

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591105
 研究課題名（和文） 白血病における接着シグナル分子Rho GTPase
 の役割
 研究課題名（英文） Roles of Rho GTPases in pathogenesis of leukemia

研究代表者

勝見 章(Katsumi Akira)
 名古屋大学・大学院医学系研究科・特任講師
 研究者番号：80378025

研究成果の概要：

成人急性骨髄性白血病(AML)90例の白血病細胞の*RhoH*発現量をTaqMan PCR法で定量した。*RhoH*発現はFAB分類、年齢、初診時白血球数、寛解導入率、染色体異常の有無に無関係であった。*RhoH*低発現群と高発現群に分けて予後を検討したところ、低発現群では有意に予後不良であった。また多変量解析にて、*RhoH*低発現は無病生存率において予後不良因子であった。COS7細胞に*RhoH*を過剰発現させた状態ではsmall GTPase Racが不活性化することが明らかになった。またRac-PAKの下流に存在するBadのS112のリン酸化を測定したところ、*RhoH*発現によりBad S112のリン酸化が抑制される事が明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
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：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：細胞接着、*RhoH*, Rac, 急性骨髄性白血病

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病患者の75%程度は一時的に寛解を得るが、高率に再発するため長期無病生存率は未だに20-30%と低い。このため、再発のメカニズムを解明することは急性白血病の治療成績向上のためには不可欠である。近年骨芽細胞、血管周囲細胞等を中心とした骨髄ニッチが造血幹細胞の生存に必要であることが報告されている。残存白血病細胞の生存に骨髄ニッチへの接着が重要であり、接着を抑制することにより再発率を低下

させ得る可能性がある。造血細胞とニッチ骨芽細胞の接着には多様な分子を必要とする。RacはRho family Small GTPaseであり、LFA-1, VLA4などのインテグリンを介した細胞-マトリックス接着により活性化される。SDF-1 α /CXCR4, SCF/C-kit系、さらにカドヘリンを介した細胞-細胞接着、 β カテニン系によっても活性化される。Racは多様な下流エフェクターにより細胞骨格、転写活性、細胞の生存、細胞周期調節等を制御している。つまり造血幹細胞-骨髄ニッチ間の多彩な

接着シグナルを中継、伝達する重要な分子スイッチが Rac である。

2. 研究の目的

本研究では白血病細胞の骨髄ニッチへの接着における Rho family GTPase と下流エフェクターの役割を解明し、その活性を制御することで治療応用への基盤と成りうるかどうかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 臨床検体

90 人の成人 de novo AML 患者全例から文書により同意を取得の後、骨髄細胞を採取し、すべてのサンプルに 90%以上の白血病細胞が含まれていることを確認した後、液体窒素保存した。genome DNA は Ficoll-Hypaque 法で精製した。病型の内訳は French-American-British (FAB) 分類で M0 (n = 1), M1 (n = 22), M2 (n = 39), M4 (n = 19), M5 (n = 8) and M6 (n = 1) であった。当研究は名古屋大学倫理委員会の承認を受けて行われた。

(2) *RhoH* transcripts の定量

凍結細胞より total RNA を QIAamp RNA Blood Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) で精製し、Moloney murine leukaemia virus 逆転写酵素 (Super-Script II; Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) を使用して cDNA を合成した。*RhoH* 転写産物はリアルタイム蛍光検出法 (Applied Biosystems, Foster City, CA) により定量した。相対的な *RhoH* 遺伝子転写産物は *GAPDH* 発現レベルとの比較により定量した。

(3) 細胞とプラスミド

T 細胞白血病細胞株 Jurkat 細胞より常法に従い total RNA を調整し、上記の方法に従ってヒト *RhoH* cDNA を合成し、pCR-BluntII-TOPO ベクター (Invitrogen) にサブクローンした。PCR mutagenesis によりヒト *RhoH* cDNA のアミノ末端に FLAG タグを付加した。FLAG-human *RhoH* cDNA は pcDNA 3.1 ベクターにサブクローンされた。pcDNA3-Tiam1-C1199-HA ベクターは The Netherlands Cancer Institute の John G. Collard 教授より、pEGFP-C1 Rac wild type ベクターは Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (スペイン) の Miguel A. del Pozo 教授より供与を受けた。

(4) Rac 活性測定

COS7 細胞を PBS で洗浄した後 400 μ l の溶解バッファー {0.5% NP-40, 50 mM Tris-HCl (pH 7.0), 500 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml

leupeptin} に 20 μ g GST-PBD (p21-binding domain of PAK1) を加え、グルタチオンビーズとともに 30 分間 4 $^{\circ}$ C で反応させた。洗浄の後 ウェスタンブロッティングにより活性化 Rac を検出した。

(5) Bad リン酸化測定

Bad, リン酸化 Bad は phospho-Bad S112 抗体 (Cell Signaling Technology) phospho-Bad S136 抗体 (Cell Signaling Technology) ならびに Bad 抗体 (BD Transduction Laboratories) によるウェスタンブロッティングにより検出された。

(6) 統計学的解析

2 群間の比較には Mann-Whitney U テスト、3 群以上の間の比較には Kruskal-Wallis テストと Bonferroni 補正を用いた。生存率の算定には Kaplan-Meier 法、生存曲線の比較には log-rank test を用いた。上記の統計解析には StatView-J 5.0 (Abacus Concepts) を用いた。

4. 研究成果

(1) *RhoH* 発現による AML 患者の予後解析

我々は AML 患者骨髄からの RNA より *RhoH* 遺伝子の発現量を定量した (Figure 1)。*RhoH* の発現量は FAB 分類によって差は見られなかった (Figure 1)。*RhoH/GAPDH* 比の中央値は 1.57 であった。*RhoH/GAPDH* 比が 1.58 以上のものを *RhoH* high 群、1.58 未満のものを *RhoH* low 群とした。High 群と low 群間で FAB 分類、年齢、初診時白血球数、染色体異常の有無、寛解率に有意差は見られなかった (Table 1)。AML における代表的な遺伝子異常である *NRAS*, *FLT3*, *TP53* の変異の有無と *RhoH* 発現量の間に関連は認められなかった (Table 2)。興味深いことに Kaplan-Meier 分析では全生存率、無病生存率ともに *RhoH* low 群が有意に予後不良であった (それぞれ $p < 0.028$, $p < 0.003$) (Figure 2)。

Southwest Oncology Group and Medical Research Council によると AML の染色体異常は予後良好群 {inv(16)/t(16;16)/del(16q), t(15;17), del(9q) または複雑核型を持たない t(8;21)}, 予後中間群 {正常核型, +18, +16, -Y, del(12p)}, 予後不良群 {del(5q)/25, 27/del(7q), 異常 3q, 9q, 11q, 20q, 21q, 17p, t(6;9), t(9;22), 複雑核型} に層別化され、5 年全生存率はそれぞれ 55, 38, 11% であった。Slovak らによれば AML のうち予後中間群は 45.6% であり、我々の検討では 72.2% (65 例) と最も多数であり、この群のさらなる層別化が AML に対する治療選択に重要になると考えられる。そこで我々は 90 例中 65 例 (72.2%)

の予後中間群患者に対して Kaplan-Meier 分析を行った。その結果、染色体予後中間群においても *RhoH* 低発現は全生存率、無病生存率において予後不良因子であった (それぞれ $p < 0.03$, $p < 0.001$) (Figure 3)。

AML 全症例 90 例に対して多変量解析を行ったところ全生存率については *TP53* 変異 (相対危険度 10.175; $p = 0.0036$), 初診時高 WBC 数 ($100 \times 10^9/L$ 以上; 相対危険度 3.457; $p = 0.0003$) とともに *RhoH* 低発現 (相対危険度 2.272; $p = 0.0091$) が独立した予後不良因子であった (Table 3)。無病生存率については *TP53* 変異 (相対危険度 14.292; $p = 0.0168$), *RhoH* 低発現 (相対危険度 4.854; $p = 0.0002$), 初診時高 WBC 数 (相対危険度 2901; $p = 0.0187$) *FLT3/ITD* (相対危険度 2.515; $p = 0.0419$) が独立した予後不良因子であった (Table 3)。

(2) *RhoH* による Rac 不活性化

次に我々は *RhoH* の細胞内における役割について検討した。COS7 細胞に野生型 Rac, 活性化型 Tiam1 を発現した。Rac のグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) である Tiam1 の発現により Rac 活性は亢進するが、*RhoH* の共発現により Rac は不活性化を受けた (Figure 4A)。このことから *RhoH* は Rac の上流に位置しこれを不活性化していることが再確認された。

4.3 *RhoH* による Bad serine 75 の脱リン酸化

活性化 Rac はその代表的なエフェクターであるセリン/スレオニンキナーゼ PAK1 を介して Bad のセリン (S)75 (マウスにおける S-112) をリン酸化し、薬剤誘導性のカスパーゼの活性化を抑制することが知られている。Figure 4B に見られるように *RhoH* の発現は Bad S75 の脱リン酸化を誘導することが明らかになった。Bad S99, Akt S473 のリン酸化には *RhoH* は影響を及ぼさなかった (未発表データ)。

前述のように *RhoH* は血液細胞に特異的に発現している Rho ファミリー蛋白であるがこれまで骨髓系細胞での機能は明らかになっていなかった。我々の実験により *RhoH* 遺伝子低発現で AML の予後が有意に不良であることが明らかになった (Figure 2)。また多変量解析により *RhoH* 低発現は全生存率と無病生存率において独立した予後不良因子であることが明らかになった (Table 3)。

染色体異常は成人 de novo 白血病において寛解導入、寛解後治療成績に関連があることが既に報告されている。AML の多くの症例が染色体正常群を含む予後中間群であ

り、各症例毎に最適な治療法を決定するためにはこの群の AML 層別化のために更なる有効な予後因子が必要である。予後中間群においても *RhoH* 低発現は全生存率と無病生存率において独立した予後不良因子であった (Figure 3)。これらの結果から *RhoH* transcripts の量は AML の予後因子であり、疾患層別化に有用であることが明らかになった。*RhoH* high 群と low 群では AML の寛解率には差がなかった (Table 1) ことから、*RhoH* 発現の予後への関与は主として再発に関わるものであることが推察された。*RhoH* は LFA1 ($\alpha 2 \beta 1$ インテグリン) を不活性化状態に保つことが知られているが、*RhoH* ノックアウトマウスの胸腺細胞では ICAM-1 (LFA1 リガンド), VCAM-1 ($\alpha 4 \beta 1$ インテグリンのリガンド) への接着は亢進していないことが報告されている。我々の検討でも *RhoH* と empty vector を発現させた 32D, HL60 の間では $\alpha 4 \beta 1$ インテグリン活性には差が見られなかった (未発表データ)。これらのことから *RhoH* がインテグリンを介した cell adhesion dependent drug resistance には関与しないことが示唆された。

Gu らにより造血幹細胞への *RhoH* の過剰発現により増殖能の低下、アポトーシス亢進がおこることが報告されているが、そのメカニズムは不明である。Bad は BH3 only サブファミリーに属するアポトーシス誘導能を持つ蛋白質である。ヒト Bad における主なリン酸化部位はセリン 75, 99, 118 であり、これはマウス Bad のセリン 112, 136, 155 に相当する。リンパ腫細胞株において Rac1 シグナルが Bad のセリン 75 のリン酸化を増強し、この部位の脱リン酸化により化学療法に反応してアポトーシスが亢進することが報告されている。我々の検討では COS7 細胞における *RhoH* の過剰発現は Bad のセリン 75 の脱リン酸化を誘導することが明らかになった (Figure 4B)。*RhoH* が Rac 活性を抑制すること (Figure 4A)、Rac は悪性腫瘍で活性化していることを考え合わせると、*RhoH* 低発現 (つまり Rac 活性高値) は AML の化学療法感受性に関与している可能性がある。今後活性化 Rac を標的とした治療応用の可能性が示唆される。

Table 1 Relationship between expression of the *RhoH* transcript and clinical characteristics in 90 AML cases

	High group (n=45)	Low group (n=45)	P-value
FAB			0.05
M0	1	0	
M1	14	8	
M2	22	17	
M4	6	14	
M5	1	6	
M6	1	0	
Age, yr (range)	48 (16–76)	51 (15–85)	0.224
WBC count, $\times 10^9/L$ (range)	23.8 (1.3–300)	33.2 (2.4–180)	0.175
Cytogenetics*			0.19
Favourable	8	12	
Intermediate	34	31	
Normal karyotype	18	19	
Unfavourable	3	2	
Outcome (CR or failure)			0.657
CR	37	35	
Failure	8	10	

Table 2 Associations of *RhoH* expression with previously reported gene mutations

Gene mutations	n	Relative <i>RhoH</i> transcript level (median)	P-value
<i>FLT3</i> mutations			0.934
mutation (+)	23	1.58	
mutation (–)	67	1.56	
<i>NRAS</i> mutation			0.403
mutation (+)	8	0.935	
mutation (–)	82	1.583	
<i>TP53</i> mutation			0.081
mutation (+)	3	4.941	
mutation (–)	87	1.53	
<i>NPM1</i> mutation			0.8532
mutation (+)	23	1.21	
mutation (–)	67	1.602	

Figure 1.

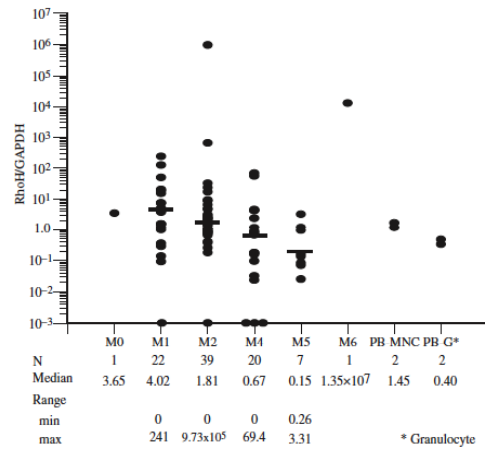


Figure 2.

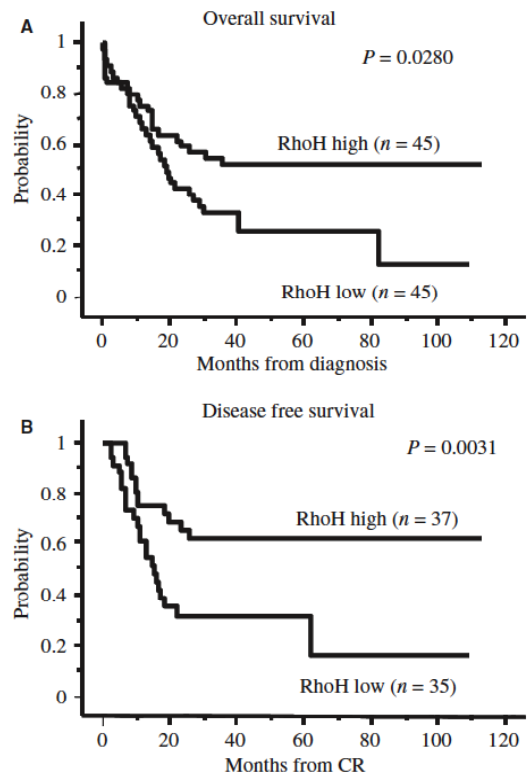


Figure 3.

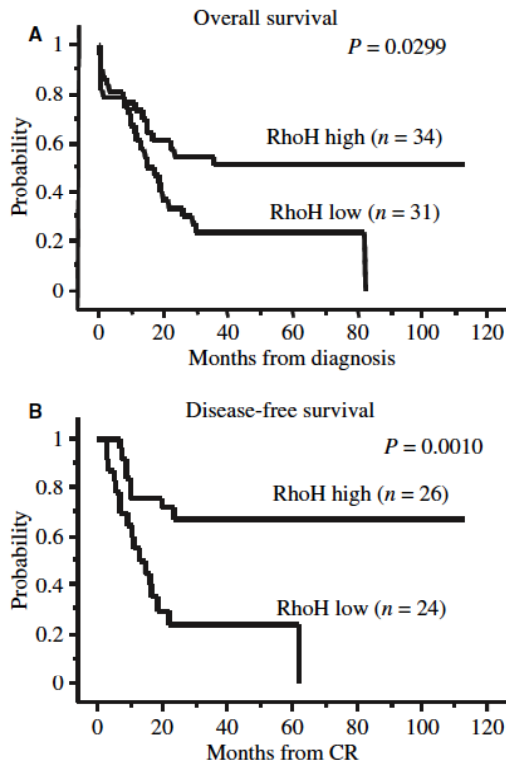
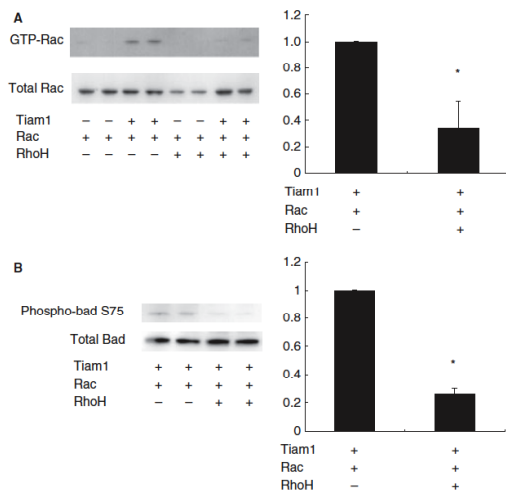


Figure 4.



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 3 件)

1. Iwasaki T, Katsumi A, Kiyoi H, Tanizaki R, Ishikawa Y, Ozeki K, Kobayashi M, Abe A, Matsushita T, Watanabe T, Amano M,

Kojima T, Kaibuchi K, Naoe T. Prognostic implication and biological roles of RhoH in acute myeloid leukaemia. *Eur J Haematol.* 2008 Dec;81(6):454-60 (査読あり).

2. Abe A, Minami Y, Hayakawa F, Kitamura K, Nomura Y, Murata M, Katsumi A, Kiyoi H, Jamieson H.M.C., Wang Y.J.J., Naoe T. Retention But Significant Reduction of BCR-ABL Transcript in Hematopoietic Stem Cells in Chronic Myelogenous Leukemia After Imatinib Therapy. *Int J Hematol.* 2008Dec;88(5):471-5 (査読あり)

3. Tanizaki R, Katsumi A, Kiyoi H, Kunishima S, Iwasaki T, Ishikawa Y, Kobayashi M, Abe A, Matsushita T, Watanabe T, Kojima T, Kaibuchi K, Kojima S, Naoe T. Mutational analysis of SOS1 in acute myeloid leukemia. *Int J Hematol.* 2008 Nov;88(4):460-2 (査読あり).

[学会発表] (計 1 件)

Katsumi A et al. Prognostic implication and biological roles of RhoH in acute myeloid leukemia. The 50th ASH (American Society of Hematology) annual meeting and exposition. December 6-9, 2008, San Francisco, CA

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/hematology/Welcome.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勝見 章 (Katsumi Akira)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任講師

研究者番号：80378025

(2) 研究分担者

貝淵弘三 (Kaibuchi Kozo)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00169377