

T 細胞性急性リンパ性白血病に認められる NUP98 融合蛋白 の機能解析

名古屋大学大学院

医学系研究科 助教 能浦 三奈

名古屋大学大学院

医学系研究科 教授 早川 文彦

1. 研究の背景・目的

我々の研究グループは、若年成人 T-ALL 患者検体を次世代シーケンサーで網羅的に解析し、*NUP98::BPTF* (NUP98-B) および *NUP98::CCDC28A* (NUP98-C) の 2 種類の NUP98 融合遺伝子を同定した。これらの融合遺伝子は、NUP98 の FG リピートを N 末端に、BPTF の PHD ドメイン (NUP98-B) または CCDC28A の coiled-coil ドメイン (NUP98-C) を C 末端に有する (図 1)。本研究では、これらの融合タンパクによる白血病発症機構の解明を目指す。多くの NUP98 融合タンパクが転写異常を引き起こすことが報告されているため、これらも転写を制御すると仮説を立て、白血病発症に重要な標的遺伝子を探索する。さらに、同定した標的遺伝子が白血病の促進にどのように関与するかを解明し、標的遺伝子またはその経路を阻害する薬剤を探索することで、NUP98 融合遺伝子陽性白血病に対する新たな治療法の開発を目指す。

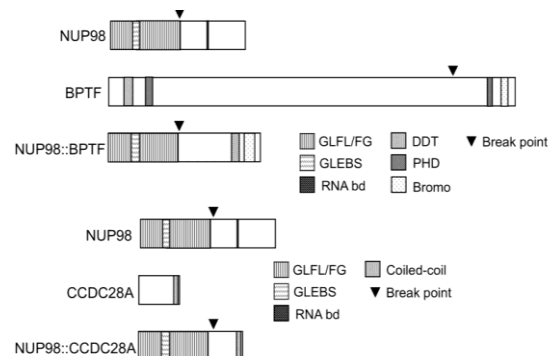


図 1. NUP98-BPTF, NUP98-CCDC28A の構造

2. 研究の対象ならびに方法

① NUP98-B/NUP98-C の細胞形質転換能の評価

NUP98-B/NUP98-C の細胞形質転換能を評価するため、ドキシサイクリン誘導性 NUP98-B/NUP98-C 発現ベクターをマウス繊維芽細胞株 NIH3T3 にそれぞれ導入し、フォーカスフォーメーションアッセイを実施した。

② NUP98-B/NUP98-C の転写活性化能の評価

NUP98 は転写因子ではないが、多くの NUP98 融合タンパクが転写異常を引き起こすことが報告されている。そこで NUP98-B および NUP98-C が転写活性化能を有するか、One-hybrid GAL4-DBD システムを用いて評価した。

③ NUP98-B/NUP98-C の標的遺伝子の探索

これまで多くの NUP98 の融合タンパクが *HOXA* 遺伝子の発現を増加させることが報告されており、*HOXA* 遺伝子の異常発現が白血病発症に重要であると考えられている。そこで NUP98-B および NUP98-C の過剰発現による *HOXA* 遺伝子の発現変化を定量 PCR で確認した。

3. 研究結果

NUP98-B/NUP98-C の細胞形質転換能を評価するため、ドキシサイクリン誘導性 NUP98-B/NUP98-C 発現 NIH3T3 細胞株をそれぞれ樹立した。フォーカスフォーメーションアッセイの結果、NUP98-B または NUP98-C を発現させた NIH3T3 は、どちらも細胞が重なり合った異常な形質転換フォーカスを形成した (図 2)。また NUP98-B/NUP98-C 発現 NIH3T3 細胞では、形質転換した細胞に特徴的な円状および紡錘状の形態を認めた。これより、これらの融合タンパクは細胞形質転換能を有することが明らかになった。

次に、これらの融合タンパクの転写活性能を評価した。

NUP98, BPTF, CCDC28A のいずれも DNA 結合能を持たないため NUP98-B または NUP98-C と GAL4 を fusion 融合したレポーターベクターを作製し、One-hybrid GAL4-DBD システムを用いてルシフェラーゼアッセイを実施した。その結果、どちらの融合タンパクも転写活性を有することが明らかになった (図 3)。

最後に、これらの融合タンパクの標的遺伝子の同定を試みた。多くの NUP98 融合タンパクで *HOXA* 遺伝子の発現増加が報告されており、その中でも *HOXA5*, *HOXA7*, *HOXA9*, *HOXA10* は特に白血病発症に重要と考えられている [1]。NUP98-B/NUP98-C 過剰発現 NIH3T3 細胞においてこれらの *HOXA* 遺伝子と、そのコファクターである *Meis1* の発現量が変化するか qPCR で調べた。NUP98-B ではこれらの遺伝子の発現に変化はみられなかったが (data not shown)、NUP98-C では *HOXA10*

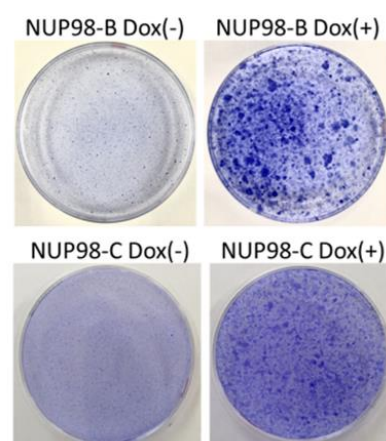


図 2. NUP98-B, NUP98-C による形質転換フォーカスの形成

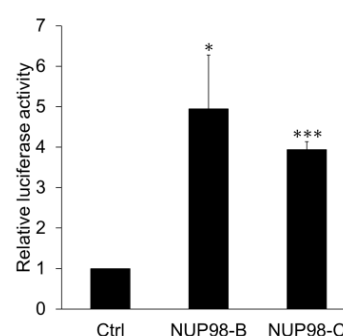


図 3. NUP98-B, NUP98-C の転写活性

の発現が有意に増加した (図 4)。

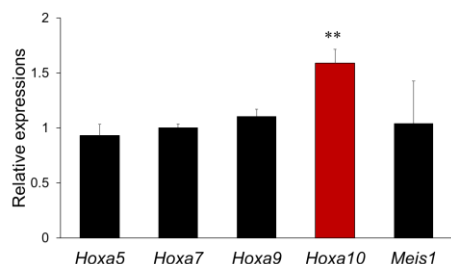


図 4. NUP98-C による *HOXA10* の発現増加

4. 考察

NUP98-B および NUP98-C はどちらも転写活性を有し、細胞形質転換能を有することから、他の多くの NUP98 融合タンパクと同様に、転写異常を引き起こすことで白血病を促進することが示唆された。転写標的については、NUP98-B では *HOXA* 遺伝子の発現増加は認められなかったが、NUP98-C では *HOXA10* の増加が認められた。先行研究において、マウスの造血幹細胞に *HOXA10* を過剰発現させると AML を発症することが報告されており [2]、*HOXA10* の発現増加が NUP98-C による白血病発症に重要である可能性がある。NUP98-B において *HOXA* 遺伝子の発現が増加しなかった理由としては、本検討では NIH3T3 細胞を用いたので、主に血球系細胞に発現する *HOXA* 遺伝子の発現変化が生じにくかったのではないかと推測している。今後、血球系細胞にこれらの融合遺伝子を導入し、*HOXA* 遺伝子の発現変化について再検討するとともに、RNA-seq を用いて *HOXA* 以外の標的遺伝子も探索する予定である。

5. 文献

- [1] Novak RL, Harper DP, Caudell D, Slape C, Beachy SH and Aplan PD. (2012). Gene expression profiling and candidate gene resequencing identifies pathways and mutations important for malignant transformation caused by leukemogenic fusion genes. *Exp Hematol* **40**, 1016-27, doi:10.1016/j.exphem.2012.08.001.
- [2] Thorsteinsdottir U, Sauvageau G, Hough MR, Dragowska W, Lansdorp PM, Lawrence HJ, Largman C and Humphries RK. (1997). Overexpression of *HOXA10* in murine hematopoietic cells perturbs both myeloid and lymphoid differentiation and leads to acute myeloid leukemia. *Mol Cell Biol* **17**, 495-

505, doi:10.1128/mcb.17.1.495.

6. 論文発表

【学会発表】

富田咲花、能浦三奈、安田貴彦、都築忍、早川文彦「NUP98-BPTF は Pim1 発現上昇による悪性形質転換を誘発する」第 86 回日本血液学会 *優秀ポスター賞受賞

【論文】

Noura M, Tomita S, Yasuda T, Tsuzuki S, Kiyoi H, Hayakawa F. NUP98-BPTF promotes oncogenic transformation through PIM1 upregulation. *Cancer Med.* 2024 Jul;13(13):e7445. DOI: 10.1002/cam4.7445.