

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10117

研究課題名(和文) DCKプロモーターの脱メチル化によるネララビン耐性機構の解明と耐性予防法の確立

研究課題名(英文) Analysis of chemo-resistant mechanism through DCK promotor demethylation and establishment of its prevention

研究代表者

岡本 康裕 (Okamoto, Yasuhiro)

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号：30398002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：CCRF-CEM細胞にネララビンを添加し、限界希釈法で培養し、ネララビン耐性株を2つ樹立した。耐性株はMTTアッセイで親株より高いIC50(55倍および78倍)を有していた。耐性株ではネララビン代謝に関連するENT1、DCK、DGUoKのmRNAの発現が有意に低下した。DCKのプロモーター領域の脱メチル化は関与していなかった。耐性株では、p-Aktの発現亢進が認められ、PI3K/AKT経路の発現亢進が示唆された。また、ネララビン処理72時間後にはp-ERKの過剰活性化が見られた。ネララビン代謝経路に特異的なMEK/ERK経路の過剰活性化が耐性化の原因と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ネララビンの薬剤耐性獲得の機序を明らかにした。つまりネララビン投与によって、ネララビン代謝に関連する遺伝子の発現が変化し、代謝経路に特異的なMEK/ERK経路の過剰活性化によってアポトーシスが起らなかった。このような変化は、ネララビンとの共培養で、短時間に、しかも高頻度に起こっていた。難治性のT細胞性腫瘍のほとんどがいずれネララビン耐性を獲得するが、本研究の成果によって、実際の患者におけるネララビン投与において、どのようなdose scheduleで行えば耐性化をより予防できるかがわかり、重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：CCRF-CEM cells were incubated with nelarabine by the limiting dilution method and two nelarabine-resistant clones were established. The resistant clones had higher IC50 (55 and 78 times higher) than the parent clone in the MTT assay. The expressions of ENT1, DCK, and DGUoK mRNAs associated with nelarabine metabolism were significantly down-regulated in resistant clones; demethylation of the promoter region of DCK was not involved. The resistant clones showed increased expression of p-Akt, suggesting increased expression of the PI3K/AKT pathway. In addition, p-ERK hyperactivation was observed after 72 hours of nelarabine treatment. Overactivation of the MEK/ERK pathway specific to the nelarabine metabolic pathway was thought to be the cause of resistance.

研究分野：小児がん

キーワード：ネララビン 耐性 急性リンパ性白血病 T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

白血病・リンパ腫の治療成績は向上しているが、依然として T 細胞性白血病・リンパ腫の成績は劣っている。このため T 細胞性白血病・リンパ腫に特異的に効果を示すネララビンが開発され、現在進行中の臨床試験でも、キードラッグとして治療に用いられている。再発した T 細胞性白血病に対するネララビン単剤投与の寛解導入率は 10 ~ 30% である。しかし、ネララビンは繰り返しかえし投与すると、いずれ必ず無効となる。つまり、治療経過において白血病細胞が耐性を獲得してしまうことが問題である。ネララビンは、ヌクレオシド輸送体を介して白血病細胞内に移送され、活性化体の 9-β-D-アラビノフラノシルグアニン(ara-GTP)に変換される。Ara-GTP は、DNA ポリメラーゼを阻害し、白血病細胞の apoptosis を誘導する。耐性のメカニズムを知るために、まず私たちは、ネララビンの代謝経路に注目して、ネララビンの代謝に関連する 6 つの遺伝子の発現を細胞株および患者検体で調べた。個々の遺伝子の発現は、ネララビンに対する薬剤感受性とは相関しなかった。しかし、ara-GTP の代謝に関連する 4 つの遺伝子発現のバランス(ENT × DCK / CDA × RRM1)は、ネララビンの薬剤感受性と有意に逆相関することを、細胞株および、患者の腫瘍細胞において見出した。私たちはネララビン耐性化にも、これらの代謝経路が関連していると考えた。そこで、再発した T-ALL に対してネララビンを使用し、初期は著効し寛解となったが、その後治療耐性となった症例を用いて検討した。この例では、DCK のプロモーター領域が、ネララビンに感受性のある時には正常にメチル化されているが、ネララビンに耐性となった時点では脱メチル化されていることを突き止めた。DCK は ara-GTP を増加させる方向に働くので、DCK のプロモーター領域の脱メチル化によって DCK の発現が低下したことが、本例でのネララビン耐性化の機序であると推定された。悪性腫瘍を殺傷する目的で投与された薬剤というストレスから逃れる機構として、正常細胞がメチル化の状態を変化させる防衛機構が働いている可能性がある。つまり、正常細胞の持つ防御機構が、異常細胞の薬剤の耐性化に関与している可能性がある。

2. 研究の目的

- (1) ネララビンの代謝ストレスが、脱メチル化を引き起こすことを明らかにする。つまり、ネララビンとの共培養によって、細胞株の DCK のプロモーター領域の脱メチル化が誘導されることを証明する。
- (2) DCK プロモーターが脱メチル化した患者腫瘍細胞を株化し、DCK の発現低下すること、その結果、ネララビンの最終産物である ara-GTP の低下およびネララビンの細胞毒性が低下することを明らかにする。
- (3) この細胞株に脱メチル化していないプロモーターを組み込んだベクターを発現させることで、表現型が救済されること、すなわち DCK の発現が増加すること、ara-GTP 濃度が増加すること、ネララビンに対する薬剤感受性を再獲得することを示す。
- (4) 脱メチル化阻害剤を用いた培養条件では、細胞株が DCK のプロモーターの脱メチル化によってネララビン耐性とならないことを明らかにする。

3. 研究の方法

まず、細胞株(CCRF-CEM 細胞)にネララビンを添加し、限界希釈法で培養し、ネララビン耐性株を樹立する。

MTT アッセイを行い、耐性であることを確認する。
耐性株ではネララビン代謝に関連する遺伝子の発現を検討する。
DCK プロモーターの変異解析をする。
ウエスタンブロット解析で蛋白の発現を検討する。
耐性株のアポトーシスについて評価する。
耐性株がその他の抗がん剤に感受性かどうか確認する。

4. 研究成果

CCRF-CEM 細胞からネララビン濃度を増加させたサブカルチャーを繰り返し、限界希釈法で培養することにより、ネララビン耐性サブクローン Clone1 と Clone2 を樹立した。MTT アッセイでは、耐性サブクローンがネララビン処理下でより高い生存率を有し、元の CCRF-CEM 細胞よりも高い IC50 を有することを実証した。相対的な耐性は感受性細胞株の 55 倍および 78 倍であった。これらの細胞株は、ARA-G 処理でも同等の生存性を示した。

ネララビン代謝に関連するいくつかの遺伝子を調べ、感受性細胞と耐性細胞の遺伝子発現の違いを調べた。ENT1, DCK, DGUO1 遺伝子の発現は耐性細胞で有意に発現が低下したが、RRM1, NT5C2 遺伝子の発現には有意な差は認められなかった。また、クローン 1 とクローン 2 の遺伝子発現には有意差は認められなかった。DCK のプロモーター領域にはいずれにクローンでも異常を認めなかった。

ウエスタンブロット解析では、クローン 1 およびクローン 2 の DGUO1, DCK および ENT1 タンパク質の発現が低下しており、mRNA の発現との間に相関が見られた。SAMHD1 は、ネララビンの代謝に関与し、三リン酸化ヌクレオシド類似体を切断することで耐性化することが明らかになっている。耐性サブクローンでは、感度の高い CCRF-CEM よりも SAMHD1 の発現が高いことが明らかになった。

ネララビンは Ara-GTP として DNA に取り込まれ、DNA の断片化を引き起こし、細胞のアポトーシスを引き起こすと考えられている。本研究では、10 μ M ネララビンを 72 時間投与した後、アポトーシスマーカーとしてカスパーゼ 3/7 活性を示す発光シグナルの有意な増加を検出した。耐性クローンではカスパーゼ活性の増加を示さなかった。耐性クローンのアポトーシスの抑制は、より高用量 (100 μ M) のネララビン処理後にも観察された。

Bcl2 ファミリーに属するアポトーシスに関連するいくつかの遺伝子を、ネララビン添加前と 10 μ M ネララビン処理後においてリアルタイム PCR で調べた。CCRF-CEM、Clone1、Clone2 の Bcl2, Bcl2L1, Bad, BAX の添加前のレベルには有意な差は見られなかったが、10 μ M のネララビンを 72 時間添加培養した後には Bcl2, Bad および BAX の増加が見られ、

シグナル伝達経路の異常な活性化は、化学療法に対する白血病細胞の感受性に影響を与えることが知られている。細胞の生存と薬剤耐性に影響を与えるシグナル伝達経路として、PI3K/AKT および MEK/ERK1/2 経路の状態を検討した。CCRF-CEM、クローン 1 およびクローン 2 を 10 μ M のネララビンで 0, 6, 24, 48, 72 時間処理した後、ウエスタンブロットで分析し、PI3K/AKT および MEK/ERK 経路の活性化を確認した。耐性サブクローンは、ネララビン添加前では p-Akt と p-ERK の発現が高かった。CCRF-CEM における p-Akt の発現は、ネララビン投与後に時間依存的に減少した。

一方、クローン 1 とクローン 2 では、p-Akt の発現亢進が認められ、PI3K/AKT 経路の発現亢進が示唆された。また、ネララビン添加培養の 72 時間後には p-ERK の過剰活性化が観察され、MEK/ERK 経路の過剰活性化が示唆された。これらの結果から、ネララビンの薬剤耐性にはシグナル伝達カスケードが関与していることが示唆された。耐性サブクローンが他の抗がん剤に対して交差耐性であるかどうかを調べるために、ダウノルビシン、ビンクリスチン、シタラビン、エトポシドなどのいくつかの化学療法薬に細胞を培養した。細胞を様々な用量の薬剤で 72 時間インキュベートし、細胞毒性を分析するために MTT アッセイを行った。細胞は、ダウノルビシン、ビンクリスチンおよびエトポシドに対して感受性を示したが、耐性サブクローンは、ヌクレオシドアナログに属するシタラビンに対して交差耐性を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kurauchi Koichiro, Nishikawa Takuro, Miyahara Emiko, Okamoto Yasuhiro, Kawano Yoshifumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Role of metabolites of cyclophosphamide in cardiotoxicity	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BMC Research Notes	6. 最初と最後の頁 406
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13104-017-2726-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Seki Yuko, Okamoto Yasuhiro, Kodama Yuichi, Nishikawa Takuro, Tanabe Takayuki, Nakagawa Shunsuke, Mizota Michiyo, Kawano Yoshifumi	4. 巻 40
2. 論文標題 Risk Factors and the Prevention of Weight Gain During Induction Chemotherapy in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Hematology and Oncology	6. 最初と最後の頁 e334 ~ e337
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MPH.0000000000001098	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakagawa Shunsuke, Okamoto Yasuhiro, Kodama Yuichi, Nishikawa Takuro, Tanabe Takayuki, Kawano Yoshifumi	4. 巻 40
2. 論文標題 Thiamylal Plus Pentazocine Shows Similar Efficacy as Ketamine Plus Midazolam for Painful Procedures in Children With Leukemia	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Hematology and Oncology	6. 最初と最後の頁 e263 ~ 2265
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MPH.0000000000001053	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okamoto Yasuhiro, Kodama Yuichi, Nishikawa Takuro, Rindiarti Almitra, Tanabe Takayuki, Nakagawa Shunsuke, Yoshioka Takako, Takumi Koji, Kaji Tatsuru, Kawano Yoshifumi	4. 巻 34
2. 論文標題 Persistent positive metaiodobenzylguanidine scans after autologous peripheral blood stem cell transplantation may indicate maturation of stage 4 neuroblastoma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pediatric Hematology and Oncology	6. 最初と最後の頁 157 ~ 164
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/08880018.2017.1348414	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kodama Yuichi, Okamoto Yasuhiro, Kubota Tomohiro, Hiroshima Yoshifumi, Fukami Hiroshi, Matsushita Kensuke, Kawano Yoshifumi	4. 巻 39
2. 論文標題 Effectiveness of vitamin K2 on osteoporosis in adults with cerebral palsy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Brain and Development	6. 最初と最後の頁 846 ~ 850
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.braindev.2017.05.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yanagimoto K, Okamoto Y, Kodama Y, Nishikawa T, Tanabe T, Kawano Y	4. 巻 39
2. 論文標題 Decrease of Cardiac Base Rotation in 2D Speckle Tracking Indicates Drug-induced Cardiomyopathy After Chemotherapy in Children With Cancer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Hematology and Oncology	6. 最初と最後の頁 10 ~ 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yatsushiro Yuki, Nishikawa Takuro, Saito Aki, Nakazawa Yozo, Imadome Ken-Ichi, Nakagawa Shunsuke, Kodama Yuichi, Okamoto Yasuhiro, Kanegane Hirokazu, Kawano Yoshifumi	4. 巻 41
2. 論文標題 Epstein-Barr Virus (EBV)-induced B-cell Lymphoproliferative Disorder Mimicking the Recurrence of EBV-associated Hemophagocytic Lymphohistiocytosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Hematology and Oncology	6. 最初と最後の頁 e44 ~ e46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MPH.0000000000001075	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ikeda Naohiro, Maruyama Shinsuke, Nakano Kanna, Imakiire Ryo, Ninomiya Yumiko, Seki Shunji, Yanagimoto Kosuke, Kakihana Yasuyuki, Hara Keiichi, Tajima Go, Okamoto Yasuhiro, Kawano Yoshifumi	4. 巻 11
2. 論文標題 A surviving 24-month-old patient with neonatal-onset carnitine palmitoyltransferase II deficiency	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Genetics and Metabolism Reports	6. 最初と最後の頁 69 ~ 71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygmgr.2017.04.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Okamoto Y
2. 発表標題 Update from the Japan Pediatric Leukaemia/Lymphoma Study Group (JPLSG)
3. 学会等名 St Jude-VIVA Forum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岡本康裕
2. 発表標題 ダウン症に合併した急性リンパ性白血病
3. 学会等名 第59回日本小児血液・がん学会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考