

令和 3 年 6 月 29 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16099

研究課題名（和文）分化誘導療法におけるヒストンアセチル基転移酵素を中心とした分子基盤の解明

研究課題名（英文）Understanding the molecular mechanisms through histone acetyl-transferase in the differentiation therapy

研究代表者

白根 脩一（Shirane, Shuichi）

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：40760129

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、より広範ながんの治療に応用可能な分化誘導療法の開発に必要な基盤データの整備に資する、分化誘導薬により制御される転写ネットワークの網羅的な解明と、ヒストンアセチル基転移酵素の関与を明らかにすることを目的とした。本研究により、血液がんに対する分化誘導薬として実臨床で使用されているレチノイン酸誘導体(ATRA)によって、急性前骨髄球性白血病細胞が好中球に分化誘導される過程で変動する遺伝子群が明らかになった。さらにこれらの遺伝子の中でも広範な遺伝子の発現制御に関与するヒストンアセチル基転移酵素の、ATRAによる好中球分化における役割がより明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により明らかになった分化誘導性遺伝子の候補を検索することで、今後、広範な腫瘍に効果的な分化誘導薬の開発が期待される。これにより、副作用の強い化学療法剤に代わる分化誘導薬が、急性前骨髄球性白血病以外の腫瘍においても開発されれば、抗がん剤の選択肢が増えるだけでなく、がん患者のQOL向上に結びつくことなどから、本研究の成果は学術的にも社会的にも極めて意義深いと言える。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to comprehensively elucidate the transcriptional network regulated by a differentiation-inducing reagent and to clarify the involvement of histone acetyltransferases in the differentiation, which will contribute to the establishment of basis for the development of differentiation-inducing therapies that can be applied to the treatment of a wider range of cancers. This study revealed a group of genes involved in the process of differentiation of acute promyelocytic leukemia cells into neutrophils by all-transretinoic acid (ATRA), which is used clinically as differentiation-inducing drugs for hematological malignancies. Furthermore, the role of histone acetyltransferases, which are involved in the regulation of the expression of a wide range of genes among these genes, in ATRA-induced neutrophil differentiation was clarified.

研究分野：血液内科

キーワード：急性前骨髄球性白血病 ATRA ヒストンアセチル基転移酵素 分化誘導療法

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一般に、がん細胞は、無秩序な細胞増殖と、分化能の喪失(分化異常)という2つの異常を特徴とするが、現在普及している抗がん剤の大部分は、前者の細胞増殖を標的とした薬剤である。それ故、前者の抗がん剤は正常細胞にも作用するため正常組織に対する毒性が高く、脱毛や白血球減少などの副作用を引き起こす問題がある。一方、分化異常を標的とした薬剤は、細胞選択性が高いため正常組織への毒性が低いことが期待されるが、標準治療薬として使用されている薬剤は極めて少ない。

実際に、急性骨髄性白血病(AML: acute myeloid leukemia)においては、前者の細胞増殖を標的とした抗がん剤による化学療法が中心で、副作用が大きく予後不良群において完治は望めない。しかし、AMLのなかでも、以前は予後不良群に属していた急性前骨髄球性白血病(APL: acute promyelocytic leukemia)においては、後者の分化異常を標的とする全トランス型レチノイン酸(ATRA: all-trans retinoic acid) (Blood. 72: 567-72, 1988)が認可されて以降、治療成績は劇的に改善し、5年生存率も80%を超えるに至っている(Blood. 110: 59-66, 2007)。ATRAは、APL細胞の成熟好中球への分化を誘導し、単剤でも寛解に至らせる強い抗腫瘍効果を有しているが、「ATRAが腫瘍細胞の分化をどのようにして誘導しているのか」、その分子基盤は完全に明らかになっていない。

2. 研究の目的

報告者らはこれまでに、ATRAによる好中球分化誘導に必要な転写制御因子としてヒストンアセチル基転移酵素 PCAF (p300/CBP-associated factor)を同定し、PCAFがATRAにより転写誘導される遺伝子転写制御領域のヒストンのアセチル化を担っていることを報告している (J Biol Chem. 292: 2815-29, 2017)。一方で、PCAFの過剰発現だけでは、APL細胞の好中球分化を誘導できないことから、PCAF以外の転写制御因子の関与が強く示唆されていた。そこで本研究では、より広範ながんの治療に応用可能な分化誘導療法の開発に必要な基盤データの整備に資する、分化誘導薬により制御される転写ネットワークの網羅的な解明と、ヒストンアセチル基転移酵素の関与を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) ATRAによる好中球分化に伴い発現変動する遺伝子の同定

APL患者から得たAPL細胞と、APLモデル細胞株であるNB4とHL-60細胞にATRAを作用させて、好中球分化を誘導し、APL細胞はATRA添加3日と7日後、NB4細胞とHL-60細胞はATRA添加3日後に細胞を回収し、RNAを調製し、RNA-seq解析を行なった。

ATRAによる発現誘導が見出されたヒストンアセチル基転移酵素 NCOA3 について、RT-qPCR法を用いて、ATRAによるmRNAの発現誘導の確認と定量を行なった。続いて、ATRA処理をしたNB-4細胞とHL-60細胞から細胞抽出液を調製し、免疫ブロット法により、内在性のNCOA3蛋白質の蓄積を評価した。

2) ヒストンアセチル基転移酵素 NCOA3 の過剰発現

NCOA3のcDNAをpcDNA3.1 neoベクターにクローニングした上で、リポフェクション法を用いてNB-4細胞とHL-60細胞に遺伝子導入を行ってから0、24、72時間後に細胞を回収、細胞抽出液を調製し、免疫ブロット法により、NCOA3蛋白質の過剰発現を確認した。NCOA3を過剰発現させた細胞をFITC標識された抗CD11b抗体と反応させてから、フローサイトメトリー解析により、好中球分化の誘導を評価した。

3) RNA干渉によるヒストンアセチル基転移酵素 NCOA3 の発現抑制

NCOA3のmRNA配列と相補的な21ヌクレオチドのRNA断片を含むヘアピンRNAを発現するコンストラクトをレンチウイルスベクター-pLKO3Rベクターにクローニングした上で、gag/po1とVSVGベクターとともに、ポリエチレンイミン存在下でHEK293T細胞にトランスフェクションを行い、RNA干渉用のレンチウイルスを作成した。濃縮したウイルスをNB-4細胞とHL-60細胞に感染した上で、様々な濃度のATRAと72時間反応させてから、FITC標識された抗CD11b抗体と反応させて、フローサイトメトリー解析により、好中球分化の誘導を評価した。この際、レンチウイルスベクターに搭載された赤色蛍光蛋白質DsRedにより標識された細胞を、選択して解析を行なった。

4. 研究成果

1) ATRA による好中球分化に伴い発現変動する遺伝子の同定

ATRA 処理をした APL 細胞や APL モデル細胞株から調製した RNA のシーケンス解析により、ATRA による APL 細胞の好中球への分化誘導の際に発現が誘導あるいは抑制される遺伝子として、それぞれ 474 個と 205 個の遺伝子を同定した (図 1)。

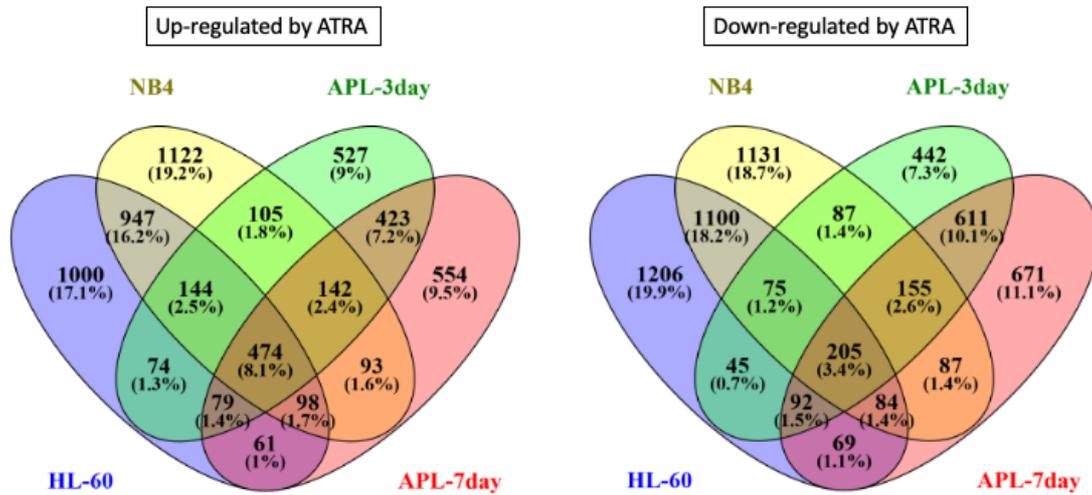


図 1 : ATRAによる好中球分化に伴い発現変動する遺伝子

RNA-seq 解析により同定された、ATRA による好中球分化誘導に伴って発現の変動が見られる遺伝子について、RT-qPCR 法を用いて検証を行なったところ、ヒストンアセチル基転移酵素 NCOA3 の mRNA の 10 倍を超える発現上昇と、蛋白質の蓄積が、NB-4 細胞と HL-60 細胞において確認できた (図 2)。

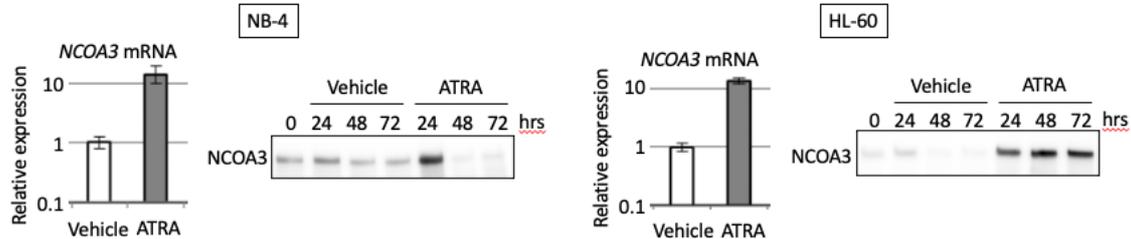


図 2 : ATRAによるNCOA3の発現誘導

2) ヒストンアセチル基転移酵素 NCOA3 による好中球分化誘導の検証

ATRA による好中球分化誘導に伴って著明な蓄積が見出される NCOA3 を発現するベクターを、NB-4 細胞と HL-60 細胞に導入し、NCOA3 の過剰発現により好中球分化が誘導されるか、検討を行なった。その結果、NCOA3 単独の過剰発現では、これらの APL モデル細胞株の好中球分化を誘導しなかった (図 3)

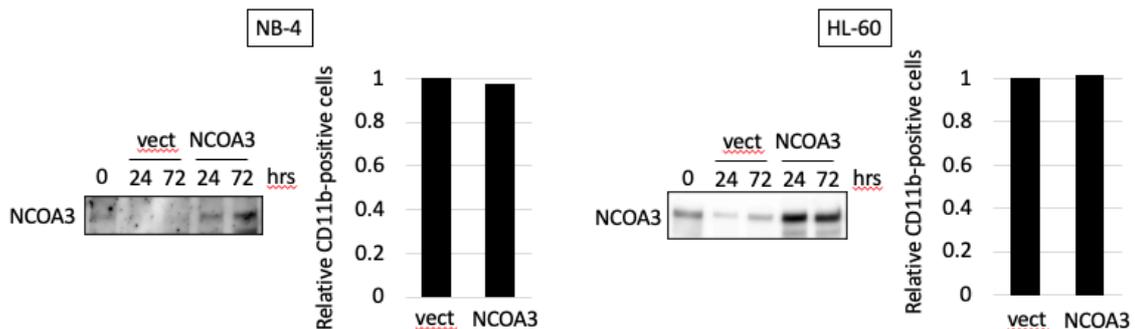


図 3 : NCOA3の過剰発現は好中球分化を誘導しない

3) ヒストンアセチル基転移酵素 NCOA3 の ATRA による好中球分化における意義の解明

ATRA による好中球分化誘導に伴って著明な蓄積が見出される NCOA3 の発現を RNA 干渉により抑制したときに、ATRA による好中球分化誘導が抑制されるかについて、検討を行なった。その結果、NCOA3 の発現を抑制しても ATRA による好中球分化の抑制は観察されなかった (図 4)。

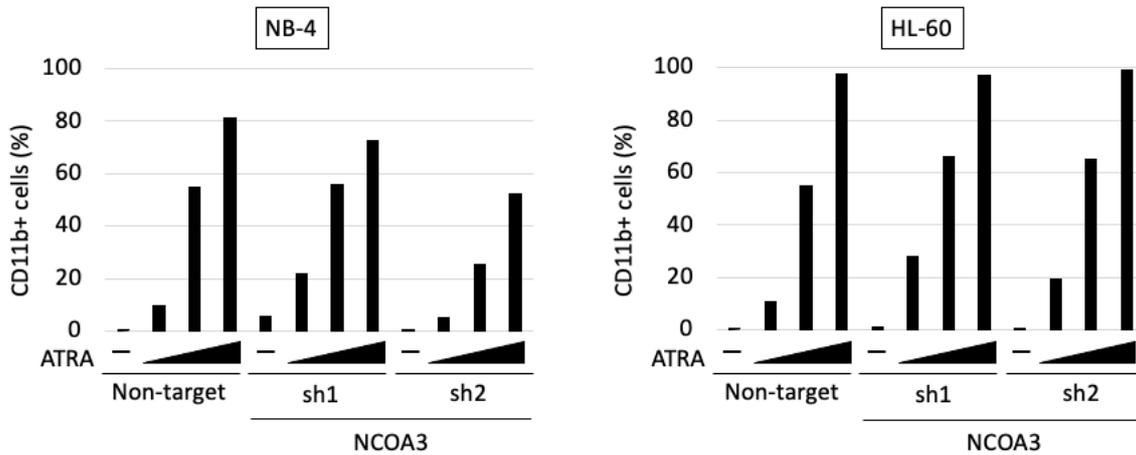


図 4 : NCOA3の発現抑制は好中球分化を抑制しない

以上の結果から、NCOA3 は、PCAF と同様に ATRA による好中球分化誘導に伴って著明な発現誘導と蛋白質の蓄積が見られるものの、PCAF とは異なり、ATRA による APL 細胞の好中球分化への関与は限定的であることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 角南義孝、荒木真理人、山本誠司、白根脩一、堀内祥行、辻岡一也、茂柳薫、山口茂夫、今井美沙、森下総司、大坂顯通、小松則夫
2. 発表標題 全トランス型レチノイン酸による白血病細胞分化制御因子の同定
3. 学会等名 第29回日本サイトメトリー学会学術集会
4. 発表年 2019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
研究協力者	小松 則夫 (KOMATSU NORIO) (50186798)	順天堂大学・血液内科・主任教授 (32620)	

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
---------	---------