

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18591201
 研究課題名（和文） 難治性小児白血病におけるアポトーシス抑制蛋白 SURVIVIN の発現機構の解明
 研究課題名（英文） Mechanisms for expression of antiapoptotic protein survivin in refractory childhood leukemia
 研究代表者
 黒澤 秀光 (KUROSAWA HIDEMITSU)
 獨協医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：10205239

研究成果の概要：

難治性 17;19 転座白血病(t(17;19)⁺ALL)でアポトーシス抑制因子 survivin が高発現している。この t(17;19)⁺ALL における survivin 発現機構とアポトーシス抑制機構について解析を実施した。siRNA 法を用いた survivin のノックダウンでは t(17;19)⁺ALL 特異的にアポトーシスが誘導できた。survivin は caspase 依存性と非依存性の坑アポトーシス抑制機構が存在する。t(17;19)⁺ALL では主に後者が関与していることを証明した。また、その主な作用機序として AIF の核内移行の抑制を確認しているが、AIF をノックダウンすると survivin 機能を抑制してもアポトーシスが抑制することを証明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：小児血液学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：E2A-HLF, t(17;19)ALL, survivin, AIF, caspase independent apoptosis

1. 研究開始当初の背景

小児急性リンパ性白血病(ALL)で難治性のt(17;19)⁺ALLにおいて生じる融合転写因子E2A-HLFについて研究を続けている。私は平成16年より平成17年にかけて科学研究費で‘E2A-HLFキメラ転写因子の抗アポトーシス機能を有する標的遺伝子の同定’という研究課題でE2A-HLFの下流遺伝子としてsurvivi

nを同定した。t(17;19)⁺ALLにおいてsurvivin発現が一様に高発現していることを見出した。この発現がt(17;19)の結果生ずるE2A-HLF融合転写因子により転写誘導されていること、その発現が細胞周期とは無関係であること、survivinのドミナントネガティブ蛋白をt(17;19)⁺ALLに誘導することで

アポトーシスが誘導されることより t(17;19)⁺ALL は survivin の高発現が白血病化に重要であることが予想された。更にプロモーターアッセイの結果は E2A-HLF 融合転写因子が survivin のプロモーター領域の cell cycle gene homology region (CHR) に結合する転写抑制因子を阻害することにより生じると予測した。Survivin はアポトーシス抑制因子で IAP ファミリーに属し、細胞周期特に M 期特異的に発現し正常細胞では発現せず、ほとんどのがん細胞で発現しており、その発現量が予後に関連することが知られている (Altieri DC. Nature Reviews. Cancer. 3:46-54, 2003)。Survivin の発現様式は本来細胞周期 G₁S で発現が抑制され、G₂M 期に発現が誘導される。このような発現様式を示す遺伝子は survivin の他、cdc2、cyclin B1、cyclin A2、cdc20 などが知られているが、いずれもプロモーター領域に Cell cycle dependent element (CDE) と cell cycle gene homology region (CHR) 領域を有していて、この領域に結合する転写抑制因子より細胞周期特異的な発現が生じている。CHR に結合し、細胞周期 G₁S で発現を抑制する転写調節因子はきわめて重要と考えられるが、現在までのところ同定されていない。

2. 研究の目的

(1) t(17;19)⁺ALL における survivin によるアポトーシス抑制機構の解明

t(17;19)⁺ALL はアポトーシスが抑制することで白血病化することは証明されている。この抗アポトーシス作用が survivin により生じていることを更に証明するために t(17;19)⁺ALL の survivin をノックダウンして表現型を確認する。

(2) survivin-AIF 抗アポトーシス機構の解明
survivin は caspase 依存性と caspase 非依存性にアポトーシスを抑制することが知られ

ている。t(17;19)⁺ALL においては後者が主な抗アポトーシス経路であること。その主な作用分子が AIF であり、survivin がその核内移行を抑制することでアポトーシスを抑制することを証明している。そこで t(17;19)⁺ALL に survivin ドミナントネガティブを発現誘導できる細胞株で AIF をノックダウンして表現型を確認する。

(3) t(17;19)⁺ALL における細胞周期非依存的高発現の機序解明

survivin は細胞周期 G₂M 特異的に発現している。survivin プロモーターには細胞周期依存性領域 CHR と CDE が存在するが、ルシフェラーゼ法により E2A-HLF の survivin 発現誘導は CHR を介することが予想されていた。CHR の変異体を用いると著しく活性が低下することからプロモーターの CHR が E2A-HLF の survivin 発現誘導に重要であることが予想された。CHR であることの確定をする。

(4) 細胞周期 G₁S で発現を抑制する転写因子の同定

survivin のプロモーターに E2A-HLF の consensus sequence “GTTACGTAAT”を見出すことはできなかった。このことから E2A-HLF はダイレクトに survivin のプロモーターへ結合して survivin の発現を誘導はしていない。ルシフェラーゼアッセイ法で E2A-HLF が CHR に特異的に結合する転写抑制因子“X”を発現誘導することで、細胞周期非依存的に survivin が発現誘導しているのではないかと予測していた。この転写抑制因子“X”の同定をおこなった。

(5) t(17;19)⁺ALL 細胞株の survivin プロモーター領域多型の検索

CHR 近傍-31 の多型で C→G が細胞周期非依存的高発現に関与することが同定されており (Yong Xu et al. DNA and Cell Biology 23: 527-537, 2004)、-31 を含めたプロモーター

領域特にCHRとCDE領域のシーケンスを実施し、この多型とt(17;19)⁺ALL高発現の関係を検討した。

(6) bcr-abl融合転写因子における survivin の発現機構の解明

t(9;22)⁺ALL細胞が survivinが高発現していることを確認しており bcr-abl の survivin発現機構を解明したい。

3. 研究の方法

(1) Nalm6/E2A-HLF細胞株の作製

t(17;19)⁻ALL細胞株(Nalm6)にZnにより発現誘導するpMT-CB6⁺にE2A-HLFを組み込んだプラスミドをエレクトロポレーション法にて導入した。この細胞株をNalm6/E2A-HLFと名付けた。Nalm6/E2A-HLFは100 μM ZnにてE2A-HLFを発現誘導すると survivinの発現も増加する。

(2) UOC-B1/survive-dn細胞株の作製

t(17;19)⁺ALL細胞株(UOC-B1)に Znにより発現誘導するpMT-CB6⁺に survivin のリン酸化部位の欠失した変異体Thr34→Ala (survivin-dn)を組み込んだプラスミドをエレクトロポレーション法にて導入した。この細胞株をUOC-B1/survive-dnと名付けた。UOC-B1/survive-dnは100 μM Znにて survivin-dnが誘導する。

(3) 細胞生存率および細胞死の評価

アポトーシスは AnnexinV-FITC を用いてフローサイトメトリー法で解析した。Caspase 阻害剤は 20 μM z-VAD-fmk (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA) を使用した。Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end-labeling (TUNEL) は Apo-BrdU TUNEL Assay kit (Molecular Probes, Eugene, OR) を用いてフローサイトメトリー法で測定した。

(4) RNA干渉法 (small interfering RNA:

siRNA) を用いた loss of function 法

Lenti lox3.7 plasmid (pLL 3.7) はマウス U6 プロモーター下に標的遺伝子 siRNA の oligonucleotide と CMV プロモーター下に GFP 発現する。293FT 細胞に pLL3.7 と packaging vector を cotransfection し生じた lentivirus particle を標的細胞に感染させる。GFP 陽性な感染細胞をフローサイトメーターで sorting して発現解析を行った。survivin の siRNA oligonucleotides (Gu et al. Knockdown of survivin gene by vector-based short hairpin RNA technique induces apoptosis and growth inhibition in burkitt's lymphoma raji cell line. Neoplasma 53:206-212, 2006) と AIF siRNA oligonucleotides を作成した。標的細胞は survivin siRNA が t(17;19)⁺ALL 細胞株 (UOC-B1, Endo-kun)、対照に t(17;19)⁻ALL 細胞株 (REH) を、AIF siRNA は t(17;19)⁺ALL に survivin ドミナントネガティブを pMT-CB6⁺ 発現誘導できる細胞株 (UOC-B1/dn-survivin) を用いた。

(5) Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

EMSA は定法にて実施した。Nalm6/E2A-HLF 細胞株と Zn 100 μM を培養液中に加えて E2A-HLF を発現させた時の nuclear protein lysates を用いた。survivin のプロモーターの CHR binding site を含む oligonucleotide probe (5' -CATTAACCGCCAGATTTGAATCGCGG-3') を P³² でラベルした。inhibition として過剰に CHR probe のノンラベルか、CHR 3-bp mismatched oligonucleotide (5' -CATTAACCGCCAGAcccGAATCGCGG-3') を加えた。

(6) エルトリエーション

カウンター・フロー・セントリフューガル・エルトリエーション (CFE) 法は SRR6Y エルトリエーションシステムと 4.5ml チャンバーを用いた (Hitachi Koki, Tokyo, Japan)。白血

病細胞株 $1-2 \times 10^8$ 細胞を 1%FBS 入り PBS 50ml に浮遊し、 4°C にてローター速度 2000rpm で流速 $16 \sim 28\text{ml}/\text{min}$ で分画した。細胞周期は propidium iodide (PI) 染色しフローサイトメトリー法にて測定した。

(7) 免疫沈降

Nalm6/E2A-HLF 細胞株の培養液に Zn^+/Zn^- で 24 時間培養を実施し、エルトリエーター法を用いて細胞周期 G0/G1 を分画する。Cell lysates を作成し、survivin 抗体にて免疫沈降を実施した。得られた蛋白を電気泳動して分画して Zn^+/Zn^- の差を評価した。

4. 研究成果

(1) $t(17;19)^+ \text{ALL}$ における survivin によるアポトーシス抑制機構の解明

すでに UOC-B1/survive-dn 細胞株に Zn を添加して survivin-dn 誘導すると著明にアポトーシスが生じることを見出している。また、survivin 高発現している $t(17;19)^- \text{ALL}$ 細胞株 (REH) に誘導しないという結果が得られている。この現象を確認するためにレンチウイルスベクター-siRNA 法を用いた survivin のノックダウンを実施した。結果は survivin-dn で得られた結果を同様で、 $t(17;19)^+ \text{ALL}$ (UOC-B1、Endo-kun) では著明なアポトーシスが生じるが、REH では生じなかった。以上の結果は $t(17;19)^+ \text{ALL}$ において survivin が白血病化に重要であることを示し、 $t(17;19)^- \text{ALL}$ 細胞株では survivin が白血病化に重要ではないか、survivin が抑制されても他の分子がその機能を代償していることを示している。

(2) survivin-AIF 抗アポトーシス機構の解明
 $t(17;19)^+ \text{ALL}$ において survivin は caspase 非依存性にアポトーシスを抑制する。その機序が survivin がミトコンドリアに局在する caspase 非依存性にアポトーシス誘導因子 AIF の核内移行を抑制するためであるという

結果は得られていた。そこで UOC-B1/survive-dn 細胞株にレンチウイルスベクター-siRNA 法を用いた AIF のノックダウンを実施した。AIF をノックダウンすると UOC-B1/survive-dn 細胞株に Zn を添加し survivin-dn を誘導してもアポトーシスは生じなかった。以上より $t(17;19)^+ \text{ALL}$ において survivin-AIF パスウェイが白血病化に重要であることを示している。

(3) $t(17;19)^+ \text{ALL}$ 細胞株の survivin プロモーター領域多型の検索 EMSA

4 種類の $t(17;19)^+ \text{ALL}$ において survivin の initial codon より 288bp 上流までの sequence を確認した。2 種類が -31 が C の homozygous で 2 種類が G の homozygous であった。他には変異の確認はできなかった。以上の結果は $t(17;19)^+ \text{ALL}$ の細胞周期非依存的発現においては CHR 近傍 -31 の多型で C \rightarrow G は無関係であることが示唆された。

(4) EMSA

CHR probe/protein complexes が 2 つ確認できた。多量の Cold competitor にてこのバンドは消失し、cold CHR の変位 probe では消失しなかった。また、CHR 変異を probe とした場合、バンドは確認できなかった。これらの結果は転写因子 "X" と CHR の特異的な複合体の存在を示している。さらに、Zn にて E2A-HLF を誘導すると 2 本のバンドのうちゆっくり流れているバンドは薄くなった。以上の結果は E2A-HLF が CHR silencer を介して survivin の発現を誘導していることを示している。

(5) 細胞周期 G_1/S で発現を抑制する転写因子の同定

免疫沈降法を用いて E2A-HLF 下流転写抑制因子 "X" の同定を試みた。E2A-HL の誘導時間等の変更を行ったが特異的なバンドの検出ができず、現在実験を継続中である。

(6) bcr-abl融合転写因子における survivin の発現機構の解明

t(9;22)+ALL細胞の6株を入手して、survivin の発現をreal-time法で検討した。高発現する細胞株3株と発現はするが低発現な株3株に分かれた。CMLにおける survivin発現は chronic phaseで低発現、accelerated phaseとblastic crisisで高発現することが知られている。t(9;22)+ALL細胞では survivin の発現がheterogeneousであることの意義を検討中である。

E2A-HLFは survivinのプロモーターのCHRに結合する転写抑制因子を抑え細胞周期非特依存性に高発現し、ミトコンドリアに局在するAIFの核内移行を抑制することで抗アポトーシス機能を獲得した。このことがt(17;19)+ALL細胞の白血病化強く関与することが示唆された。Survivinはがん細胞特異的に発現し正常成熟細胞には発現しないとされてきた。最近、造血幹細胞をはじめとする人のいくつかの細胞で発現が確認されているが、動物実験で survivin の抑制をしても大きな副作用は確認されていない。今後Survivinの標的治療が、この極めて予後不良なt(17;19)白血病の治療に有効な可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

① Kurosawa H, Suzumura H, Okuya M, Fukushima K, Sugita K, Toshio F, Morishita E, Yoshioka A, Takamiya O, Arisaka O. Hemostatic management of surgery for imperforate anus in a patient with 13q deletion syndrome with combined deficiency of factors VII and X. Haemophilia 15: 398-400, 2009. 査読有

② Matsunaga T, Kurosawa H, Okuya M, Nakajima D, Hagisawa S, Sato Y, Fukushima K, Sugita K, Arisaka O. Chronic active Epstein-Barr virus infection with mosquito allergy successfully treated with reduced intensity unrelated allogeneic bone marrow transplantation in a boy. Pediatric Transplantation, 13:231-234 2009. 査読有

③ Shinjyo T, Kurosawa H, Miyagi J, Ohama K, Masuda M, Matsui H, Inaba T, Furukawa Y, and Takasu N. Oncogenic ras regulates survivin expression via mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol-3 kinase in mouse interleukin-3 dependent hematopoietic Baf-3 cells. Tohoku Journal of Experimental Medicine 216:25-34, 2008. 査読有

④ Yabe M, Sako M, Yabe H, Osugi Y, Kurosawa H, Nara T, Tokuyama M, Adachi S, Kobayashi C, Yanagimachi M, Ohtsuka Y, Nakazawa Y, Ogawa C, Atsushi M, Kojima S and Nakahata T for a Japanese Childhood MDS Study Group. A conditioning regimen of busulfan, fludarabine, and melphalan for allogeneic stem cell transplantation in children with juvenile myelomonocytic leukemia. Pediatric Transplantation 12:862-867, 2008. 査読有

⑤ Sugita K, Maruo Y, Kurosawa H, Tsuchioka A, Fujiwara T, Mori A, Ideguchi H, Eguchi M. Sever hyperbilirubinemia in a 10-year-old girl with combined disorder of

hereditary spherocytosis syndrome. *Pediatr Int* 49:540-542, 2007. 査読有

- ⑥ Inukai T, Hirose K, Inaba T, Kurosawa H, Hama A, Inada H, Chin M, Nagatoshi Y, Ohtsuka Y, Oda M, H Goto H, Endo M, Morimoto A, Imaizumi M, Kawamura N, Miyajima Y, Ohtake M, Miyaji R, Saito M, Tawa A, Yanai F, Goi K, Nakazawa S, Sugita K. Hypercalcemia in childhood acute lymphoblastic leukemia: frequent implication of parathyroid hormone-related peptide and E2A-HLF from translocation 17;19. *Leukemia* 21:288 -296, 2007. 査読有
- ⑦ Kurosawa H, Matsunaga T, Shimura N, Nakajima D, Hagiwara S, Fukushima K, Sugita K, Kim P, Arisaka O. Successfully treated acute lymphoblastic leukemia associated with craniopharyngioma. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 29:416-419, 2007. 査読有
- ⑧ Nitta A, Suzumura H, Watabe Y, Okuya M, Nakajima D, Kurosawa H, Sugita K, Arisaka O. Fetal hemophagocytic lymphohistiocytosis in a premature infant. *J Pediatr* 151:98, 2007. 査読有

[学会発表] (計5件)

- ① 犬飼岳史、滝智彦、小野厚、西村慎一郎、渡辺輝浩、小川淳、塩崎順子、康勝好、黒澤秀光、稲葉俊哉、広瀬衣子、黒田格、合井久美子、加賀美恵子、杉田莞爾 高カルシウム血症を合併した急性リンパ性白血病における17:19転座のスクリーニング。第50回日本小児血液学会2008年11月14日~16日。幕張
- ② 黒澤秀光、奥谷真由子、菊地次郎、古川

雄祐、犬飼岳史、安芸大輔、松井啓隆、稲葉俊哉、松下卓、佐藤雄也、萩澤進、福島啓太郎、杉田憲一、有阪治 17;19 転座型ALLにおけるcaspase非依存性細胞死抑制。第70回日本血液学会 2008年10月10日~12日。京都

- ③ Zhang X, Inukai T, Akahane K, Hirose K, Kuroda I, Honna H, Goi K, Kagami K, Inaba T, Kurosawa H, Goto H, Endo M, Yagita H, A. T Look, Sugita K. Induction of Death Receptors for TRAIL, a Cytotoxic Factor for GVL Effect, by Oncogenic Fusion E2A-HLF Derived from t(17;19)-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. ASH meeting Nov 2007, Atlanta
- ④ 黒澤秀光、松永貴之、奥谷真由子、福島啓太郎、杉田憲一、犬飼岳史、稲葉俊哉、遠藤幹也、後藤裕明、有阪治。17;19 転座ALLの高カルシウム血症はE2A-HLFによるPTHrPの発現誘導による。第69回日本血液学会・第49回日本臨床血液学会合同総会。2007年10月横浜
- ⑤ 犬飼岳史、永利義久、大塚欣敏、稲田浩子、後藤裕明、遠藤幹也、中村こずえ、黒澤秀光、稲葉俊哉、廣瀬衣子、合井久美子、杉田完爾。17;19 転座型球性リンパ性白血病の臨床像。第49回日本小児血液学会・第23回日本小児がん学会学術集会。2007年12月仙台

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
黒澤 秀光 (KUROAWA HIDEMITSU)
獨協医科大学・医学部・准教授
研究者番号：18591201
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし