

機関番号：17401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20591135

研究課題名 (和文) PU.1 により誘導される骨髄腫細胞の増殖停止及び細胞死の機序の解明と治療への応用

研究課題名 (英文) Elucidation of the mechanisms of growth arrest and apoptosis of myeloma cells induced by PU.1 that may result in new molecular target therapy of multiple myeloma patients

研究代表者

奥野 豊 (OKUNO YUTAKA)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：80363539

研究成果の概要 (和文)：我々はこれまで、正常の形質細胞においてPU.1が発現維持されていること、これに対して多くの骨髄腫細胞株及び一部の患者骨髄腫細胞においてPU.1の発現が低下していることを報告、更に PU.1の発現が低下している骨髄腫細胞株U266、KMS12PEにconditionalにPU.1を発現すると、細胞増殖停止及び細胞死が起こることを報告した。我々は更にこの細胞増殖停止及び細胞死のメカニズムを調べるために、PU.1発現前後で発現量が変化する遺伝子の検索を行い、細胞死に関わる遺伝子群の中ではTRAILのみがU266、KMS12PEともにPU.1発現後に上昇、細胞増殖停止に関わる遺伝子群ではU266でp21^{WAF1/CIP1}の発現が上昇していた。そこで、まず我々はTRAILに着目し、tet-offの系を用いてconditionalにPU.1を発現するU266^{tetPU.1}、KMS12PE^{tetPU.1}骨髄腫細胞株にTRAILに対するsiRNAをstableに発現させてTRAILの発現を抑制した。するとPU.1発現を発現させてもこれらの細胞株の細胞死が抑えられることがわかった。以上より、PU.1発現による骨髄腫細胞の細胞死にTRAILが関与していることが示された (Ueno et al, Oncogene. 2009; 28:4116-4125)。我々はさらにU266^{tetPU.1}細胞のp21の発現上昇をsiRNAで抑えてp21の増殖停止における関与を調べた。その結果細胞増殖停止の一部が解除されたことから、U266^{tetPU.1}細胞のPU.1による増殖停止には一部p21^{WAF1/CIP1}が関与していることが示唆された。

我々は更に本来B細胞に発現しているPU.1が発現低下しているB細胞の腫瘍であるHodgkinリンパ腫においてその意義を調べることにした。実際には骨髄腫細胞株U266、KMS12PEで行ったと同様にtet-offの系を用いてHodgkinリンパ腫細胞株L-428にPU.1をconditionalに発現させた。すると骨髄腫細胞株と同様に完全な細胞増殖停止と一部アポトーシスを認めた。従って、PU.1の発現誘導がHodgkinリンパ腫においてもその治療に有力な分子標的療法として利用可能であることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：We reported that PU.1 is down-regulated in primary myeloma cells of some patients and most of myeloma cell lines whereas PU.1 is expressed in normal plasma cells. We conditional expressed PU.1 in myeloma cell lines, U266 and KMS12PE, and found that PU.1 induced growth arrest and apoptosis in both cell lines, suggesting that down-regulation of PU.1 is necessary for myeloma cell growth. To elucidate the mechanisms of growth arrest and apoptosis, we performed DNA microarray analysis to compare the gene expressions between before and after PU.1 induction. Among apoptosis related genes, TRAIL is highly up-regulated in both U266 and KMS12PE cells, while among cell cycle related genes, p21^{WAF1/CIP1} is up-regulated in only in U266 cells. Stably expressed siRNA for TRAIL inhibited apoptosis of highly PU.1-expressing U266 and KMS12PE cells, suggesting that TRAIL may have a crucial role in the PU.1-induced apoptosis. In addition, stably expressed siRNA for p21^{WAF1/CIP1} partially rescued U266 cells expressing PU.1 from growth arrest, suggesting that the growth arrest of U266 cells induced by PU.1 should be at least in part dependent on p21^{WAF1/CIP1} up-regulation.

It has been reported that in classical Hodgkin lymphoma cells, PU.1 is also down-regulated through methylation of its promoter. To evaluate whether down-regulation

of PU.1 is necessary for growth of classical Hodgkin lymphoma cells, we also conditionally expressed PU.1 in two classical Hodgkin lymphoma cell lines, L428 and KMH2, using the tet-off system. Up-regulation of PU.1 induced growth arrest and apoptosis of L428 and KMH2 cells. Thus, up-regulation of PU.1 by demethylation agents and/or HDACI might serve as a possible treatment modality for multiple myeloma and classical Hodgkin lymphoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：内科臨床医学・血液内科

キーワード：多発性骨髄腫、PU.1、TRAIL、細胞死、p21、細胞増殖停止、Hodgkin リンパ腫

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫細胞株では PU.1 の発現が低下していることが報告されており、我々もそれを Real Time PCR を用いて確認した。我々はさらに多発性骨髄腫患者由来の骨髄腫細胞において一部の症例において PU.1 の発現が低下しており、その予後が他の患者に比べ不良であること、さらに PU.1 非発現骨髄腫細胞株 U266 と KMS12PE に tet-off の系を用いて PU.1 を conditional に発現させると細胞増殖停止と細胞死が誘導されることを報告した (Tatetsu H et al. **Cancer Res.** 2007;67:5328-5336)。我々はまた PU.1 非発現骨髄腫細胞株において PU.1 の発現低下のメカニズムとして PU.1 遺伝子のプロモーター及び 17 kb 上流にあるエンハンサー領域のメチル化が主に関わっていることを報告している

2. 研究の目的

脱メチル化剤を初めとする PU.1 を発現誘導する薬剤が多発性骨髄腫で PU.1 発現低下を伴っている症例に有効である可能性があり、

そのような薬剤を開発していく為に、PU.1 による骨髄腫細胞の細胞増殖停止と細胞死が誘導されるメカニズムについて解析することとした。PU.1 によって誘導される遺伝子群とその生物活性を明らかにし、その癌抑制遺伝子としての機能を明らかにしていく。これにより PU.1 発現により発現誘導されてくる下流の重要な遺伝子を標的にした分子標的療法の開発も可能となると考えた。

3. 研究の方法

我々は PU.1 非発現骨髄腫細胞株 U266 と KMS12PE に tet-off の系を用いて PU.1 を conditional に発現する前後で RNA を抽出し、PU.1 発現前、発現後 day1、day3 の RNA を用いて、DNA microarray を行い、細胞増殖及び細胞死に関わる遺伝子群で発現の大きく変化する遺伝子を検索し、実際に PU.1 による骨髄腫細胞の増殖停止ないしは細胞死に関わっているかどうか siRNA などを用いて直接検証していく。

4. 研究成果

骨髄腫細胞株 U266、KMS12PE に conditional

にPU.1を発現すると、細胞増殖停止及び細胞死が起こるが、我々は更にこの細胞増殖停止及び細胞死のメカニズムを調べるために、PU.1発現前後で発現量が変化する遺伝子の検索を行い、細胞死に関わる遺伝子群の中ではTRAILのみがU266、KMS12PEともにPU.1発現後に上昇、細胞増殖停止に関わる遺伝子群ではU266でp21^{WAF1/CIP1}の発現が上昇していた。そこで、まず我々はTRAILに着目し、tet-offの系を用いてconditionalにPU.1を発現するU266^{tetPU.1}、KMS12PE^{tetPU.1}骨髄腫細胞株にTRAILに対するsiRNAをstableに発現させてTRAILの発現を抑制した。するとPU.1発現を発現させてもこれらの細胞株の細胞死が抑えられることがわかった。以上より、PU.1発現による骨髄腫細胞の細胞死にTRAILが関与していることが示された(Ueno et al, Oncogene. 2009; 28:4116-4125)。我々はさらにU266^{tetPU.1}細胞のp21の発現上昇をsiRNAで抑えてp21の増殖停止における関与を調べた。その結果細胞増殖停止の一部が解除されたことから、U266^{tetPU.1}細胞のPU.1による増殖停止には一部p21が関与していることが示唆された。我々は更に本来B細胞に発現しているPU.1が発現低下しているB細胞の腫瘍であるHodgkinリンパ腫においてその意義を調べることとした。実際には骨髄腫細胞株U266、KMS12PEで行ったと同様にtet-offの系を用いてHodgkinリンパ腫細胞株L-428にPU.1をconditionalに発現させた。すると骨髄腫細胞株と同様に完全な細胞増殖停止と一部アポトーシスを認めた。従って、PU.1の発現誘導がHodgkinリンパ腫においてもその治療に有力な分子標的療法として利用可能であることが示唆された。

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. Ueno, S., Tatetsu, H., Hata, H., Iino, T., Niino, H., Akashi, K., Tenen, D.G., Mitsuya, H., and Okuno, Y. (2009). PU.1 induces apoptosis in myeloma cells through direct transactivation of TRAIL. *Oncogene* 28, 4116-4125. 査読有
2. Kikukawa, Y., Okuno, Y., Tatetsu, H., Nakamura, M., Harada, N., Ueno, S., Kamizak, i.Y., Mitsuya, H., and Hata, H. (2008). Induction of cell cycle arrest and apoptosis in myeloma cells by cepharanthine, a biscochlorine alkaloid. *Int J Oncol* 33, 807-814. 査読有

3. Huang, G., Zhang, P., Hirai, H., Elf, S., Yan, X., Chen, Z., Koschmieder, S., Okuno, Y., Dayaram, T., Gowney, J.D., et al. (2008). PU.1 is a major downstream target of AML1 (RUNX1) in adult mouse hematopoiesis. *Nat Genet* 40, 51-60. 査読有

[学会発表] (計7件)

1. 河野 和、CD125-Expressing Myeloma: A Subgroup of Multiple Myeloma (MM) with Immature Phenotype, Endoplasmic Reticulum Stress Response and Low Sensitivity to Bortezomib アメリカ血液学会 2010年12月6日、Orange County Convention Center, オーランド、米国
2. 河野 和、Production of TRAIL by Multiple Myeloma Cells: a Potential Prediction Marker for Skeletal-Related Events アメリカ血液学会 2010年12月5日、Orange County Convention Center, オーランド、米国
3. 幸 宏道、PU.1 may act as a tumor suppressor for Hodgkin lymphoma cells 日本血液学会 2010年9月25日、パシフィコ横浜、横浜
4. 上野志貴子、PU.1発現による骨髄腫細胞株のアポトーシスにはTRAILが、増殖抑制にはp21が関与する 日本血液学会 平成21年10月23日、京都国際会議場、京都
5. 奥野 豊、PU.1-induced growth arrest of Hodgkin lymphoma cell line, L-428 日本癌学会 2009年10月1日、パシフィコ横浜、横浜
6. 上野志貴子、Conditionally expressed

PU.1 transactivates TRAIL gene and induces apoptosis in myeloma cell lines アメリカ血液学会 2008年12月6日、、サンフランシスコ、Moscone Center、米国

7. 上野志貴子、PU.1 発現による骨髄腫細胞の増殖抑制及び細胞死のメカニズムの解析 日本血液学会 2008年10月11日、京都国際会議場、京都

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥野 豊 (OKUNO YUTAKA)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：80363539

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：