

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：20101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23921

研究課題名（和文）Kaiso, P120複合体を標的としたリンパ系腫瘍に対する新規治療法の開発

研究課題名（英文）Role of KAISO and P120 complex in lymphoid leukemia

研究代表者

堀口 拓人 (Horiguchi, Hiroto)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：70634674

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）：急性B細胞性リンパ性白血病細胞株（BALL-1、HAL-01、NALM-6）、T細胞性リンパ性白血病細胞株（TALL、MOLT-4、Jurkat）および正常成人B細胞、正常成人T細胞を購入した。RNAはTRIzolを用いて採取した。RT-qPCRでは、KAISO mRNAはB細胞性リンパ性白血病細胞株のBALL-1、HAL-01で有意に正常B細胞と比較して低下しており、3種類すべてのT細胞性リンパ性白血病細胞株で有意に正常T細胞より低下していた。また、カテニン（P120）mRNAはすべての細胞株でそれぞれ正常B細胞、正常T細胞と比較し優位に低下していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性リンパ性白血病におけるKAISO mRNAの発現は、多くの細胞株で正常B細胞、正常T細胞と比較し、優位に低下していることが明らかとなったが、その一部の細胞株では低下していなかった。一方で、KAISOの関連分子であるCatenin delta-1のmRNAの急性リンパ球性白血病株での発現は、正常のB細胞とT細胞と比較し、すべての白血病細胞株で有意に低下していた。このことは、KAISOやCatenin delta-1が治療の標的となりえることが、期待される。

研究成果の概要（英文）：We purchased acute leukemia cell lines (BALL-1, HAL-01, NALM-6, TALL, MOLT-4, and Jurkat). They were cultured and their RNAs were extracted by using TRIzol. Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) revealed that KAISO mRNAs of BALL-1 and HAL-01 were significantly decreased than normal B cell and KAISO mRNAs of TALL, MOLT-4, and Jurkat were significantly decreased than normal T cell. Moreover, Catenin delta-1 mRNAs of all B cell leukemia lines and T cell leukemia cell lines were significantly decreased than normal B cell and T cell, respectively.

研究分野：血液

キーワード：KAISO リンパ性白血病

1. 研究開始当初の背景

近年の低分子化合物の開発手法の進歩により、細胞内の様々な因子を分子標的とした研究が可能となった。BCL2 阻害剤、BRAF 阻害剤の他、最近では、ジンクフィンガーを有する BTB/POZ (broad complex, tramtrack, bric à brac/pox virus and zinc finger) ファミリーの一つである BCL6 の阻害がび慢性大細胞型リンパ腫 (DLBCL) において有効であることが報告された [Cardenas MG, et al. J Clin Invest. 2016.]。BTB/POZ ファミリーは、そのドメインにより多彩な機能を発揮するが、中でも KAISO (ZBTB33) は、メチル化 CpG 配列 (CGCG) と非メチル化配列 (TCCTGCNA) の 2 つの特異的な配列に結合し相反する作用をもつ特殊な転写因子で有ると共に、一定の条件下では細胞質において KAISO- カテニン (P120) 複合体として存在する。血球細胞では、KAISO- カテニン (P120) 複合体は、血液細胞特異的な GTPase である RHOH と結合し核内移行し、Bcl6 の発現増加を誘導する。申請者は、RhoH ノックアウトマウスを用いて解析した結果、早期に脾腫大を呈し DLBCL を発症することを見出した (論文投稿中)。更に自然発生腫瘍から樹立したマウス B 細胞リンパ腫細胞株を用いて、詳細な検討をおこなった結果、KAISO- カテニン (P120) 複合体は Bcl2 の発現減少と P53 増加を誘導するのみならず、KAISO は P53 と直接結合することで、その機能を制御することを明らかとした。このことから、KAISO は、カテニン (P120)-RHOH-P53 と複合体を形成して抗腫瘍効果を発揮し、このシステムに異常が生じることで腫瘍化が促進されることが推定された。

2. 研究の目的

血液腫瘍に対する化学療法や分子標的療法は日々進歩をとげており、B 細胞系特異的な分子標的治療や造血幹細胞移植により、リンパ系腫瘍に対する治療成績の進歩を見せているものの、再発難治性リンパ増殖性疾患に対する治療成績は満足のものではなく、新たな治療戦略の開発が望まれている。

RHOH (TTF) は血液細胞に特異的に発現する GTPase が欠損した RhoGTPase であり、ヒトび慢性大細胞 B リンパ腫 (DLBCL) で BCL6 の転座相手として初めて同定されている。この RHOH が Kaiso と結合することが報告されており [Mino A, et al. small GTPase. 2016]、KAISO (ZBTB33) は、ジンクフィンガーを有する特殊な転写因子であり、メチル化 CpG 配列と非メチル化配列の 2 つの特異的な配列に結合することで 2 峰性に働く想定されている。RHOH の他にがん抑制遺伝子としてよく知られている P53、細胞周期に重要な分子であるサイクリン D、そして近年スーパーエンハンサーである CTCF との結合することが報告されている。これらに基づいて、DLBCL 細胞で変異した RHOH により KAISO との結合性が変わり、DLBCL 細胞に変化を起こすことが推測され、申請者は、造血細胞においては、KAISO- カテニン複合体は RHOH と結合した後に核内移行することを突き止め、RHOH をノックアウトすると KAISO の核内移行が抑制され、リンパ増殖性疾患が自然発症することをマウスモデルで突き止めた (論文投稿中)。

本研究ではヒトの急性リンパ性白血病における KAISO- カテニンの意義を明らかとし、最終的には KAISO 複合体を標的とした新規治療の確立を目指すものである。

3. 研究の方法

B 細胞性白血病細胞株 (BALL-1, HAL-01, NALM-6) と T 細胞性白血病細胞株 (TALL, MOLT-4, Jurkat) および正常 B リンパ球と正常 T リンパ球を購入した。

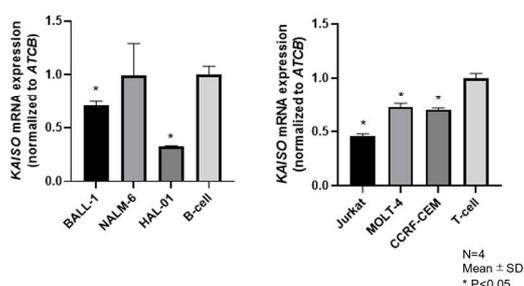
- (1) KAISO, P120 および RHOH の発現の比較: 細胞株から、RIPA buffer を用いて Whole lysate および分画キット (Pierce NE-PER Nuclear Cytoplasmic Extraction Reagents) を用いて細胞質分画と核分画のタンパクを抽出した。抽出した Lysate は BCA protein assay kit を用いて蛋白の濃度測定、蛋白量をそろえた上で、複合体を形成する KAISO, P120 および RHOH のタンパク発現を Western blot で比較した。
- (2) 腫瘍細胞の RNA 発現量の比較: 細胞株から TRIzol を用いて、RNA を抽出し、RT - qPCR法で KAISO, RHOH や CCND1 などの遺伝子発現を比較した。

4. 研究成果

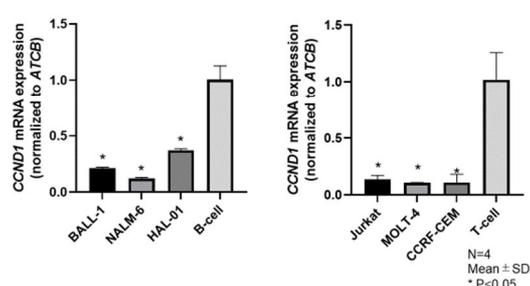
急性 B 細胞性リンパ性白血病細胞株 (BALL-1, HAL-01, NALM-6) T 細胞性リンパ性白血病細胞株 (TALL, MOLT-4, Jurkat) および正常成人 B 細胞、正常成人 T 細胞を購入した。購入したリンパ性白血病細胞株、正常 B 細胞、正常 T 細胞は、RIPA buffer を用いて Whole lysate を作成し、Pierce NE-PER Nuclear Cytoplasmic Extraction Reagents を用いて細胞質分画と核分画のタンパクを抽出した。BCA protein assay kit を用いて蛋白の濃度測定、蛋白量をそろえ、Western blot での蛋白発現量の比較を行った。Whole lysate では、わずかに KAISO の発現を確認できる程度であり、比較は困難であった。また、細胞質と核分画に分画化した lysate では、抽出された蛋白濃度が低値であり、Western blot での KAISO の発現を確認はできなかった。

RT - qPCR では、KAISO mRNA は B 細胞性リンパ性白血病細胞株の BALL-1, HAL-01 で有意に正常 B 細胞と比較して低下しており、3 種類すべての T 細胞性リンパ性白血病細胞株で有意に正常 T 細胞より低下していた。(左図) また、カテニン (P120) mRNA はすべての細胞株でそれぞれ正常 B 細胞、正常 T 細胞と比較し優位に低下していることが明らかとなった。(右図) このことは、KAISO や Catenin delta-1 が治療の標的となりえることが、期待される。

KAISO mRNA expressions in ALL cell lines



Catenin delta-1 (CCND1) mRNA expressions in ALL cell lines



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Iyama S, Tatsumi H, Shiraishi T, Yoshida M, Tatekoshi A, Endo A, Ishige T, Shiwa Y, Iyata S, Goto A, Nagashima K, Horiguchi H, Fujita C, Ikeda H, Takada K, Nobuoka T, Kamihara Y, Kikuchi S, Sato T, Ohnishi H, Yokota S, Kobune M	4. 巻 83
2. 論文標題 Possible clinical outcomes using early enteral nutrition in individuals with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: A single-center retrospective study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nutrition	6. 最初と最後の頁 111093 ~ 111093
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nut.2020.111093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Horiguchi H, Kobune M, Ono K, Shimoyama S, Fujita C, Goto A, Ikeda H, Iyama S
2. 発表標題 CD34+ Positive Myelodysplastic Cells with Ring Sideroblasts or SF3B1 Mutation Produce High Erythroferrone and GDF15.
3. 学会等名 62nd ASH Annual Meeting and Exposition (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fukushima K, Chi S, Shibayama H, Hosono N, Yamauchi T, Katagiri S, Gotoh A, Morishita T, Yanada M, Yamamoto K, Fujishima N, Takahashi N, Ogasawara R, Kondo T, Utsu Y, Aotsuka N, Usuki K, ONO T, Kobayashi T, Kuroda J, Horiguchi H, Iyama S, Fukuhara S, Izutsu K, Nakamura M, Kojima K, Miyamoto K, Minami Y
2. 発表標題 Genomic Analysis of FLT3 Mutations in a Comprehensive NGS Multicenter Study of AML: HM-Screen-Japan 01
3. 学会等名 62nd ASH Annual Meeting and Exposition (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀口拓人
2. 発表標題 輸血後鉄過剰症が引き起こす細胞・臓器障害
3. 学会等名 第68回 日本輸血・細胞治療学会学術総会 (招待講演)
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
---------	---------