloid leukemia with high EVI1 expression.	<i>Leukemia.</i>	25	921-931	2011
Kai H, Akamatsu E, Torii E, Kodama H, Yukizaki C, Sakakibara Y, Suiko M, <u>Morishita K.</u> , Kataoka H, Matsuno K.	Inhibition of proliferation by agricultural plant extracts in seven human adult T-cell leukaemia (ATL)-related cell lines.	<i>J Nat Med.</i>	65	651-655	2011
Takenouchi H, Umemeki K, Sasaki D, Yamamoto I, Nomura H, Takajo I, Ueno S, Umemekita K, Kamihira S, <u>Morishita K.</u> , Okayama	Defective human T-lymphotropic virus type 1 proviruses in asymptomatic carriers.	<i>Int J Cancer.</i>	128	1335-1343	2011
Hagiya K, <u>Yasunaga J.</u> , Satou Y, Oshima K, Matsuo M	ATF3, an HTLV-1 bZip factor binding protein, promotes proliferation of adult T-cell leukemia cells.	<i>Retrovirology</i>	8	19	2011
<u>Yasunaga J.</u> , Lin FC, Lu X, Jeang KT	Ubiquitin-specific peptidase 20 (USP20) targets TRAF6 and HTLV-1 Tax to negatively regulate NF- κ B signaling.	<i>J Virol</i>	85	6212-6219	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yasunaga J and Matsuoka M	Molecular mechanisms of HTLV-1 infection and pathogenesis.	<i>Int. J. Hematol</i>	94	435-442	2011
Sugata K, Satou Y, Yasunaga JI, Hara H, Ohshima K, Utsunomiya A, Mitsuyama M, Matsuoka M	HTLV-1 bZIP factor impairs cell-mediated immunity by suppressing production of Th1 cytokines.	<i>Blood</i>	119	434-444	2012



ELSEVIER

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

Angiopoietin1 contributes to the maintenance of cell quiescence in EVI1^{high} leukemia cells

Emi Ichihara, Kazuko Kaneda, Yusuke Saito, Norio Yamakawa, Kazuhiro Morishita*

Division of Tumor and Cellular Biochemistry, Department of Medical Sciences, Faculty of Medicine, University of Miyazaki, Miyazaki, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 October 2011

Available online 18 October 2011

Keywords:

EVI1

AML

Ang1

p18

Cell cycle

ABSTRACT

Ecotropic viral integration site-1 (EVI1) is an oncogenic transcription factor in human acute myeloid leukemia (AML) associated with poor prognosis. Because the drug-resistance of leukemia cells is partly dependent on cell quiescence in the bone marrow niche, EVI1 may be involved in cell cycle regulation in leukemia cells. As a candidate regulator of the cell cycle in leukemia cells with high EVI1 expression (EVI1^{high}), we analyzed angiopoietin1 (Ang1), which is a down-regulated gene in EVI1-deficient mice and is involved in the quiescence of hematopoietic stem cells. The results of real-time PCR analyses showed that Ang1 is highly expressed in leukemia cell lines and primary AML cells with EVI1^{high} expression. Introduction of shRNA against EVI1 into EVI1^{high} leukemia cells down-regulated Ang1 expression. Moreover, knockdown of Ang1 in EVI1^{high} leukemia cells promoted cell cycle progression and down-regulated the CDK inhibitor p18 (INK4c). Treatment with a decoy Tie2/Fc protein also down-regulated the expression of p18. These results suggest that Ang1/Tie2 signaling may suppress cell cycle progression via maintenance of G0/G1 phase through up-regulation of p18 expression. This mechanism may help to maintain EVI1^{high} leukemia cells in the bone marrow niche and promote resistance to anti-cancer drugs.

© 2011 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

The murine ecotropic viral integration site-1 (EVI1) gene was isolated from a common site of retroviral insertion in AKXD murine myelogenous leukemias [1,2]. The homologous human gene EVI1 is located on chromosome 3q26, and chromosomal abnormalities at 3q26 lead to aberrant expression of EVI1 in myeloid malignancies, including acute myeloid leukemia (AML), myelodysplastic syndrome (MDS), and blastic crisis of chronic myeloid leukemia (CML) [3,4]. AML with high expression of EVI1 (EVI1^{high}) accounts for approximately 8–10% of all cases of AML, and it exhibits a poor prognosis because of resistance to chemotherapy [5–7]. The gene expression profiles of EVI1^{high} AML patients are quite similar to those of control CD34⁺ cells [6], and furthermore, analysis of EVI1-deficient mice has shown that EVI1 is required for the maintenance of hematopoietic stem cells (HSCs), suggesting that EVI1^{high} leukemia cells may have stem cell-like phenotypes.

We and other groups have shown that EVI1 is predominantly expressed both in embryonic HSCs and HSCs in adult bone marrow [8–10]. EVI1 maintains the self-renewal capacity of embryonic

HSCs by activating Gata2 transcription [11], and ablation of EVI1 in adult bone marrow also leads to a significant decrease in HSCs [12]. Taken together, these results suggest that EVI1 is indispensable for HSC maintenance and that EVI1 may also play an important role in the maintenance of cell quiescence as stem cell-like phenotypes in leukemia cells, thereby contributing to their chemoresistance.

In this manuscript, we focused on angiopoietin1 (Ang1) as a candidate gene whose high expression may be involved in the maintenance of cell quiescence in EVI1^{high} leukemia cells. Ang1 was identified as a ligand of the tyrosine kinase receptor Tie2 [13,14], and it belongs to the angiopoietin family, which also includes Ang2, Ang3, and Ang4. Ang1 and Ang4 activate the Tie2 receptor as agonists, whereas Ang2 and Ang3 act as antagonists [15,16]. Interactions between Ang1 and the receptor tyrosine kinase Tie2 promote HSC quiescence and are important for the maintenance of long-term repopulation *in vivo* [17,18]. In our previous study, Ang1 expression was found to be down-regulated in embryonic HSCs from EVI1-deficient mice, as was Gata2 [11]. Therefore, we hypothesized that the expression of Ang1 in EVI1^{high} leukemia cells might be regulated by EVI1 and that Ang1 would promote cell quiescence in EVI1^{high} leukemia cells.

In this study, we initially examined the expression of Ang1 in leukemia cells and found that Ang1 was strongly expressed in leukemia cell lines and primary AML cells with EVI1^{high} expression.

* Corresponding author. Address: Division of Tumor and Cellular Biochemistry, Department of Medical Sciences, Faculty of Medicine, University of Miyazaki, 5200 Kihara, Kiyotake, Miyazaki, Japan. Fax: +81 985 85 2401.

E-mail address: kmorishi@medmiyazaki-u.ac.jp (K. Morishita).

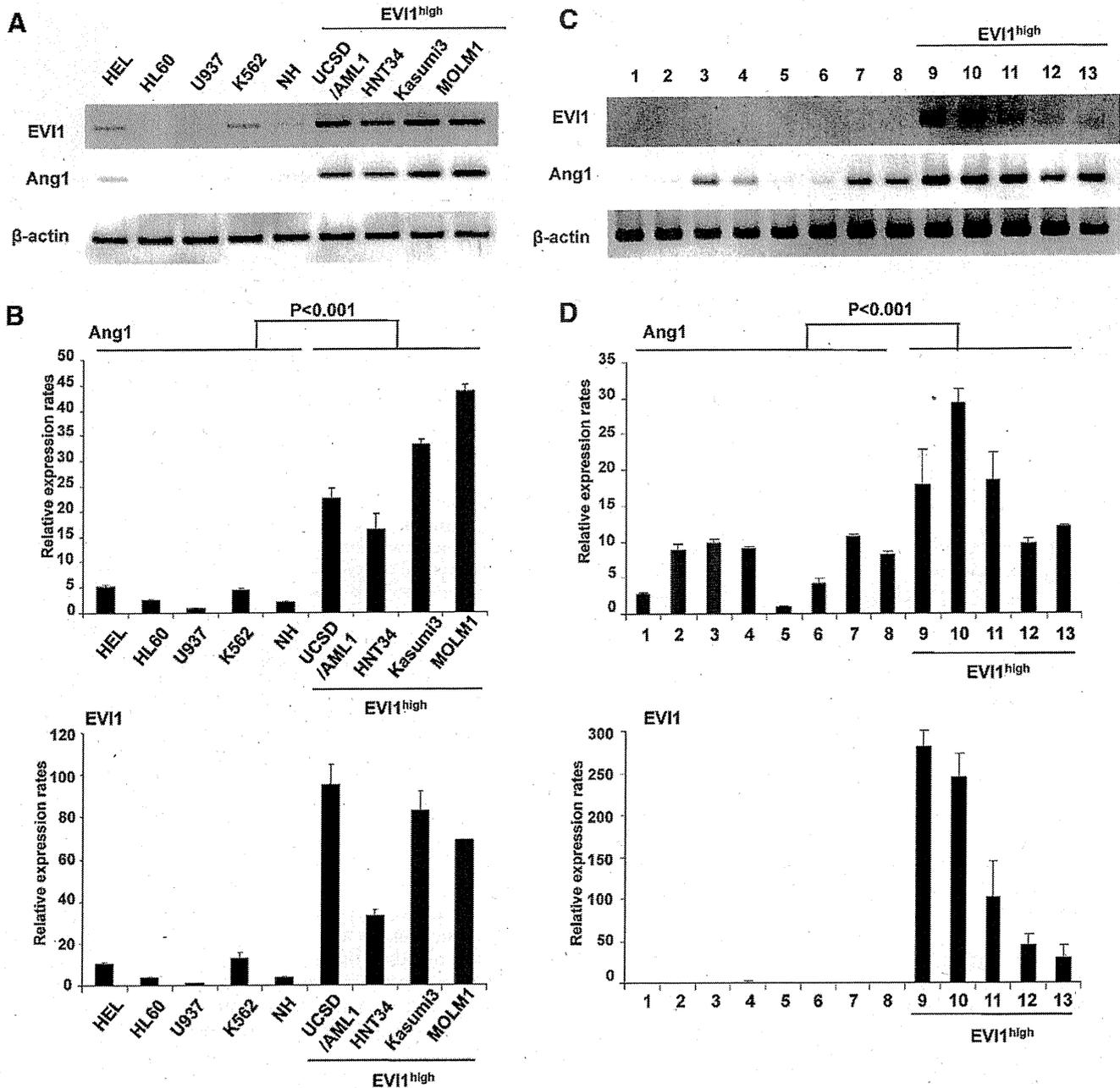


Fig. 1. Ang1 is highly expressed in EVI1^{high} leukemia cells. (A) Semi-quantitative reverse-transcription PCR (RT-PCR) analysis of EVI1 and Ang1 in various types of human leukemia cell lines. (B) Quantitative real-time RT-PCR analysis of EVI1 and Ang1 in leukemia cell lines. The data are presented as relative fold changes compared with the expression level in U937 cells. The data are expressed as the mean \pm standard deviation (s.d.). Student's *t*-test was used for statistical analysis. (C) Semi-quantitative RT-PCR analysis of EVI1 and Ang1 in AML patient samples. (D) Quantitative real-time RT-PCR analysis of EVI1 and Ang1 in AML patient samples. The data are presented as relative fold changes compared with the expression in sample No. 5. The data are expressed as the mean \pm s.d. Student's *t*-test was used for statistical analysis.

Introduction of shRNA targeting EVI1 into EVI1^{high} leukemia cells resulted in down-regulation of Ang1 expression. Ang1-knockdown experiments revealed that Ang1 suppresses cell cycle progression via maintenance of G0/G1 phase in EVI1^{high} leukemia cells. Moreover, knockdown of Ang1 expression and treatment with a Tie2 inhibitor (chimeric Tie2/Fc protein) down-regulated CDK inhibitor p18 (INK4c) expression. Therefore, Ang1/Tie2 signaling may contribute to cell quiescence through up-regulation of p18 expression in EVI1^{high} leukemia cells. This may enhance the maintenance of EVI1^{high} leukemia cells with resistance to chemotherapy in the bone marrow niche.

2. Materials and methods

2.1. Cell lines

UCSD/AML1 [19,20], HNT34 [21], and Kasumi-3 [22] cells were cultured in RPMI 1640 (Wako, Osaka, Japan) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 1 ng/mL human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF). HEL [23], HL60 [24], U937 [25], K562 [26], NH and MOLM1 [27] cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS. 293T cells were cultured in DMEM (Wako) supplemented with 10% FCS. Detailed information

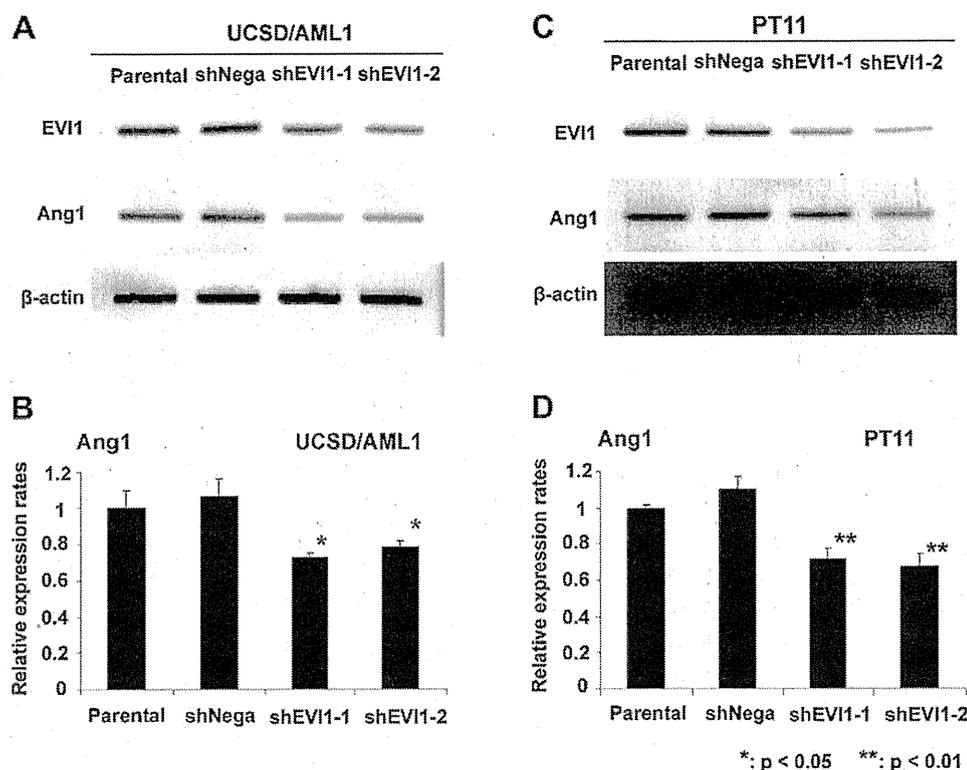


Fig. 2. Knockdown of EVI1 leads to down-regulation of Ang1 gene expression. (A) Small hairpin RNA (shRNA) against EVI1 was introduced into UCSD/AML1 cells to generate AML1/shEVI1-1, AML1/shEVI1-2, and AML1/shNeg cell lines. shNeg was used as a non-silencing control. Semi-quantitative RT-PCR analysis of EVI1 and Ang1 in parental UCSD/AML1 cells, AML1/shNeg cells, and AML1/shEVI1-1 and -2 cells. (B) Quantitative real-time RT-PCR analysis of EVI1 and Ang1 in parental UCSD/AML1 cells, AML1/shNeg cells, and AML1/shEVI1-1 and -2 cells. The data are presented as relative fold changes compared with the expression in parental UCSD/AML1 cells. The data are expressed as the mean \pm s.d. Student's *t*-test was used for statistical analysis ($*p < 0.05$). (C) shRNA against EVI1 (shEVI1-1 or -2) was introduced into primary AML cells from a patient (PT11). Semi-quantitative RT-PCR analysis of EVI1 and Ang1 in parental PT11 cells, PT11/shNeg cells, and PT11/shEVI1-1 and -2 cells. (D) Quantitative real-time RT-PCR analysis of EVI1 and Ang1 in parental PT11 cells, PT11/shNeg cells, and PT11/shEVI1-1 and -2 cells. The data are presented as relative fold changes compared with the expression in parental PT11 cells. The data are expressed as the mean \pm s.d. Student's *t*-test was used for statistical analysis ($**p < 0.01$).

about the cell lines was presented previously [28]. Briefly, UCSD/AML1, HNT34, Kasumi-3, and MOLM1 cells each have chromosome 3q26 abnormalities with high expression of EVI1, whereas HEL, HL60, U937, K562, and NH cells do not have 3q26 abnormalities and show low expression of EVI1.

2.2. Patient samples

Leukemia cells were obtained from AML patients before chemotherapy. A summary of AML patient samples used in this study is shown in Supplementary Table 1. One sample with high expression of EVI1, PT11 cells, were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS and 1 ng/mL GM-CSF. This study was approved by the Institutional Review Board of the Faculty of Medicine, University of Miyazaki. Informed consent was obtained from all donors in accordance with the Declaration of Helsinki.

Other materials and methods are given in the Supplementary data.

3. Results

3.1. Ang1 expression is high in EVI1^{high} leukemia cells

In our previous study, the expression level of Ang1 was found to be markedly decreased in embryonic HSCs derived from EVI1-deficient mice [11]. To investigate the correlation between the gene expression levels of EVI1 and Ang1 in leukemia cells, we performed semi-quantitative RT-PCR for Ang1 using four EVI1^{high} leukemia cell lines (UCSD/AML1, HNT34, Kasumi-3, and MOLM1), five EVI1^{low} leukemia cell lines (HEL, HL60, U937, K562, and NH), five leukemia

cell samples from EVI1^{high} AML patients and eight leukemia cell samples from EVI1^{low} AML patients. As shown in Fig. 1A and C, the expression of Ang1 was up-regulated in the EVI1^{high} leukemia cell lines and AML cells from EVI1^{high} patients as compared with the EVI1^{low} leukemia cell lines and AML cells from EVI1^{low} patients, respectively. The high expression of Ang1 in leukemia cell lines and patient samples with EVI1^{high} expression was also confirmed by quantitative real-time RT-PCR (Fig. 1B and D).

3.2. Ang1 gene expression is regulated by EVI1 in EVI1^{high} leukemia cells

To investigate whether the expression of Ang1 is regulated by EVI1 in EVI1^{high} leukemia cells, we knocked down EVI1 expression in UCSD/AML1 cell line by introducing a small hairpin RNA (shRNA) against EVI1 (or shNeg as a nonsilencing control). Examination of the levels of Ang1 by semi-quantitative and quantitative RT-PCR revealed that the level of Ang1 mRNA was significantly lower in the AML1/shEVI1 cell lines than in the control cell lines (Fig. 2A and B). The same experiment was performed using primary leukemic cells derived from a patient with inv(3)-bearing AML (PT11). We obtained very similar results in that the expression of Ang1 was down-regulated in the primary AML cells expressing shEVI1 (Fig. 2C and D). These results indicate that the expression of Ang1 is dependent on EVI1 expression in EVI1^{high} leukemia cells.

3.3. Ang1 suppresses cell cycle progression in EVI1^{high} leukemia cells

To investigate whether Ang1 is involved in cell cycle regulation in EVI1^{high} leukemia cells, we established UCSD/AML1 cell lines

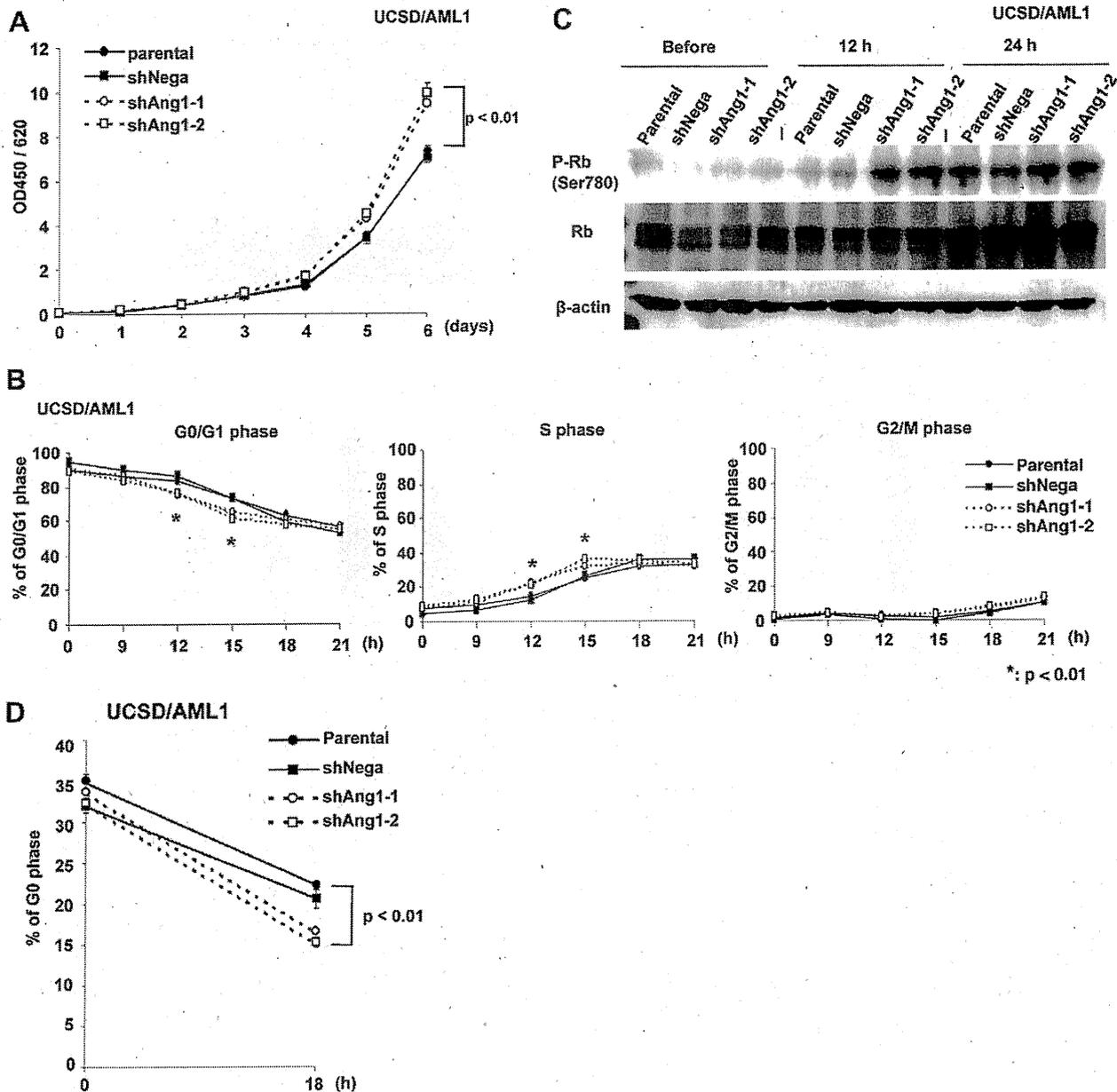


Fig. 3. Ang1 negatively regulates the cell cycle in EVI1^{high} leukemia cells. (A) Effect of Ang1 knockdown on cell proliferation. shRNA against Ang1 was introduced into UCSD/AML1 cells. The proliferation of parental UCSD/AML1 cells, AML1/shNega cells, and AML1/shAng1-1 and -2 cells were examined using a Cell Counting Kit-8. The absorbance at 450 nm was measured by a microplate reader (reference wavelength: 620 nm). The data are presented as the mean \pm s.d. Student's *t*-test was used for statistical analysis. The 0 day sample was an aliquot of the plating suspension. (B) Progression through G0/G1, S, and G2/M phase after stimulation of serum-starved cells. Parental UCSD/AML1 cells, AML1/shNega cells, and AML1/shAng1-1 and -2 cells were grown in serum starvation medium with 0.5% serum for 30 h and then stimulated with 10% FCS and 1 ng/mL hGM-CSF. The cells were collected at each indicated time point after stimulation and analyzed for DNA content using PI staining. The cell cycle profiles were determined using ModFit software. The data are presented as the mean \pm s.d. Student's *t*-test was used for statistical analysis (**p* < 0.01). (C) Western blot analysis of Rb phosphorylation at Ser780. After serum starvation with 0.5% serum for 30 h, the cells were stimulated with 10% FCS and 1 ng/mL hGM-CSF. The cells were collected at each indicated time point after stimulation and used as samples for Western blot analysis. (D) Progression of the cell population from G0 phase after serum stimulation. The cells were grown in serum starvation medium with 0.5% serum for 30 h and then stimulated with 10% FCS and 1 ng/mL hGM-CSF. The cells were stained with anti-Ki-67 antibody and 7-AAD at just before and 18 h after stimulation and then analyzed using flow cytometry. The population of Ki67-negative cells was counted as G0 phase cells. The data are presented as the mean \pm s.d. Student's *t*-test was used for statistical analysis.

expressing shRNA specific for Ang1. Ang1-knockdown cells showed enhanced proliferation compared with parental UCSD/AML1 cells or control AML1/shNega cells (Fig. 3A). Next, to investigate the influence of Ang1 knockdown on cell cycle progression, a series of UCSD/AML1 cell lines were synchronized in G0/G1 by 30 h of serum starvation, restimulated with serum and GM-CSF, and then harvested at the indicated times for cell cycle analysis (Fig. 3B). At 12 h after stimulation with FCS and GM-CSF, the percentage of cell population in G0/G1 phase was lower in the

AML1/shAng1 cells than in control cells, whereas the percentage of S phase cells was higher in the AML1/shAng1 cells at the same point. Because the tumor suppressor protein retinoblastoma (Rb) is a major regulator of the G1/S transition, we evaluated the level of phosphorylated Rb (Ser780) at just before, 12 h after, and 24 h after stimulation of starved cells with FCS and GM-CSF. Western blot analysis clearly showed that high Rb phosphorylation at Ser780 was detectable in AML1/shAng1 cells after 12 h poststimulation (Fig. 3C), whereas the level of Rb phosphorylation increased

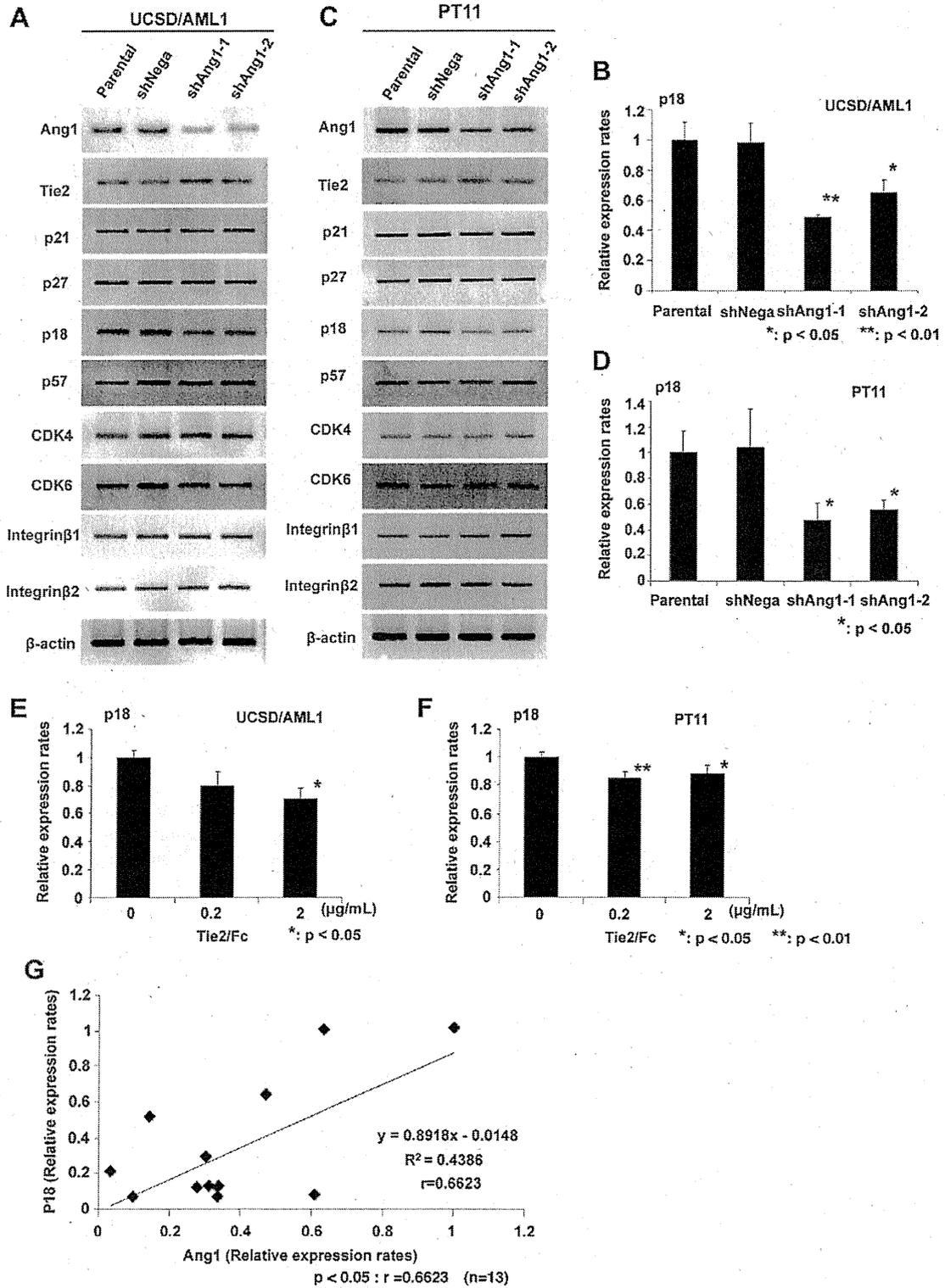


Fig. 4. Ang1 regulates p18 gene expression in EVI1^{high} leukemia cells. (A) Semi-quantitative RT-PCR analysis of Ang1, Tie2, cell cycle regulators, and cell adhesion molecules in parental UCSD/AML1 cells, AML1/shNega cells, and AML1/shAng1-1 and -2 cells. (B) Quantitative real-time RT-PCR analysis of p18 in parental UCSD/AML1 cells, AML1/shNega cells, and AML1/shAng1-1 and -2 cells. The data are presented as relative fold changes compared with the expression in parental UCSD/AML1 cells. The data are expressed as the mean \pm s.d. Student's *t*-test was used for statistical analysis (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). (C) shRNA against Ang1 was introduced into PT11 cells. Semi-quantitative RT-PCR analysis of Ang1, Tie2, cell cycle regulators, and cell adhesion molecules in parental PT11 cells, PT11/shNega cells, and PT11/shAng1-1 and -2 cells. (D) Quantitative real-time RT-PCR analysis of p18 in parental PT11 cells, PT11/shNega cells, and PT11/shAng1-1 and -2 cells. The data are presented as relative fold changes compared with the expression in parental PT11 cells. The data are expressed as the mean \pm s.d. Student's *t*-test was used for statistical analysis (* $p < 0.05$). (E and F) UCSD/AML1 and PT11 were incubated in medium containing Tie2/Fc at the indicated concentrations for 48 h. After incubation, p18 gene expression was analyzed by quantitative real-time RT-PCR. The data are presented as the mean \pm s.d. Student's *t*-test was used for statistical analysis (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). (G) Correlation between the expression levels of Ang1 and p18. The expression levels of Ang1 and p18 in AML patient samples were examined using quantitative real-time RT-PCR analysis. To evaluate the relationship between the expression levels of Ang1 and p18, Pearson's product moment correlation coefficient (*r*) was calculated (n = 13, $p < 0.05$; $r = 0.6623$).