

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07637

研究課題名（和文）CUX1、miR-145の両ハプロ不全によるクローン性進化獲得機序の解明と制御

研究課題名（英文）Mechanism of clonal evolution by both CUX1 and miR-145 haploinsufficiency

研究代表者

細野 奈穂子（Hosono, Naoko）

福井大学・学術研究院医学系部門（附属病院部）・講師

研究者番号：50509312

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）：急性骨髄性白血病細胞株（HL60）を用いて、腫瘍化のメカニズムに関与すると推測されるCUX1遺伝子とマイクロRNA-145の発現がともに低い細胞株を作成した。このCUX1遺伝子とマイクロRNA-145の低発現細胞では、増殖が抑制傾向であることが見出された。CUX1の発現が正常のHL60細胞（親株）では、TGF阻害剤の投与により細胞の増殖が誘導され、白血病治療に用いられる抗がん剤に対して効果の減弱がみとめられた。このことより、TGFの発現量が、骨髄系白血病細胞における腫瘍細胞の増殖・細胞死誘導に関与することが示された。現在DNA修復機構の詳細な評価を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々な悪性腫瘍において、Transforming growth factor-（TGF-）は、腫瘍増殖因子として知られているが、急性骨髄性白血病細胞株を用いた検討では、TGF-の作用を阻害すると腫瘍細胞が増殖をきたし、抗がん剤にも抵抗性を示すという、TGF-の相反する作用がうかがえる結果であった。TGF-が白血病細胞の腫瘍進展のみならず、治療抵抗性のメカニズムにも関与する可能性が示唆され、白血病細胞に高率に欠損する転写因子であるCUX1の発現低下時における腫瘍化の病態解明に新たな一歩を示す研究成果である。

研究成果の概要（英文）：Using an acute myeloid leukemia cell line (HL60), we generated a cell line with low expression of both the CUX1 gene and microRNA-145, which are presumed to be involved in the mechanism of tumorigenesis. In HL60 cells with normal CUX1 expression (parental line), TGF inhibitor treatment induced cell proliferation and attenuated the effect of anticancer drugs used to treat leukemia. This indicates that the expression level of TGF is involved in the cell proliferation and cell death in myeloid leukemia cells. Detailed evaluation of DNA repair mechanisms is currently underway.

研究分野：造血器悪性腫瘍

キーワード：7番染色体 CUX1 ハプロ不全 miR-145 TGF-

1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群(MDS)、急性骨髄性白血病(AML)などの骨髄系悪性腫瘍において、ヒト5番染色体長腕ならびにおよび7番染色体長腕の(部分)欠失(del(5q)/del(7q))は、予後不良の形質を示す染色体異常である。Del(5q)/del(7q)といった染色体の欠失はこれら骨髄系悪性腫瘍の病勢の進展に伴って出現し、腫瘍細胞のクローン性進化を反映しているものと考えられてきたが、その詳細な分子機構は不明であった。

申請者らは米国 Maciejewski のグループにおいて、骨髄系悪性腫瘍患者由来の臨床検体を用いて一塩基多型アレイカリオタイピング、全エクソンシーケンスなどの網羅的な解析を行い、5番染色体上の高頻度欠失領域(CDR)、および7番染色体上の3カ所の高頻度欠失領域(CDR)とその責任遺伝子の機能を明らかにした(CDR1:CUX1, CDR2:LUC7L2, CDR3:EZH2)。これら、個々の遺伝子のハプロ不全に起因する腫瘍化の機構は明らかになりつつあるが、5番7番同時欠損に起因するクローン性進化をきたす機序の解明はいまだ不十分である。

申請者は7番染色体上高頻度欠失部位の7q22に位置するCUX1は、DNA損傷に対するATM/ATRシグナルを介する転写因子としてDNA修復機構において重要な役割を果たしていることに着目し、CUX1のハプロ不全によりDNA修復機構の異常をきたし、骨髄系悪性腫瘍におけるクローン性の染色体異常の獲得に深く関わっているものと推測した。さらに、5番染色体のCDRには、TGF- β の発現を抑制的に調節するマイクロRNA miR-145が位置しており、miR-145のハプロ不全に伴いTGF- β の発現亢進をきたすことから、5番7番染色体の欠失により、miR-145を介したTGF- β の活性化、TP53変異の獲得、およびCUX1機能不全によるATM/ATRを介するDNA修復機構の異常が共同し、腫瘍性幹細胞の増殖・クローン性進化を獲得する病態機序が予想されることから本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では骨髄系悪性腫瘍細胞において、5番染色体長腕欠損および7番染色体長腕欠損(del(5q)/del(7q))によりCUX1のハプロ不全およびmiR-145のハプロ不全がクローン性進化を獲得する分子機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究ではまずCUX1機能不全細胞の樹立を行い、TGF- β 発現に伴うDNA修復不全の変化を検討する。CUX1機能不全細胞の樹立は、RNA干渉を用いてCUX1の発現低下を誘導し、ハプロ不全とほぼ同様の発現レベルの低下を誘導する。CUX1機能不全細胞は、白血病細胞株および造血幹細胞(CD34陽性細胞)で作成を行う。これらの細胞において、TGF- β の添加を行い、DNA修復能の評価を行う。DNA修復能の評価方法としては、VP16(etoposide)を添加し、DNA一本鎖切断を誘導した後の修復能をcomet assayを用いて損傷DNAの割合を評価する。また同様に、TGF- β の阻害剤を用いて、TGF- β の活性量を呈かせた状態で、DNA修復能の評価を行う。

続いて、TGF- β の発現量がDNA修復に与える影響を染色体欠失時においても同様に再現できるか、骨髄性白血病細胞株を用いて検証を行う。5番7番欠失を伴うKG-1細胞、5番欠失を伴うHL-60細胞、欠失がないSKM-1細胞を用い、TGF- β の強発現系またはmiR-145低発現系を作成し、TGF- β 阻害剤、miR-145阻害剤の併用下でのDNA修復能の評価を行う。

これらの結果をうけて患者由来の白血病細胞を用いて、TGF- β の発現量の変化に伴う細胞死の誘導能の評価を行う。

4 . 研究成果

まず、急性骨髄性白血病細胞株 (HL60) を用いて、CUX1 の翻訳領域を対象とした shRNA を用いて CUX1 低発現細胞株の樹立を行った。白血病細胞株に対する RNA 干渉はウイルスベクターを用いて導入を行った。RNA 干渉により CUX1 の発現は 15-50% 程度となったクローンが得られ、そのうち、実際の骨髄系腫瘍細胞における 7 番染色体欠失時のハプロ不全の程度と同程度と予想される発現量 20% のクローンの選択を行った。

HL60 細胞ではもともと 5 番染色体長腕が欠失していることから、miR-145 もハプロ不全となっているため、樹立した HL60/shCUX1 細胞が本研究の主目的である、CUX1/miR-145 両ハプロ不全であることを確認した。

親株である HL60 細胞を用いて、TGF 阻害剤の投与を行ったところ、HL60 細胞の増殖が誘導されることが見出された。その一方で、TGF 阻害剤と細胞周期依存性の殺細胞性抗がん剤 (AraC) の併用投与を行ったところ、抗腫瘍効果の減弱がみとめられた。一般的に殺細胞性抗がん剤は細胞増殖が強い場合には抗腫瘍効果も誘導されやすく、今回見出された事象は当初の予想とは異なる結果であることから、TGF の発現量における腫瘍細胞の増殖・細胞死誘導の複雑な機序が予想され、追加の検討をおこなっている。一方で、CUX1 低発現細胞株 (HL60/shCUX1) では腫瘍の増殖がコントロール細胞とくらべ抑制される傾向にあり、これらの CUX1 低発現細胞における、TGF- 阻害薬の併用を行い、現在 DNA 修復機構の評価を行っている。今後 miR-145 阻害剤の併用下での DNA 修復能の評価を行う予定である。

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