

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15411

研究課題名（和文）急性骨髄性白血病の酸化ストレス経路の分子機構の解明と新規治療法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of molecular mechanisms of oxidative stress pathways in acute myeloid leukemia and development of novel therapeutic strategies

研究代表者

後藤 七海（Gotoh, Nanami）

群馬大学・大学院保健学研究科・助教

研究者番号：80782482

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：酸化ストレスと関係の深いDNA修復経路のひとつである、塩基除去修復に着目し、急性骨髄性白血病(AML)の病態との関係について研究を実施した。塩基除去修復遺伝子はいずれもAML患者骨髄で高発現であり、中でも、APE1が著明に高発現であった。そこで、APE1のknockdownおよびknockout株を作製した。APE1の発現を抑制すると、AML細胞の増殖は有意に減少した。特にknockout株での増殖抑制は顕著であり、APE1がAML細胞の増殖に必要であることが示唆された。従って、APE1高発現がAML細胞の生存に有利に働くことにより、AMLの悪性化に寄与している可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AMLにおけるAPE1 knockout株の樹立は、我々が知る限りでは未だ報告がない。このため、AMLの病態、特に難治化に対するAPE1の機能的意義について新たな知見が得られると期待される。また、APE1 knockoutによりAML細胞の増殖が著しく抑制されることから、AMLの増殖・生存において、APE1が必要であることがわかった。これらの知見をさらに発展させることにより、APE1という新たな分子を標的としたAMLの治療戦略に結び付けられると考える。

研究成果の概要（英文）：We focused on base excision repair, a DNA repair pathway closely related to oxidative stress, and studied its relationship to the pathogenesis of acute myeloid leukemia (AML). All of the base excision repair genes were highly expressed in the bone marrow of AML patients, with APE1 being the most prominent. Inhibition of APE1 expression significantly reduced the proliferation of AML cells, especially in the knockout strain. The suppression of proliferation was particularly pronounced in the knockout strain, suggesting that APE1 is required for AML cell proliferation. Therefore, it is possible that high APE1 expression contributes to AML malignancy by favoring AML cell survival.

研究分野：病態検査学

キーワード：急性骨髄性白血病 酸化ストレス DNA修復 APE1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病(AML)の再発には酸化ストレスが関与していることが近年報告された。私たちは酸化ストレスで誘導される塩基除去修復遺伝子に着目し、APE1 や OGG1 が AML の増殖や再発などに関与することを明らかにした。本研究では、これらの成果を発展させると共に「酸化ストレスによる DNA 損傷応答が AML の難治化に関与する」という研究仮説を立て、研究を実施した。

2. 研究の目的

酸化ストレスと関係の深い、塩基除去修復遺伝子に着目し、AML の病態との関わりを明らかにすることで、新たな治療戦略に結び付けることを目的とする。

3. 研究の方法

AML 細胞株・患者骨髄検体における、塩基除去修復遺伝子の mRNA 発現検討

AML 細胞株 6 種、患者骨髄検体 36 例と、対照骨髄検体(骨髄浸潤のない悪性リンパ腫患者骨髄)の塩基除去修復遺伝子発現を real-time PCR で比較した。

APE1 に対する knockdown 株の作製および表現型の解析

HL60 に対し、レンチウイルスベクターで APE1 knockdown 株を作製し、細胞増殖、細胞周期、細胞増殖に関わる経路の応答について検討した。

APE1 に対する knockout 株の作製および表現型の解析

HL60 に対し、レンチウイルスベクターで APE1 knockdown 株を作製し、細胞増殖と細胞の形態変化について検討を行なった。

4. 研究成果

AML 細胞株・患者骨髄検体における、塩基除去修復遺伝子の mRNA 発現検討

AML 細胞株(HL60, HT93, Kasumi1, KG1, PL21, THP1)および患者骨髄単核球において塩基除去修復遺伝子(OGG1, MUTYH, APE1, XRCC1, POLB)の発現を検討したところ、いずれも対照より高発現していた。中でも、APE1 が正常骨髄単核球に比べて患者骨髄単核球で特に高発現していた。このことから、APE1 に着目して、AML 細胞における機能的意義を検討していくこととした。

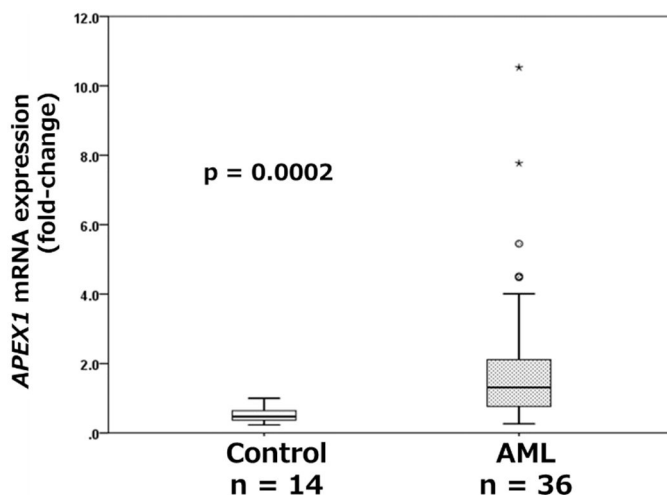


図 1: 患者骨髄単核球における APE1 mRNA 発現量の検討

APE1 knockdown 株の作製および表現型の解析

HL60 を用い、Tet-on システムの APE1 knockdown 株を作製した。

- ・細胞増殖は軽度抑制された(図 2)。
- ・細胞周期の検討の結果、knockdown 株において G2/M 期の細胞の割合がわずかに減少していた。
- ・シグナル伝達系(p38, p44/42, p65)の発現やリン酸化に明らかな差は見られなかったが、p-p38 がわずかに減少していた。

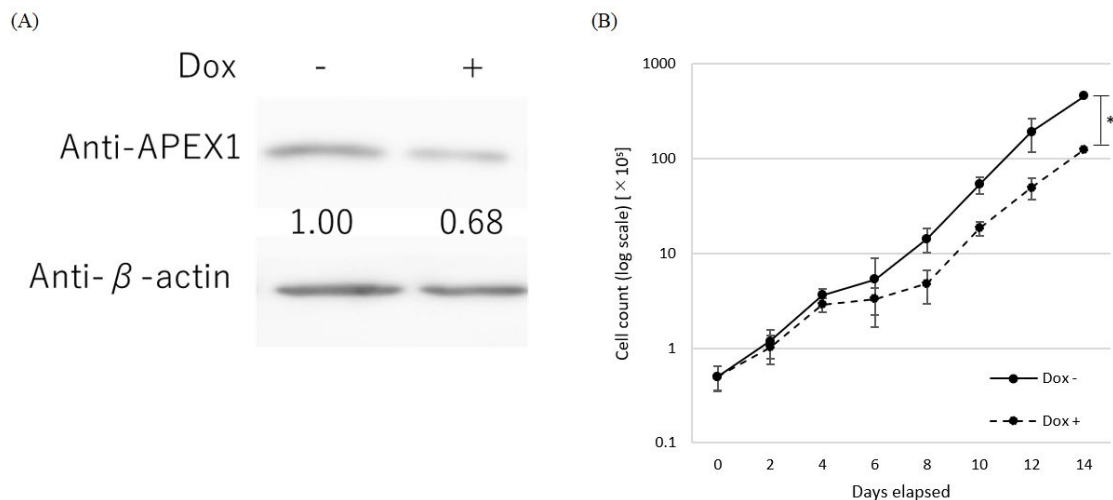


図 2: Tet-on システムによる APE1 knockdown 株の APE1 発現量(A)。APE1 knockdown による AML 細胞の増殖抑制(B)。

APE1 knockout 株の作製および表現型の解析

HL60 を用い、CRISPR/Cas9 システムで APE1 knockout 株を作製した。(図 3)

・細胞増殖が著明に抑制され、knockout 株はほとんど増殖しなかった。また、knockout 株は培養を継続すると、数週間以内に死滅してしまうことから、APE1 は AML 細胞の増殖に必須な遺伝子であることが示唆される。

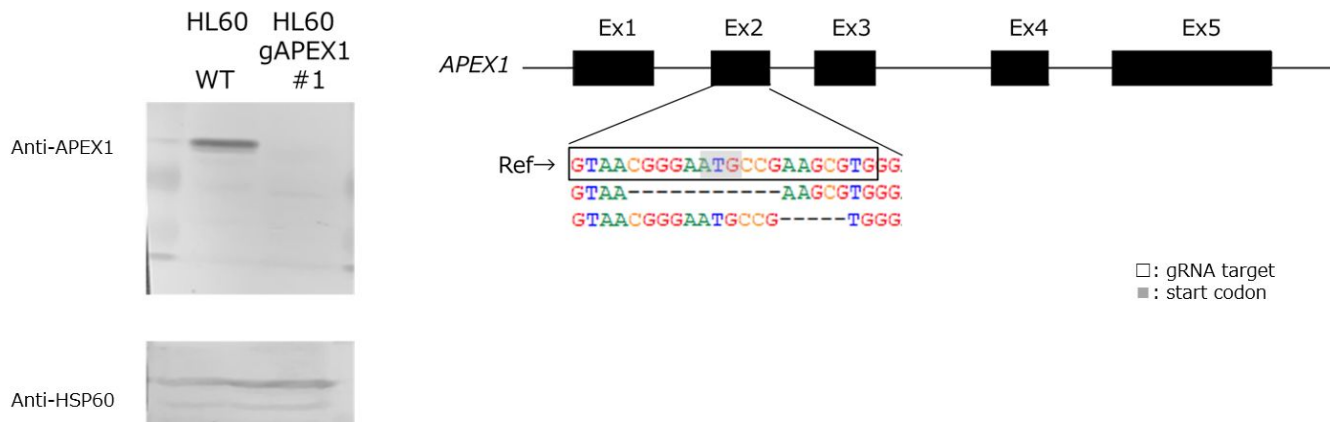


図 3: APE1 knockout 株における APE1 蛋白発現および変異部位のシーケンス

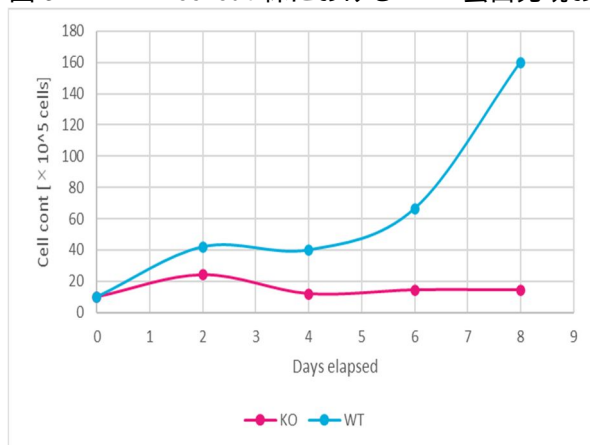


図 4: APE1 knockout 株の増殖曲線

-考察-

AMLにおけるAPE1 knockout株の樹立は、我々が知る限りでは未だ報告がない。このため、AMLの病態、特に難治化に対するAPE1の機能的意義について新たな知見が得られると期待される。APE1 knockoutによりAML細胞の増殖が著明に抑制される機序については、今後検討していく予定であるが、APE1がDNA修復だけでなく、低酸素状態や酸化ストレスなどの各種ストレスに反応し種々の転写因子を活性化する多機能蛋白であるため、網羅的に応答経路を調べていく必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------