

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08400

研究課題名(和文) 高リスク染色体異常を有する新規白血病細胞株を応用した抗がん剤耐性機構の解明

研究課題名(英文) Investigating molecular basis of chemoresistance using a novel leukemia cell line harboring high-risk chromosome abnormalities

研究代表者

國本 博義 (KUNIMOTO, Hiroyoshi)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：80464923

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)：inv(3)/t(3;3)と-7を有する白血病細胞に感受性を示す化合物を探索するための薬剤スクリーニングの結果、EZH2阻害剤がinv(3)/t(3;3)と-7を有するYCU-AML1とOCI-AML20に高い感受性を示した。In vitro培養系を用いた解析でも、EZH2阻害剤はYCU-AML1、OCI-AML20の細胞増殖を有意に抑制し、効率的にアポトーシスを誘導することが示された。本白血病細胞でEZH2阻害がアポトーシスを誘導する分子経路を検証するため、RNA・CUT&Tagシーケンスを実施し、GADD45g-p38-p53経路の活性化がアポトーシス誘導に必須の役割を担うことが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床的に予後不良なinv(3)/t(3;3)と-7の両者を有するMDS/AML細胞の細胞増殖を抑制し効率的にアポトーシスを誘導する分子標的薬としてEZH2阻害剤を見出すことに成功した。in vitro培養系のみならずin vivo生体モデルでもEZH2阻害剤はYCU-AML1によるヒト白血病発症能を抑制することも確認した。その分子基盤として、GADD45g-p38-p53経路の活性化がEZH2阻害によるアポトーシス誘導に必須であることを明らかにし、定常状態における本経路の抑制がinv(3)/t(3;3)と-7を有する白血病のアポトーシス回避に重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Drug screen assay revealed that multiple EZH2 inhibitors show pharmacological activity against YCU-AML1 and OCI-AML20 cells, two human AML cell lines harboring both inv(3)/t(3;3) and -7. In vitro culture with EZH2 inhibitors significantly suppressed cell growth of YCU-AML1 and OCI-AML20 cells. In addition, EZH2 inhibition efficiently induced apoptosis in these AML cell lines. In order to seek the exact molecular basis of EZH2 inhibitor-mediated apoptosis induction in YCU-AML1 and OCI-AML20 cells, we performed RNA-seq and CUT&Tag-seq. These omics data revealed that GADD45g-p38-p53 axis is activated upon EZH2 inhibition in these cells and that epigenetic silencing of GADD45g-p38-p53 axis is a major molecular mechanism by which high-risk MDS/AML cells with inv(3)/t(3;3) and -7 evade apoptosis cell death.

研究分野：血液・腫瘍内科

キーワード：YCU-AML1 OCI-AML20 EZH2 apoptosis GADD45g p38 p53

1. 研究開始当初の背景

3 番染色体の逆位・転座(inv(3)/t(3;3))を有する骨髄異形成症候群・急性骨髄性白血病は高率に7番染色体の欠失(-7)を合併し、両者を有する患者群は5年生存率約0%と極めて予後が悪い。しかしinv(3)/t(3;3)と-7がどのように協調して抗がん剤に耐性を示す予後不良な白血病を発症させるのか、詳細な分子メカニズムは不明である。

2. 研究の目的

初年度の研究からinv(3)/t(3;3)のみを有する細胞に比べてinv(3)/t(3;3)と-7を有する白血病細胞の方が抗がん剤シタラピンへの耐性を示すという仮説は成立しないことが判明した。そのためinv(3)/t(3;3)と-7を有する白血病細胞特異的に薬剤感受性を示す化合物を網羅的に探索すること、並びにそこで得られた候補化合物による詳細な薬効の評価並びに薬効が発揮される分子メカニズムを明らかにすることを目的として研究を進めることとした。

3. 研究の方法

上記研究目的を達成するため、下記の方法並びに研究計画を立案した。

(1) inv(3)/t(3;3)と-7を有する白血病細胞 YCU-AML1 と OCI-AML20 に薬剤感受性を示す化合物を網羅的に探索するために Tocriscreen 2.0 を用いて解析した。

(2) 実験(1)で見出した EZH2 阻害剤に着目し、inv(3)/t(3;3)単独株(MUTZ-3、Kasumi-3、HNT-34)、inv(3)/t(3;3)と-7を有する細胞株(YCU-AML1、OCI-AML20)を液体培養液中で EZH2 阻害剤存在下に培養し、MUTZ-3、Kasumi-3、HNT-34 に比べ YCU-AML1、OCI-AML20 において増殖能が阻害されるのかを明らかにする。

(3) inv(3)/t(3;3)と-7を有する白血病細胞で EZH2 の阻害により細胞周期進展の抑制並びにアポトーシス誘導がより効率的に観察されるのかを検討するため、実験(2)で培養した細胞を回収し、Ki67/DAPI 染色並びに Annexin V/DAPI 染色を行う。inv(3)/t(3;3)単独細胞株に比べ inv(3)/t(3;3)と-7を有する細胞株で増殖期分画(Ki67⁺/DAPI⁺)の割合が低く、アポトーシス誘導分画(Annexin V⁺/DAPI⁺)の割合が高いのかを明らかにする。

(4) エピゲノム因子 EZH2 が inv(3)/t(3;3)と-7の両者を有する白血病細胞のアポトーシス回避に関わる分子経路を明らかにするため、賦形剤または EZH2 阻害剤で治療後の YCU-AML1 及び OCI-AML20 から DNA/RNA を抽出し、CUT&Tag シーケンスと RNA シーケンスを実施する。これによりエピゲノム因子 EZH2 が直接その転写を制御する下流因子のうち、inv(3)/t(3;3)と-7の両者を有する白血病細胞のアポトーシス回避に関わる分子を同定していく。

4. 研究成果

inv(3)/t(3;3)と-7を有する白血病細胞に薬剤感受性を示す化合物を網羅的に探索するために Tocriscreen 2.0 を用いて解析したところ、EZH2 に対する阻害剤が inv(3)/t(3;3)と-7を有する YCU-AML1 と OCI-AML20 に特異的に高い感受性を示すことが確認された。In vitro 培養系を用いて、EZH2 阻害剤を培養液に添加して増殖曲線を解析した結果、YCU-AML1、OCI-AML20 及び UCSD-AML1 では細胞増殖が阻害剤添加により有意に抑制されたのに対して、Mono-7 と Kasumi-3 では増殖は抑制されなかった。以上から EZH2 阻害剤は inv(3)/t(3;3)と-7を有する白血病細胞特異的に増殖抑制効果を発揮することが示された。アポトーシス解析では、EZH2 阻害剤存在下で培養した細胞ではコントロールに比べて Annexin V⁺分画の有意な増加を認めたのに対して、増殖期にある DAPI⁺ Ki67⁺分画の減少は認められなかった。以上から EZH2 阻害剤は YCU-AML1、OCI-AML20 に効率的にアポトーシスを誘導することが示された。更に EZH2 阻害剤処理後の YCU-AML1 細胞を免疫不全マウス NSG に移植したところ、薬剤未処理の細胞レシピエントではマウス体内でヒト AML の発症が見られたのに対して、EZH2 処理後の細胞レシピエントでは AML 発症が大幅に遅延し、全生存期間も有意な延長が示された。これらの白血病細胞において EZH2 阻害がアポトーシスを誘導する分子経路を明らかにする

ため、RNA・CUT&Tag シーケンスを実施した結果、GADD45g-p38-p53 経路の活性化がアポトーシス誘導に必須の役割を担っていることが判明し、定常状態では inv(3)/t(3;3) と -7 を有する白血病細胞はエピゲノム制御による GADD45g-p38-p53 経路の抑制によりアポトーシス回避を誘導することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7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 Kunimoto Hiroyoshi, Miura Ayaka, Maeda Ayaka, Tsuchida Naomi, Uchiyama Yuri, Kunishita Yosuke, Nakajima Yuki, Takase-Minegishi Kaoru, Yoshimi Ryusuke, Miyazaki Takuya, Hagihara Maki, Yamazaki Etsuko, Kirino Yohei, Matsumoto Naomichi, Nakajima Hideaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Clinical and genetic features of Japanese cases of MDS associated with VEXAS syndrome	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-023-03598-8	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 -

1. 著者名 Tanaka Atsushi, Kunimoto Hiroyoshi et al.	4. 巻 140
2. 論文標題 Aberrant <i>EVI1</i> splicing contributes to <i>EVI1</i> -rearranged leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 875 ~ 888
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2021015325	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 -

1. 著者名 Teshigawara-Tanabe Haruka, Hagihara Maki, Aoki Jun, Koyama Satoshi, Takahashi Hiroyuki, Nakajima Yuki, Kunimoto Hiroyoshi, Tachibana Takayoshi, Miyazaki Takuya, Matsumoto Kenji, Tanaka Masatsugu, Yamazaki Etsuko, Fujisawa Shin, Kanamori Heiwa, Taguri Masataka, Nakajima Hideaki	4. 巻 27
2. 論文標題 Clinical risk factors for patients with myelodysplastic syndromes undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hematology	6. 最初と最後の頁 620 ~ 628
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/16078454.2022.2052601	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 -

1. 著者名 Ohashi Takuma, Takase-Minegishi Kaoru, Maeda Ayaka, Hamada Naoki, Yoshimi Ryusuke, Kirino Yohei, Teranaka Hiroshi, Kunimoto Hiroyoshi, Hagihara Maki, Matsumoto Kenji, Namkoong Ho, Horita Nobuyuki, Nakajima Hideaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Incidence and Risk of Hematological Adverse Events Associated With Immune Checkpoint Inhibitors: A Systematic Literature Review and Meta-Analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 66 ~ 74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14740/jh1090	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 -

1. 著者名 Soma Shunsuke, Murakami Koichi, Fukuchi Yumi, Kunimoto Hiroyoshi, Nakajima Hideaki	4. 巻 42
2. 論文標題 O-Linked N-Acetylglucosamine Transferase Ensures Survival of Mouse Fetal Liver Hematopoietic Progenitors Partly by Regulating Bcl-xL and Oxidative Phosphorylation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Stem Cells	6. 最初と最後の頁 55 ~ 63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/stmcls/sxad076	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 -

1. 著者名 Knorr Katherine, Rahman Jahan, Erickson Caroline, Wang Eric, Monetti Mara, Li Zhuoning, Ortiz-Pacheco Juliana, Jones Andrew, Lu Sydney X., Stanley Robert F., Baez Maria, Fox Nina, Castro Cynthia, Marino Alessandra E., Jiang Caroline, Penson Alex, Hogg Simon J., Mi Xiaoli, Nakajima Hideaki, Kunimoto Hiroyoshi, et al.	4. 巻 4
2. 論文標題 Systematic evaluation of AML-associated antigens identifies anti-U5 SNRNP200 therapeutic antibodies for the treatment of acute myeloid leukemia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Cancer	6. 最初と最後の頁 1675 ~ 1692
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s43018-023-00656-2	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 -

1. 著者名 Ohashi Takuma, Kunimoto Hiroyoshi, Nukui Jun, Teshigawara Haruka, Koyama Satoshi, Miyazaki Takuya, Hagihara Maki, Matsumoto Kenji, Koshimizu Eriko, Tsuchida Naomi, Hamanoue Haruka, Miyatake Satoko, Yachie Akihiro, Matsumoto Naomichi, Nakajima Hideaki	4. 巻 119
2. 論文標題 A case of Bloom syndrome manifesting with therapy-related myelodysplastic syndromes harboring a novel BLM gene variant	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 603 ~ 607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-024-03751-x	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
研究 分 担 者	中島 秀明 (Nakajima Hideaki) (30217723)	横浜市立大学・医学研究科・教授 (22701)	

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