

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23912

研究課題名（和文）好中球エラスターゼを標的とした再発難治性急性白血病の病態解明と新規治療開発

研究課題名（英文）Identification of molecular mechanisms of neutrophil elastase in relapsed/refractory acute myeloid leukemia for developing novel therapies

研究代表者

川島 直実（Kawashima, Naomi）

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80844844

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：AML患者骨髄の遺伝子変異・発現解析により、CBF-AMLおよびNRAS変異を有する non-CBF AMLにおいてセリンプロテアーゼ遺伝子の一つであるPRTN3が高発現していることを明らかにした。PRTN3を欠失させたCBF-AML細胞株では、72時間で細胞周期停止を認めアポトーシスに至ることを見出した。これらの細胞のトランスクリプトーム解析により、PRTN3高発現がRasシグナル伝達亢進、MAPKリン酸化、細胞周期進行を引き起こす経路が示唆された。白血病マウスモデルにおいて、PRTN3欠失群で生存期間の延長を認め、同分子がAMLの維持・増殖に必須な蛋白であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CBF-AMLはAMLの中でも予後良好群とされるが、現行の治療法では約40%の患者が再発を来す現状は克服すべき課題である。CBF-AMLは染色体異常から生じるキメラ融合分子が白血病発症に関わると報告されているが、その発症、治療抵抗性獲得機序については十分明らかでなく、その解明とともに新規治療法の確立が望まれる。本研究では、難治性CBF-AML患者検体から新規に同定したセリンプロテアーゼ遺伝子PRTN3の機能解析により、AMLの維持・増殖に関わる既報にない機序が示唆された。この成果から、同分子が新規のAML治療標的として今後治療法開発につながる可能性があり、臨床的観点からも大きな意義がある。

研究成果の概要（英文）：We identified the overexpression of PRTN3 gene encoding one of serin proteases in bone marrow specimens from patients with core-binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML) or NRAS mutated non-CBF-AML. We analyzed the molecular biology and significance of PRTN3 in the proliferation and maintenance of AML cells by knocking down of PRTN3 using lentivirally transduced shRNA. When PRTN3 gene was knocked down, AML cell lines showed cell cycle arrest and were induced to apoptosis. Transcriptome analysis revealed the association between the regulation of Ras protein signal transduction and PRTN3 expression in AML. Furthermore, down regulation of PRTN3 showed improved survival in MLL-AF9 AML mice model. These results show its possibility to be a novel target of therapies for AML.

研究分野：血液内科

キーワード：急性骨髄性白血病 CBF-AML 好中球エラスターゼ セリンプロテアーゼ PRTN3

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病(AML)は5年生存率が約30~40%程度と治療が困難な疾患であるが、その中で約25%を占め、予後良好群とされている core binding factor-AML(CBF-AML)においても、現行の治療法では5年無病生存率は約60%と限定的であり、約40%の患者が再発を来す現状は克服すべき課題である。CBF-AMLは染色体異常 t(8;21)もしくは inv(16)/t(16;16)から生じるキメラ融合分子が白血病発症に関わっていると報告されているが、その発症、治療抵抗メカニズムについては十分明らかでなく、その解明とともに新規治療法の確立が望まれる。

我々は、CBF-AMLの再発難治性に関わる新規原因遺伝子を同定するために、再発 CBF-AML患者10例の初発時・寛解時・再発時の骨髄検体を用いて、全エクソンシーケンス、RNAシーケンス解析を行った。その結果、これらの検体で高頻度に19番染色体短腕上テロメア領域にクラスターを形成するセリンプロテアーゼ遺伝子群(ELANE, AZU1, PRTN3)に複数の新規異常転写産物を新たに見出した。この中の PRTN3 遺伝子異常転写産物の全長塩基配列をクローニングした結果、異常転写産物は正常 PRTN3 分子の C 末端の機能喪失を生じると考えられた。

既報において、これらセリンプロテアーゼ遺伝子は AML 患者骨髄で高発現しており、さらに健康骨髄ではこれら遺伝子群は GMP 分画で発現しているのに対して、AML 患者では HSC/Progenitor 分画にも高発現していることが報告されている。正常 PRTN3 分子はアポトーシス経路に関連する分子の cleavage、活性化、細胞増殖経路に抑制的に関与していることから、その機能喪失が骨髄系細胞の不死化、細胞増殖を導き白血病発症、治療抵抗性に関与する可能性が考えられた。CBF-AML 同様に、染色体転座により生じるキメラ遺伝子、PML-RARA が白血病発症に関わる急性前骨髄球性白血病において、セリンプロテアーゼの一種である ELA2 遺伝子の高発現および欠損マウスにおける白血病発症頻度の低下が報告されているが、白血病キメラ融合蛋白とセリンプロテアーゼの関わりについては詳細は明らかでない。

2. 研究の目的

本研究は、CBF-AMLの再発難治性・治療抵抗性メカニズムの解明をすべく、これまで我々が独自に同定したセリンプロテアーゼの発現異常と CBF-AML の発症機序および治療抵抗性との関わりについて着目し、その生物学的意義の解明、それらを標的とする治療の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) AML 患者におけるセリンプロテアーゼ異常発現の意義付け

自施設で蓄積している CBF-AML および CBF 以外の AML の患者検体を用いて、AML 細胞におけるセリンプロテアーゼ遺伝子転写産物の発現量について解析を行う。集積された当該症例の臨床情報および、網羅的遺伝子変異解析の結果と合わせて、セリンプロテアーゼ遺伝子の高発現と関連する AML 病型、染色体異常、遺伝子異常を同定し、それらを治療標的とするのに適した疾患群を抽出する。

(2) 正常 / 異常セリンプロテアーゼ転写産物の発現と CBF-AML 発症の機能解析(in vitro)

・ IL-3 依存性マウス骨髄系細胞 32D 細胞株にセリンプロテアーゼ遺伝子の正常型と変異型を導入し、IL3 非添加下での細胞増殖、細胞死の変化、G-CSF 添加刺激による分化誘導・抑制の評価を形態・表面抗原・mRNA 定量にて評価する。

・ AML 細胞株、マウス白血病細胞を用いて、shRNA による各セリンプロテアーゼ遺伝子のノックダウンを行い、ノックダウン細胞のトランスクリプトーム解析を行い、セリンプロテアーゼ発現と白血病の維持・発症に関わる分子、経路を同定する。

(3) 正常 / 異常セリンプロテアーゼ転写産物の発現と CBF-AML 発症の機能解析(in vivo)

C57/BL6J マウス骨髄細胞に MLL-AF9 融合遺伝子を導入したマウス白血病細胞モデルを用いて、マウス白血病細胞に正常あるいは変異型セリンプロテアーゼ遺伝子、もしくは同遺伝子に対する shRNA を蛍光色素とともに導入したのち再移植を行い、in vivo においてセリンプロテアーゼ遺伝子が AML の発症・進展に及ぼす影響を検討する。

4. 研究成果

(1) セリンプロテアーゼ遺伝子のうち PRTN3 分子に着目し自施設の AML 患者 49 例の骨髄検体を用いて PRTN3 発現量とキメラ融合遺伝子、遺伝子変異との相関を定量解析した結果、RUNX1-RUNX1T1 または CBFB-MYH11 を保有する CBF-AML および NRAS 遺伝子変異を有する non-CBF AML において有意に PRTN3 の発現亢進を認めた(図 1)。

(2) IL-3 依存性マウス骨髓系細胞 32D 細胞株に PRTN3 遺伝子の正常型と変異型を導入した。正常型 PRTN3 過剰発現 32D 細胞では cleaved caspase-3 の低下を認め、IL3 非添加下でアポトーシス細胞割合の有意な減少は認めず、正常型 PRTN3 単独の過剰発現に伴うアポトーシス抑制は確認できなかった。一方変異型導入 32D 細胞は IL-3 非依存環境下で 72 時間後にアポトーシスに至る細胞が正常型と比較し有意に減少し、変異型転写産物が骨髓系細胞の抗アポトーシス及び増殖に寄与し、CBF-AML の進展、治療抵抗性に関与していることが示唆された。これらの細胞株において G-CSF 添加による分化抑制は正常型・変異型ともに認めなかった。

次に、PRTN3 分子による白血病の維持・発症に関わる機序を解明するため、同分子のノックダウンによる AML 細胞株の増殖能を検討した。22 種のヒト白血病細胞株において PRTN3 の mRNA、蛋白発現を検討したところ、AML 患者検体と同様、RUNX1-RUNX1T1-AML 細胞株である Kasumi-1、SKNO-1 において同分子の高発現を認めた。また、これら細胞株は正常及び変異型遺伝子転写産物を共発現しており、正常型と変異型に共通する配列を標的とした shRNA を導入しこの分子をノックダウンすると、72 時間で G0-G1 停止を認め、有意にアポトーシス細胞が増加し、14 日以内に死滅することを見出した(図 2)。

次に PRTN3 のノックダウンにより抑制される経路を詳細に同定するため、同ノックダウン細胞より抽出した RNA を用い RNA シークエンスを実施した。その結果、PRTN3 を欠失させた Kasumi-1、SKNO-1 細胞株では共通して Ras シグナル伝達を制御する遺伝子群の発現低下を認めた。

中でも、RHOG、LIMK1 の有意な発現低下を定量 PCR により PRTN3 欠失 Kasumi-1、SKNO-1 両細胞株において確認した。また、同細胞株においてウェスタンブロットにより MAPK リン酸化の抑制を認めた。これらの結果から、CBF-AML 細胞において、PRTN3 高発現が RHOG、LIMK1 発現亢進を介して Ras シグナル伝達亢進を起こし、MAPK リン酸化、細胞周期進行を引き起こす経路が示唆された。

(3) C57/BL6J マウス骨髓細胞に MLL-AF9 融合遺伝子を導入したマウス白血病細胞モデルを作成した。

マウス骨髓細胞に正常型・変異型 PRTN3 を MLL-AF9 融合遺伝子と共発現させ、白血病化への影響を in vivo で検証した。変異型 PRTN3 導入群は正常型導入群よりも早期に死亡する傾向はみられたが統計的な有意差は認めず、この変異型転写産物による白血病化への影響は認められなかった。

次に shRNA を用いて PRTN3 欠失によるマウス白血病細胞モデルの生存への影響を検証した。まず白血病細胞株同様、PRTN3 を高発現していたこの白血病マウスモデルの骨髓細胞においても PRTN3 欠失細胞はコントロールより有意に早く死滅することが in vitro 確認された。同ノックダウン細胞をマウスにそれぞれ再移植し、in vivo で生存解析を行った。結果、コントロール群よりノックダウン群で有意に生存期間の延長を認めた(図 3)。以上より、PRTN3 分子が AML の維持・増殖に必須な蛋白である可能性が示唆された。

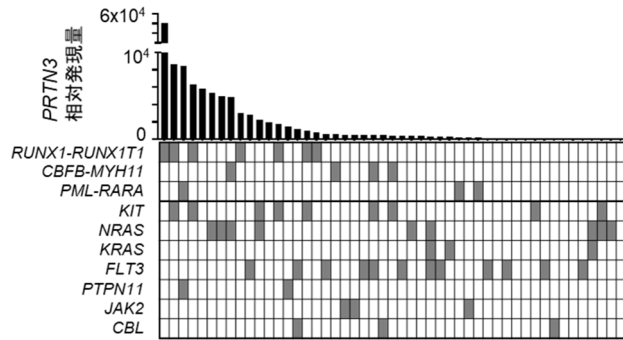


図1 PRTN3高発現例に認められたキメラ融合遺伝子・活性化キナーゼ遺伝子変異

図2 Kasumi-1細胞株におけるPRTN3 遺伝子欠失によるアポトーシス誘導

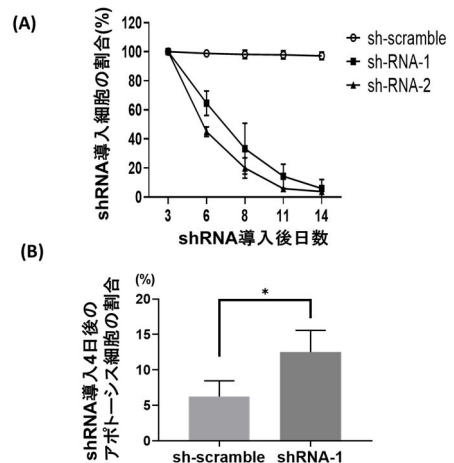
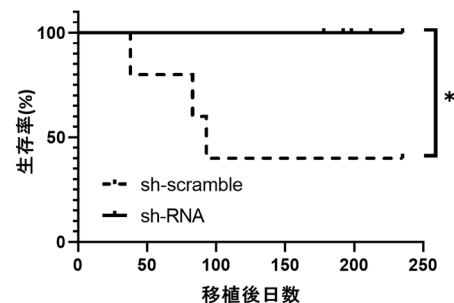


図3 PRTN3 遺伝子欠失AML細胞 移植マウスにおける生存の改善



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ishikawa Y, Kawashima N, Atsuta Y, Sugiura I, Sawa M, Dobashi N, Yokoyama H, Doki N, Tomita A, Kiguchi T, Koh S, Kanamori H, Iriyama N, Kohno A, Moriuchi Y, Asada N, Hirano D, Togitani K, Sakura T, Hagihara M, Tomikawa T, Yokoyama Y, Asou N, Ohtake S, Matsumura I, Miyazaki Y, Naoe T, Kiyoi H	4. 巻 4
2. 論文標題 Prospective evaluation of prognostic impact of KIT mutations on acute myeloid leukemia with RUNX1-RUNX1T1 and CBFβ-MYH11	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 66 ~ 75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2019000709	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kiyoi Hitoshi, Kawashima Naomi, Ishikawa Yuichi	4. 巻 111
2. 論文標題 FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: Therapeutic paradigm beyond inhibitor development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 312 ~ 322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14274	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawashima N, Ishikawa Y, Atsuta Y, Sawa M, Ozawa Y, Hayashi M, Kohno A, Tomita A, Maeda T, Sakaida E, Usuki K, Hagihara M, Kanamori H, Matsuoka H, Kobayashi M, Asou N, Ohtake S, Matsumura I, Miyazaki Y, Naoe T, Kiyoi H	4. 巻 111
2. 論文標題 Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation at the first remission for younger adults with FLT3 internal tandem duplication AML: The JALSG AML209 FLT3 SCT study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2472 ~ 2481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14448	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sato Takahiko, Kawashima Naomi, Ito Masafumi, Atsuta Yoshiko, Kagaya Yusuke, Seto Aika, Morishita Takanobu, Fukushima Nobuaki, Ozawa Yukiyasu, Miyamura Koichi	4. 巻 3
2. 論文標題 Day 0 bone marrow pathology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is a novel prognostic factor in myeloid malignancies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BLOOD CELL THERAPY / The official journal of APBMT	6. 最初と最後の頁 84 ~ 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.31547/bct-2020-007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 川島直実、石川裕一、熱田由子、澤正史、小澤幸泰、林正樹、河野彰夫、富田章裕、前田智也、堺田恵美子、臼杵憲祐、萩原真紀、金森平和、松岡広、小林美希、麻生範雄、大竹茂樹、松村到、宮崎泰司、直江知樹、清井仁
2. 発表標題 FLT3-ITD変異陽性AMLに対する第一寛解期での同種造血幹細胞移植：JALSG AML209-FLT3-SCT試験結果
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawashima N, Ishikawa Y, Atsuta Y, Sawa M, Ozawa Y, Hayashi M, Kohno A, Tomita A, Maeda T, Sakaida E, Usuki K, Hagihara M, Kanamori H, Matsuoka H, Kobayashi M, Asou N, Ohtake S, Matsumura I, Miyazaki Y, Naoe T, Kiyoi H
2. 発表標題 Prospective Evaluation of Allogeneic HSCT at the First Remission for Younger Adults with FLT3 -ITD Positive Acute Myeloid Leukemia: The JALSG AML209-FLT3-SCT Study
3. 学会等名 60th ASH Annual Meeting and Exposition (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川島直実、石川裕一、金貞姫、後藤辰徳、西山誉大、木原里香、綿本浩一、小澤幸泰、北村邦朗、清井仁
2. 発表標題 FLT3-ITD変異陽性急性骨髄性白血病患者におけるGilteritinib治療感受性と白血病クローン進化の解析
3. 学会等名 第117回日本内科学会講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川島直実、石川裕一、金貞姫、木原里香、西山誉大、後藤辰徳、森下喬允、中島麻梨絵、牛島洋子、池野世新、綿本浩一、北村邦朗、小澤幸泰、清井仁
2. 発表標題 Upregulation of adhesion molecules associates with PDX-specific clonal expansion and R/R AML
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

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