

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

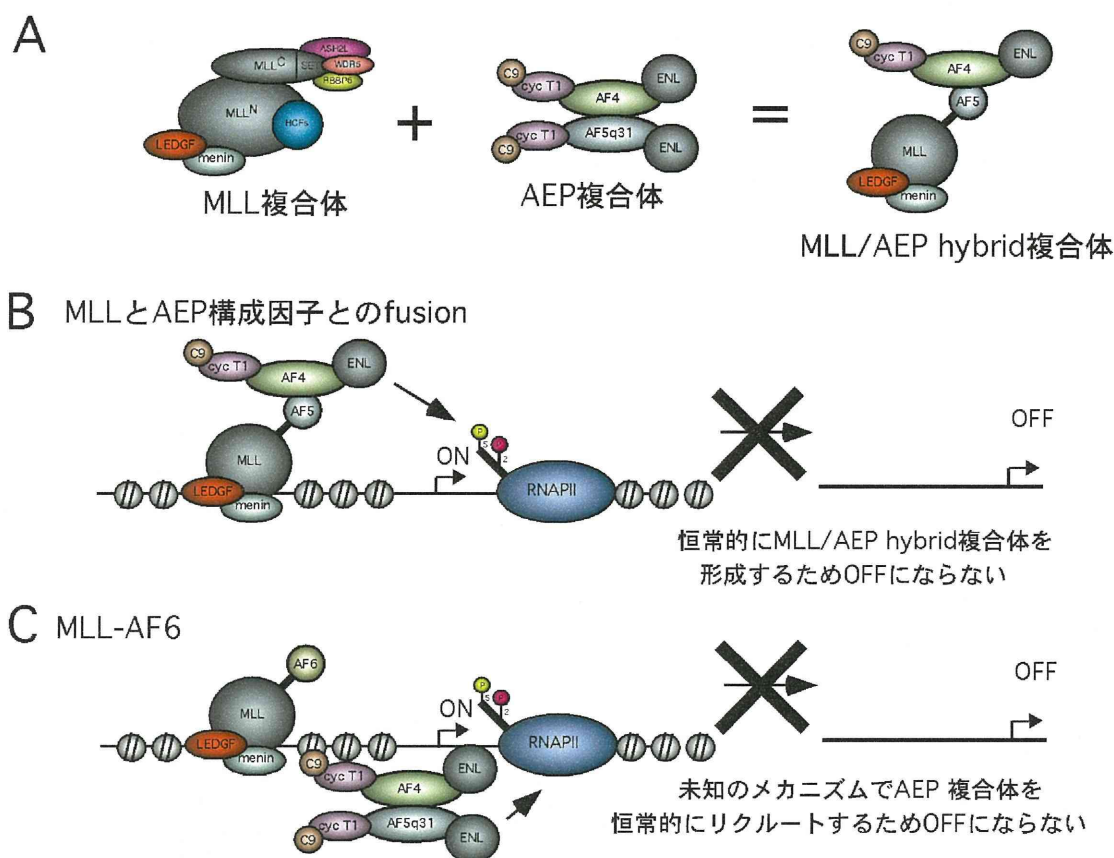


図5 A. MLL/AEP hybrid 複合体
 B. MLL と AEP 複合体構成因子の fusion による恒常的な転写活性化のメカニズム (モデル)
 C. MLL-AF6 による恒常的な転写活性化のメカニズム (モデル)

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 ML2 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 haematological 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, Mizrokhli 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, Hadrj 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.

