

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 18 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591051

研究課題名（和文） MLL-AF4 白血病の S100A6 分子病態と新規分子標的薬の開発

研究課題名（英文） physiomolecular analysis of S100A6 in leukemia with MLL/AF4

研究代表者

猪口 孝一 (INOKUCHI KOUICHI)

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号：10203267

研究成果の概要（和文）：

我々はマイクロアレイによる遺伝子発現 profiling を行いマウス造血幹細胞に MLL/AF4 遺伝子を導入することにより S100A-Calcium binding protein family の一つで細胞増殖に関与する S100A6 が発現を亢進させていることを明らかにした。(Exp Hematol 2009 37:701-14)。更に我々は S100A6 がどのように MLL/AF4 陽性 ALL の予後不良に関与しているかを検討し、通常造血幹細胞移植の後起こるドナー由来の T 細胞によるレシピエント由来の残存白血病に対する攻撃(GVL 効果)に MLL/AF4 陽性 ALL 白血病細胞が特異的に抵抗性を示すことを突き止めた。その原因に MLL/AF4 陽性 ALL では GVL 効果の主体となる TNF $\alpha$  に反応して S100A6 活性が上昇して P53 のアセチル化を阻害しアポトーシスの出現を免れていることを発見し報告した。さらに IL24 は TNF $\alpha$  によるアポトーシス誘導を回復させた。

研究成果の概要（英文）：

We showed that *MLL-AF4*-positive ALL cell lines are resistant to TNF- $\alpha$ . To examine the mechanism of resistance to TNF- $\alpha$  of *MLL-AF4*-positive leukemia, we focused on S100A6 as a possible factor. Upregulation of S100A6 expression and inhibition of the p53-caspase 8-caspase 3 pathway were observed only in *MLL-AF4*-positive ALL cell lines in the presence of TNF- $\alpha$ . The effect of S100A6 on resistance to TNF- $\alpha$  by inhibition of the p53-caspase 8-caspase 3 pathway of *MLL-AF4*-positive ALL cell lines were also confirmed by analysis using small interfering RNA against S100A6. This pathway was also confirmed in previously established *MLL-AF4* transgenic mice. These results suggest that *MLL-AF4*-positive ALL escapes from TNF- $\alpha$ -mediated apoptosis by upregulation of S100A6 expression, followed by interfering with p53-caspase 8-caspase 3 pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：MLL/AF4、S100A6、TNF $\alpha$ 、caspase、

1. 研究開始当初の背景

| (1) MLL 融合遺伝子の研究は

MLL/AF9, MLL/ENL などが主で MLL/AF4 の白血病化分子機構はほとんど報告がない。我々はこの MLL/AF4 融合遺伝子 (MLL/AF4cDNA) のクローニングに初めて成功した。

(2) マウス 32D 細胞を用いた我々の in vitro 系の研究では bcr/abl 融合遺伝子や c-kit 変異遺伝子、FLT3ITD 変異遺伝子と違い、MLL/AF4 融合遺伝子は単独では自立増殖能を獲得できない。MLL/AF4 融合遺伝子と FLT3-D835I 変異遺伝子の共発現で 32D 細胞は自立増殖能を初めて獲得することを明らかにした (Exp Hematol 2009 37:701-14)。

(3) マイクロアレイによる遺伝子発現 profiling を行うと、MLL-AF4 の導入により stat5, mdml, CDKN1B に加えて S100A-Calcium binding protein family の一つで細胞増殖に関与する S100A6 (calcyclin) が発現を亢進させていることが明らかになった。さらに MLL-AF4 と Flt3 TKD の両者の導入発現によって相乗的に S100A6 がさらに発現を亢進させていることがわかった。

## 2. 研究の目的

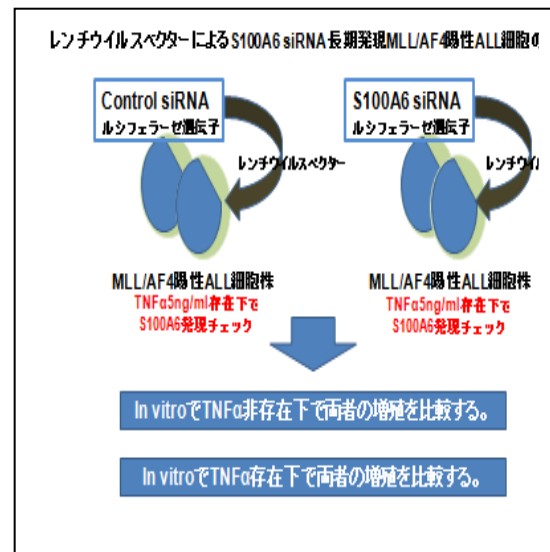
この 3 2D 細胞は HoxA9 を発現していないため、直接あるいは間接にしても MLL-AF4→S100A6 の癌化機構が存在すると着眼しこの「MLL-AF4→S100A6 分子機構の解明」と TGF $\alpha$  を介した IL24 の抗腫瘍効果の解析を目的として研究を行った。

## 3. 研究の方法

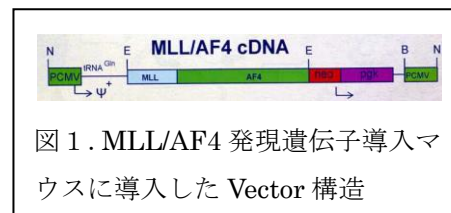
MLL/AF4 陽性 acute leukemic cell (ALL) 細胞株の SEM, RS4;11 ならびに MLL/AF4 陰性 ALL 細胞株の MOLT4, Raji, H9, NAMALWA そして HS-Sultan を用いて研究を行った。

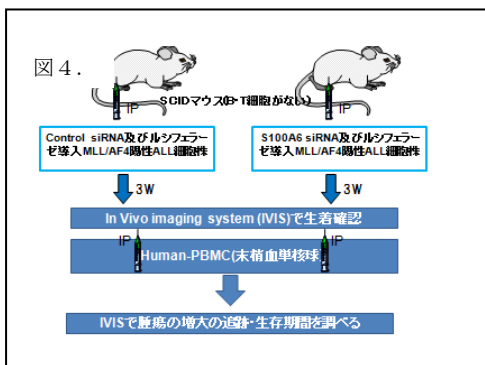
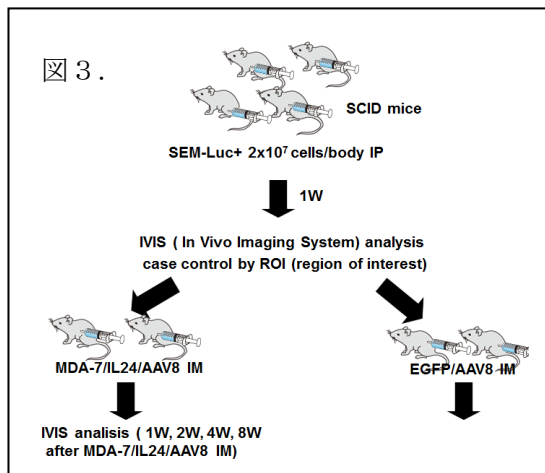
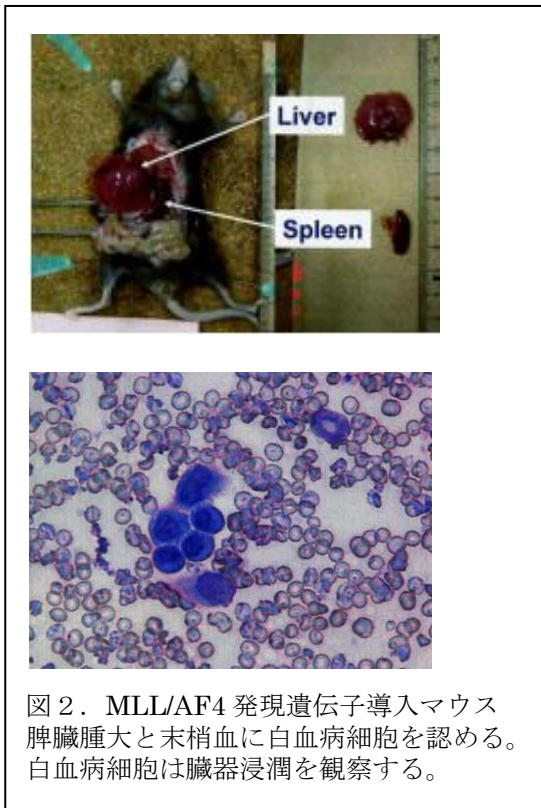
長期に MLL/AF4 陽性 ALL 細胞において S100A6 発現を抑制するため S100A6 siRNA をレンチウイルスベクターで MLL/AF4 陽性 ALL 細胞に組み込み SCID マウスに移植、ヒト PBMC (末梢血単核球) を移植しヒト PBMC 由来の TNF $\alpha$  による GVL 効果で腫瘍 S100A6 siRNA 長期発現 MLL/AF4 陽性 ALL 細胞を駆逐出来るかどうかを調べた。我々は 1 種類の MLL/AF4 陽性 ALL 細胞株にて S100A6 を長期抑制できれば GVL 効果で MLL/AF4 陽性 ALL 細胞を駆逐出来ることを証明している。この結果をより信頼性の高いものとするためもう 1 種類の MLL/AF4 陽性細胞株にて同様の実験を進めた。

この両株を TNF $\alpha$  非存在下・存在下で細胞増殖を比較し TNF $\alpha$  存在下でのみ S100A6 siRNA 群で有意に増殖能力が低くなることを確認した。



細胞株のアポトーシスは DeadEnd Colorimetric TUNEL system にて解析をおこなった。Western blotting は抗 p53 抗体、抗アセチル p53 抗体、抗 TNF R1 抗体、抗 caspase8 抗体、抗 caspase3 抗体を用いた。陽性バンドの濃度定量化は  $\beta$  アクチンをインターナルコントロールにて定量化した。MLL/AF4 ならびに S100A6 の small interfering (siRNA) は sense および antisense oligoribonucleotides をタカラ (滋賀) で作成した。細胞株 SEM, RS4;11 を TransIT-TKO transfection 溶液 (Miruo Bio, Madison, USA) を使用して transfection を行った。MLL/AF4 発現遺伝子導入マウスは既に発表している論文 (Leukemia. 2011 May;25(5):888-91) のマウスを使用した (図 1)。この遺伝子導入マウスで S100A6 の発現状態を観察した (図 2)。





4. 研究成果

(1) 5ng/ml TNF $\alpha$  添加培養液中で MLL/AF4

陰性細胞株では増殖されたが、MLL/AF4 発現細胞株 SEM, RS4;11 は 5ng/ml TNF $\alpha$  に抑制されことなく増殖した。

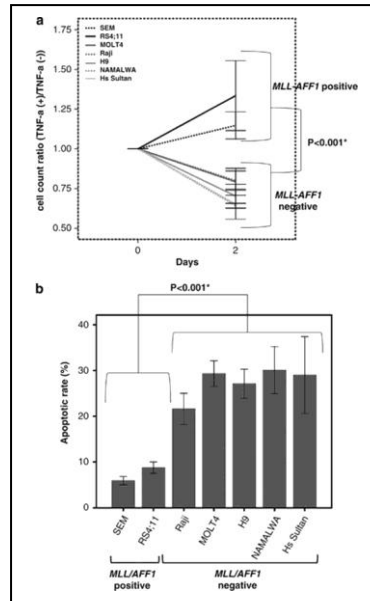


図5.

(2) MLL/AF4 発現にて S100A6 の発現が亢進し p53 を介して TNF $\alpha$  に抵抗性になっていることが Western ブロッキングを用いて明らかにした (図6)。

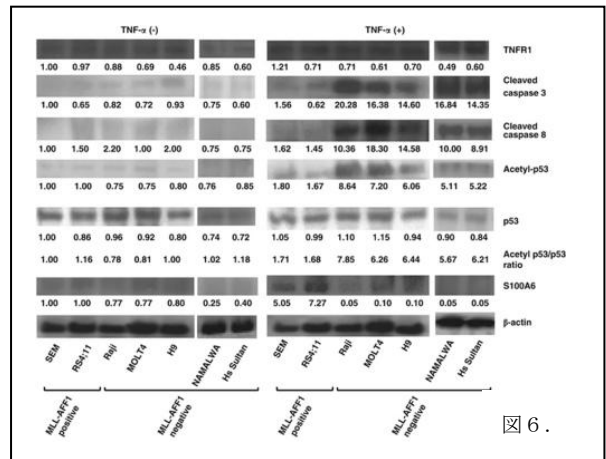


図6.

(3) siRNAにて MLL/AF4 発現を低下させると S100A6 の発現は低下した (図7)。

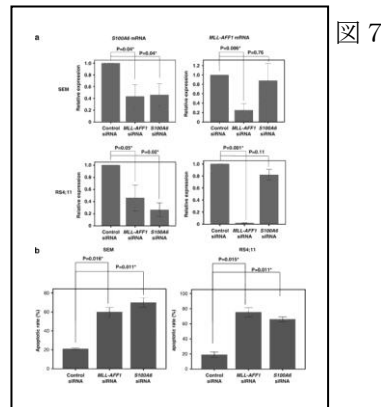
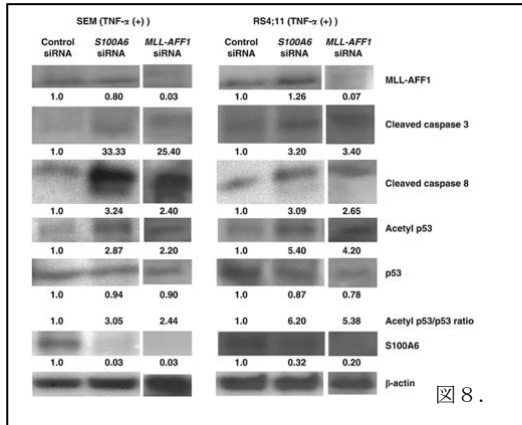
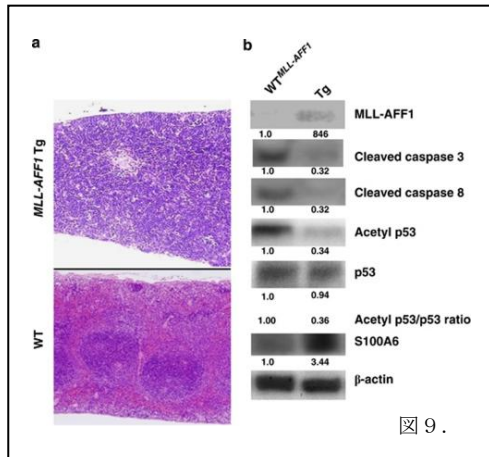


図7

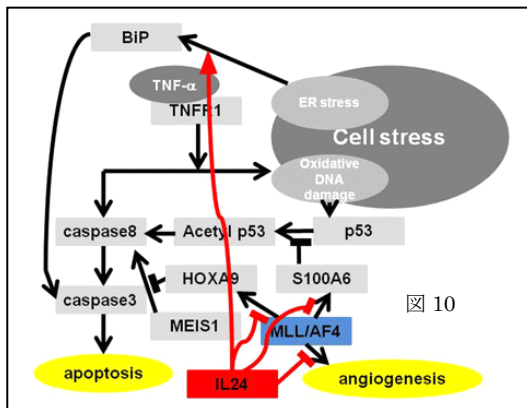
(4) TNF $\alpha$  存在下に MLL/AF4 発現細胞株 SEM, RS4;11 は siRNA にて MLL/AF4 発現を低下させると S100A6 の発現低下を伴いアポトーシスに陥った。これは Western ブロッキングで Caspase3/8 の活性化と p53 の活性化を伴っていた (図 8)。



(5) MLL/AF4 発現遺伝子導入マウスでも Caspase3/8 発現は低下し p53 も不活化し S100A6 の発現亢進は亢進していた (図 9)。



(6) MLL/AF4 発現遺伝子導入マウスに AAV-IL24 を投与すると MLL/AF4 発現を抑制しアポトーシスに誘導されることがわかった (図 10)。



## 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 7 件)

1. Tamai H, Miyake K, Yamaguchi H, Takatori M, Dan K, Inokuchi K, Shimada T. (2012) AAV-8 vector expressing IL-24 efficiently suppresses tumor growth mediated by specific mechanisms in MLL/AF4-positive ALL model mice. *Blood*. 119: 64-71.
2. Wakita S, Yamaguchi H, Omori I, Terada K, Ueda T, Manabe E, Kurosawa S, Iida S, Ibaraki T, Sato Y, Todoroki T, Hirakawa T, Ryoutokuji T, Arai K, Kitano T, Mitamura Y, Kosaka F, Dan K, Inokuchi K (2013). Mutations of the epigenetics modifying gene (*DNMT3a*, *TET2*, *IDH1/2*) at diagnosis may induce *FLT3*-ITD at relapse in de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 27, 1044-1052.
3. Inokuchi K, Wakita S, Hirakawa T, Tamai H, Yokose N, Yamaguchi H, Dan K. (2011) RCD1-ABL1-positive B lymphoblastic leukemia is sensitive to dexamethasone and tyrosine kinase inhibitors and rapidly evolves clonally by chromosomal translocations. *Int J Hematol*. 94: 255-60.
4. Tamai H, Miyake K, Yamaguchi H, Takatori M, Dan K, Inokuchi K, Shimada T. (2011) Resistance of MLL-AFF1-positive acute lymphoblastic leukemia to tumor necrosis factor-alpha is mediated by S100A6 upregulation. *Blood Cancer Journal*. e38; doi:10.1038/bcj.2011.37. P1-7.
5. Wakita S, Yamaguchi H, Miyake K, Mitamura Y, Kosaka F, Dan K, Inokuchi K. (2011) Importance of c-kit mutation detection method sensitivity in prognostic analyses of t(8;21)(q22;q22) acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 25: 1423-1432.
6. Hirakawa T, Yamaguchi H, Yokose N, Gomi S, Inokuchi K, Dan K. (2010) Importance of maintaining the relative dose intensity of CHOP-like regimens combined with rituximab in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Ann Hematol*. 89: 897-904.
7. Yamaguchi H, Hanawa H, Uchida N, Inamai M, Sawaguchi K, Mitamura Y, Shimada T, Dan K, Inokuchi K. (2009) Multistep

pathogenesis of leukemia via the MLL-AF4 chimeric gene/Flt3 gene tyrosine kinase domain (TKD) mutation-related enhancement of S100A6 expression. *Exp Hematol.* 37: 701-714.

[学会発表] (計 16 件)

1. Ryoutokuji T, et al (9th out of 10): The clinical features and prognostic impact of DNMT3A gene mutation in Japanese patients with de novo AML. The 53<sup>th</sup> annual meeting of the American Society of Hematology (San Diego). December 2011.
2. Wakita S, et al (5th out of 6): Gene mutations in paired initial presentation and relapse samples from acute myeloid leukemia patients. The 53<sup>th</sup> annual meeting of the American Society of Hematology (San Diego). December 2011.
3. Takeuchi J, et al (6th out of 7): Telomerase activity is useful for the screening of cryptic and late onset dyskeratosis congenital and evaluation of the treatment response to anabolic steroids for their bone marrow failure. The 16<sup>th</sup> congress of the European Hematology Association (London). June 2011.
4. Wakita H, et al. (5th out of 6): Gene mutation in paired initial presentation and relapse samples from acute myeloid leukemia. The 16<sup>th</sup> congress of the European Hematology Association (London). June 2011.
5. Tamai H, et al (7th out of 8): MLL/AF4 positive acute lymphoblastic leukemia has resistance to tumor necrosis factor- $\alpha$  caused by up-regulation of S100A6. The 52<sup>th</sup> annual meeting of the American Society of Hematology (Orlando Florida). December 2010.
6. Tamai H, et al (7th out of 8): The activated K-RAS protein accelerates human driven-MLL/AF4 induced leukemo-lymphogenicity in transgenic mice model. The 52<sup>th</sup> annual meeting of the American Society of Hematology (Orlando Florida). December 2010.
7. Wakita S, et al (5th out of 6): C-kit mutation is a significant prognostic factor of t(8;21) AML: Importance of highly sensitive Q-probe method. 15<sup>th</sup>.

European Hematology Association. (Barcelona, Spain) June 2010.

8. Inokuchi k, et al (1th out of 20): Clinical study of nilotinib in CML-CP patients with imatinib resistance or intolerance. TSSG study. 第 74 回日本血液学会学術集会 (京都)、 2012 年 10 月
9. Tamai H, Yamaguchi H, Dan K, Inokuchi K: Inhibition of S100A6 induces GVL effects in MLL/AF4-positive ALL in human-PBMC-SCID mice model. 第 74 回日本血液学会学術集会 (京都)、 2012 年 10 月
10. Hirakawa T, et al. (12th out of 12): The prognostic impact of FLT3 mutations in acute promyelocytic leukemia. 第 74 回日本血液学会学術集会 (京都)、 2012 年 10 月
11. Okabe M, et al. (16th out of 17): Analysis of JAK2/MPL mutations and clinical features among myeloproliferative neoplasms in Japan. 第 74 回日本血液学会学術集会 (京都)、 2012 年 10 月
12. Ryoutokuji T, et al (6th out of 7): The clinical features of DNMT3A gene mutation in Japanese patients with de novo AML. 第 73 回日本血液学会学術集会 (名古屋)、 2011 年 10 月
13. Wakita S, et al (6th out of 6): Clinical course and molecular characteristics of RCSD1-ABL1 positive pre-B lymphoblastic leukemia. 第 73 回日本血液学会学術集会 (名古屋)、 2011 年 10 月
14. 玉井 勇人、(8 人中 8 番目): Establishment and Characterization of A New Lymphoid Malignancy Mouse Model Induced by the combination of MLL/AF4 and K-RAS. 第 72 回日本血液学会総会(横浜) 2010 年 9 月
15. 玉井 勇人、(7 人中 6 番目): Gene Therapy of Acute Lymphoblastic Leukemia with MLL/AF4 Using AAV8-IL24. 第 72 回日本血液学会総会(横浜) 2010 年 9 月
16. 玉井 勇人 (8 人中 8 番目): Establishment of Aggressive MLL/AF4 Induced Lymphoma Model Mice Through UP-Regulation of HOXA9 and S100A6 Expression. 第 16 回日本遺伝子治療学会(宇都宮)、 2010 年 7 月.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ヒト MLL/AF4 融合遺伝子導入トラン

スジェニック非ヒト動物  
発明者：猪口 孝一  
権利者：日本医科大学 医学部  
種類：  
番号：特願 2008-319606  
出願年月日：2008 年 12 月 16 日  
国内外の別：国内

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.nms.ac.jp/hematology/index.html>

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
猪口 孝一 (INOKUCHI KOUICHI)  
日本医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10203267