

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590082
 研究課題名 (和文) 白血病治療のための標的分子 C/EBP α の発現及び活性制御機構
 についての解析
 研究課題名 (英文) Analysis of regulation mechanism of expression and activity
 of target molecule (C/EBP α) for therapy of leukemia.
 研究代表者
 清水 貴壽 (SHIMIZU TAKAHISA)
 東京理科大学・総合研究機構・講師
 研究者番号：30287479

研究成果の概要：

白血病治療のための重要な標的因子である C/EBP α の発現及び活性制御機構に関する研究を行った結果、C/EBP α はその発現及び修飾 (SUMO 化) 制御や、STAT5 との複合体形成を介して、標的遺伝子である Id1 遺伝子の発現を誘導している可能性が示唆された。この作用は白血病細胞を分化誘導し、がん化形質抑制に関与しているので、これら因子の同定は白血病治療において有益な情報となることが期待できる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：発現制御、白血病、レチノイン酸、GM-CSF

1. 研究開始当初の背景

化学療法をはじめとするがん治療法の進歩はめざましいものがあるが、その強い細胞毒性による副作用や、多剤耐性などに代表される種々の問題点はなかなか克服されず、他の新しい理念に基づくがん治療法開発の必要性が示唆されていた。

分化誘導療法は生理活性物質を分化誘導

剤として、がん細胞を増殖停止、分化させ最終的にはアポトーシスを引き起こしてがん細胞を死滅させる方法であり、1988年にトランス型のレチノイン酸 (ATRA) が急性前骨髄性白血病 (APL) 患者に著効を示すことが明らかとなり、この新しい分化誘導療法の重要性が示された。しかしながら、現在その有効性は APL に限局されており、患者数の多い骨髄芽球、単芽球の分化段階にある白血病に対

して効果は示されていない。この分化誘導療法を幅広く発展させるために、骨髄芽球性や単芽球性などの種々のタイプの白血病細胞の分化誘導系を確立し、その分化誘導機構を解明することが重要な課題となっている。

ATRA による作用は顆粒球方向への分化誘導作用を示すが、この顆粒球への分化誘導機構については、白血病細胞や骨髄細胞由来の幹細胞を用いた分化誘導系での解析が進められ、顆粒球への分化過程で重要な役割を果たしているいくつかの遺伝子が同定されてきた。その中でも、顆粒球方向への分化を方向付けるマスター遺伝子とも言える重要な遺伝子が C/EBP α である。

C/EBP α はロイシンジッパーファミリーに属する転写因子の一つで、細胞増殖や、種々の細胞分化に関与していることが報告されている。Zhang 等は、C/EBP α ノックアウトマウスの血中や胎児の肝臓において、顆粒球以外の系列の血球細胞には異常がないのに対し、好中球や好酸球が全く存在していないことを 1997 年に報告している。彼らは 2004 年には、血球細胞の顆粒球への分化過程での、骨髄前駆細胞から顆粒球単球前駆細胞への移行過程において C/EBP α が必須であることを示している。また、ヒト CD34 陽性骨髄細胞、マウスの骨髄芽球細胞 (32D)、ヒト単芽球性白血病細胞 (U937) などの骨髄系細胞に C/EBP α を強制発現させることで、顆粒球方向へ分化が進むことも報告されている。一方、C/EBP α の異常が白血病発症の原因遺伝子であることを示唆する報告も数多くあり、急性骨髄性白血病 (AML) の患者の白血病細胞の C/EBP α 遺伝子において点突然変異が検出されている。また、t(8:21) 転座により AML1-ETO 融合タンパク質を産生することを特徴とした AML (AML1-ETO) 患者でも、C/EBP α の発現減少や活性低下が報告され、さらに、融合タンパク質 BCR-ABL を産生する慢性骨髄性白血病 (CML) でも、同様の C/EBP α 遺伝子の発現抑制が示されている。これら、AML1-ETO や CML 細胞へ、C/EBP α を強制発現させてやると、顆粒球細胞へ分化誘導を引き起こすことも報告されている。

このように、C/EBP α には多種多様な状態の血球系の細胞を分化誘導する作用があり、白血病治療の標的分子として非常に有効な分子であることが予想される。しかしながら、この C/EBP α 遺伝子の発現や活性制御機構に関しては情報が少ないのが現状であり、これらに関する因子を発見できれば、白血病治療への応用が期待できる。

2. 研究の目的

これまで当研究室では、骨髄芽球性白血病細胞の ML-1 細胞を ATRA と GM-CSF (血球細胞の増殖、分化に関わるサイトカイン) の併用処理により相乗的に顆粒球方向へ分化誘導することに成功した。また、この分化誘導過程で、C/EBP α 遺伝子が発現誘導することや、C/EBP α の標的遺伝子の発現が相乗的に誘導されることを検出している。そこで本研究では、この分化誘導系を利用して、ATRA と GM-CSF による C/EBP α の発現誘導機構及び活性化機構についての解析を試み、ATRA と GM-CSF による C/EBP α 遺伝子自身の転写制御と C/EBP α タンパク質の活性制御に関わる因子を同定し、その制御機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ML-1 細胞での分化誘導剤による C/EBP α の発現、活性変動についての解析

① ML-1 細胞に GM-CSF と ATRA を単独及び併用処理後、経時的に mRNA、タンパク質を抽出し、ノーザンブロット法及びウェスタンブロット法を用いて、C/EBP α の発現動態を解析した。

② 分化誘導剤処理後、C/EBP α の標的遺伝子 (Id1、G-CSF receptor、lactoferrin、neutrophil elastase、myeloperoxidase、haptoglobin) の発現動態をノーザンブロット法で調べた。

(2) C/EBP α の標的遺伝子 (Id1) の発現制御機構の解析

① 分化誘導剤処理後、C/EBP α の標的遺伝子 (Id1) のプロモーター上での C/EBP α 及び STAT5 タンパク質の結合量を、クロマチン免疫沈降法を用いて調べた。

② C/EBP α 及び STAT5 siRNA を処理後、Id1 の発現をノーザンブロット法で調べ、両誘導剤による Id1 発現誘導における C/EBP α 及び STAT5 の役割を検討した。

(3) C/EBP α の転写、活性制御 (修飾、複合体形成) に関与する因子の解析

① 分化誘導剤処理後、これまで報告されている C/EBP α タンパク質の修飾因子や結合タンパク質 (GSK3、SAE1、SAE2、UBC9、BRG1、STAT3、ATF2、ASC2) の mRNA レベルでの発現動態をノーザンブロット法で調べた。

② 分化誘導剤処理後、細胞抽出液を回収し、抗 C/EBP α 抗体を用いて免疫沈降法を行い、C/EBP α を分離した。この C/EBP α に対して抗 SUMO 抗体を用いてウェスタンブロット法により、SUMO 化 C/EBP α を検出した。また、抗リン酸化 C/EBP α 抗体を用いて、C/EBP α のリン酸化状態を調べた。

4. 研究成果

(1) ML-1 細胞での分化誘導剤による C/EBP α の発現、活性変動についての解析

① ML-1 細胞に GM-CSF と ATRA を併用処理後、経時的に mRNA を抽出し、ノーザンブロット法を用いて C/EBP α mRNA の発現動態を調べた結果、誘導剤処理 1 時間後で発現上昇が検出され 3 時間後に最大の発現量を示した。また、単独処理した細胞の解析により、この発現誘導は GM-CSF、ATRA の両誘導剤によって引き起こされていることが分かった。さらに、ウェスタンブロット法により、併用処理による C/EBP α タンパク質の発現誘導を確認した。

② 次に、C/EBP α の活性変動の解析として、転写因子 C/EBP α によって発現が制御されていることが報告されている標的分子 (Id1、G-CSF receptor、lactoferrin、neutrophil elastase、myeloperoxidase、haptoglobin) の発現動態についてノーザンブロット法を用いて調べた。その結果、併用処理時において Id1、G-CSF receptor、myeloperoxidase、haptoglobin の発現誘導が検出された。中でも特に Id1 遺伝子が著しい発現上昇を示した。また単独処理時の解析により、Id1 の発現は ATRA によって誘導された僅かな発現が GM-CSF との併用処理によって増強され、相乗的に発現誘導されるということが明らかとなった。そこで次に、この Id1 遺伝子の発現制御における C/EBP α の役割について解析を試みた。

(2) C/EBP α の標的遺伝子 (Id1) の発現制御機構の解析

Wagner 等は Id1 遺伝子の下流 5000bp 近辺に C/EBP α 結合領域を含む 3 prime regulatory element (3PRE) を報告している。そこで、本実験系においても C/EBP α がこの結合領域に結合し、Id1 の発現誘導を引き起こしているのではないかと予想し、クロマチン免疫沈降法を用いて、併用処理した細胞で

の C/EBP α のこの結合領域への結合状態を調べた。その結果、併用処理 1 時間後から、この領域への C/EBP α の結合が検出され、3 時間後に最大の結合を示した。この結果は先述した C/EBP α の発現動態の結果と同様であり、また、Id1 の発現誘導が 3 時間後に最大となるという結果とも矛盾のない結果が得られた。また、単独処理時の解析によって、この C/EBP α の DNA 上への結合は ATRA によって引き起こされていることが明らかとなった。

さらに、Id1 発現誘導における C/EBP α の役割を明らかにするために、C/EBP α siRNA を処理した細胞を用いて、Id1 発現誘導について解析した。その結果、siRNA により C/EBP α をノックダウンした細胞では、ATRA 単独及び ATRA、GM-CSF 併用処理による Id1 の発現誘導が抑制されることが分かった。

この C/EBP α による Id-1 の発現増加は GM-CSF との併用処理で相乗的に促進されているので、次に GM-CSF による作用についての検討を試みた。TRANSFAC を用いて 3PRE の近辺の転写因子結合領域を検索した結果、C/EBP α 結合領域上流 500bp 付近に GM-CSF シグナルの標的分子である STAT5 の結合領域を発見した。そこで、この結合領域への STAT5 の結合状態を調べた結果、GM-CSF 処理によって STAT5 がこの領域に結合することが明らかとなった。また、STAT5 siRNA を用いた細胞では、ATRA の Id1 発現誘導作用に対する GM-CSF の増強作用が抑制されることが分かった。

これらの結果より、ATRA による C/EBP α の結合領域への結合は、本分化誘導系での Id1 の発現誘導において必須な条件であることと、GM-CSF による STAT5 の結合領域への結合は、Id1 の発現増強作用に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、両因子の結合領域は近接しており、併用処理時では両因子は複合体を形成し、STAT5 が C/EBP α の転写活性を増強していることが予想された。

(3) C/EBP α の転写、活性制御 (修飾、複合体形成) に関する因子の解析

① C/EBP α の活性制御に関与する修飾としては、これまでにリン酸化や SUMO 化が報告されている。そこで、これらの修飾関連因子 (GSK3、SAE1、SAE2、UBC9) の発現動態について調べた。また、C/EBP α と複合体を形成する因子 (BRG1、STAT3、ATF2、ASC2) についても同様に解析を試みた。ML-1 細胞に GM-CSF と ATRA を併用処理後、経時的に mRNA を抽出し、ノーザンブロット法を用いて各遺伝子の発現動態を調べた結果、両誘導剤

により顕著な発現変動を示した遺伝子は検出されなかった。

② そこで分化誘導剤処理後、実際の C/EBP α の修飾状態について解析を試みた。まず C/EBP α のリン酸化について、ser21 のリン酸化抗体を用いてウェスタンブロット法を行ったが、併用処理時においてリン酸化状態に変化は検出されなかった。

次に SUMO 化について調べた。分化誘導剤処理後、細胞抽出液を回収し、抗 C/EBP α 抗体を用いて免疫沈降法を行い C/EBP α を分離した。この C/EBP α に対して抗 SUMO 抗体を用いてウェスタンブロット法により、SUMO 化 C/EBP α の検出を試みた。結果として、併用処理 3 時間後から C/EBP α の SUMO 化の誘導が検出された。

以上の結果より、本分化誘導課程で検出された Id1 の発現誘導には、C/EBP α が重要な役割を果たしており、この C/EBP α の活性化に STAT5 との結合や SUMO 化が関与している可能性が示唆された。C/EBP α との結合タンパク質としては STAT3 が報告されているが、STAT5 についてはこれまで報告はなく、本研究において検出された STAT5 は C/EBP α の新しい制御因子の候補として考えられる。また C/EBP α の SUMO 化については、Sato 等が SUMO 化 C/EBP α の機能について報告している。彼らは肝細胞において、C/EBP α によるアルブミン遺伝子の転写活性が SUMO 化によって抑制されることを示している。この結果は、SUMO 化が C/EBP α の転写活性化につながるという我々の予想と逆の結果であるが、この理由としては、細胞種の違い、SUMO 化の位置、量の差異などの様々な要因が考えられる。本分化誘導系における C/EBP α の SUMO 化の役割については、さらなる詳細な解析が必要と考えられる。

今後、SUMO 化の役割とともに、両分化誘導剤による C/EBP α の発現誘導機構についても詳細な解析を進める必要がある。これらの解析結果により、C/EBP α 遺伝子の発現制御、活性制御機構に関わる分子を同定すれば、これらの分子は C/EBP α と同様に、白血病に対する治療や薬剤の標的分子の候補として活用でき、今後の白血病治療法の開発への有意義な情報となる。この開発が進めば、種々のタイプの白血病に適用できる分化誘導剤や治療法の実現が期待できるかもしれない。

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 2 件)

① Shimizu T, Kuromi A, Takeda K. Synergistic induction of gene expression during the differentiation into mature macrophage in human myeloblastic leukemia cells treated with TPA and KH1060. Leuk Res. 33:803-9 (2009). 査読有

② Komatsu T, Tabata M, Kubo-Irie M, Shimizu T, Suzuki K, Nihei Y, Takeda K. The effects of nanoparticles on mouse testis Leydig cells in vitro. Toxicol In Vitro. 22:1825-31 (2008). 査読有

[学会発表] (計 3 件)

① Takahisa Shimizu, Ken Takeda. Involvement of the helix-loop-helix protein ID-1 in granulocytic differentiation of human myeloblastic leukemia cells. 20th EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, 2008年10月24日, ジュネーブ (スイス)

② 清水 貴壽、武田 健、Analysis of gene expression during KH1060 plus TPA-induced differentiation of human myeloblastic leukemia cells. 第67回 日本癌学会、2008年10月28日、名古屋

③ 清水 貴壽、武田 健、The expression analysis of histone-modifying enzymes during the differentiation of human myeloblastic leukemia cells. 第66回 日本癌学会、2007年10月4日、横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 貴壽 (SHIMIZU TAKAHISA)
東京理科大学・総合研究機構・講師
研究者番号：30287479