

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 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790355

研究課題名（和文）小児急性骨髄性白血病における MLL 遺伝子縦列部分重複の機能解析と分子標的治療

研究課題名（英文）Partial tandem duplication in childhood acute myeloblastic leukemia and molecular targeted therapy

研究代表者

林 睦 (HAYASHI MUTSUMI)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：60327575

研究成果の概要（和文）：小児急性骨髄性白血病において高率に認められる MLL 遺伝子異常のうち、縦列部分重複（PTD）の siRNA による発現抑制系を確立した。MLL-PTD 遺伝子発現抑制により、白血病細胞株 KOPM-88 の増殖は約 20%抑制された。さらに、抗 CD26 ヒト化モノクローナル抗体の CD26 陽性造血器悪性腫瘍に対する増殖抑制効果が確認された。

研究成果の概要（英文）：We established a suppression system of MLL partial tandem duplication (MLL-PTD) gene using siRNA in childhood acute myeloblastic leukemia cell line with MLL-PTD, KOPM-88. The siRNA repressed the growth of KOPM-88 cells by 20%. Furthermore, we confirmed anti-tumor effect of anti-CD26 monoclonal antibody against CD26 positive malignant hematopoietic tumor cell lines.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：病理学・癌・遺伝子・白血病

1. 研究開始当初の背景

化学療法の進歩にも関わらず、小児急性骨髄性白血病（AML）の予後は、小児急性リンパ性白血病（ALL）の予後と比較して不良であり、予後規定因子の解明による治療の層別化、発がんの分子機構に即した分子標的療法の開発が急務である。

ヒト染色体 11q23 に存在する MLL 遺伝子の再構成は、特に乳児白血病に高頻度に認められるが、全年齢層を通じて、AML において高頻度にみられる遺伝子異常であり、白血病化とその進展に重要な役割を持つと考えられている。MLL 遺伝子再構成のうち縦列部分重複（MLL-PTD）は重要な予後規定因子として注目されており、成人・小児の AML において MLL

正常群と比較し予後不良であると報告されている。しかし、MLL-PTD 蛋白の白血病化における機能はいまだ不明である。

近年、がん細胞に対する分子標的治療薬の開発が進み、がん治療への寄与が期待されている。しかし、予後不良群である MLL 遺伝子再構成を有する AML に対する分子標的療法に関しては、1 例の報告があるのみでいまだに臨床応用されている例はない。

がん細胞の増殖機構の解明にもとづく分子標的療法の開発及び評価には、生体内モデルが不可欠である。われわれは、MLL-PTD を有する小児 AML 細胞株 KOPM-88 を樹立し、免疫不全マウスを用いた生体内モデルを確立し報告した。

一方、当研究室は T 細胞活性化における共刺激分子として知られる CD26 が、種々のがん細胞に高率に高発現していることに注目し、分子標的療法の標的分子として研究しており、抗 CD26 ヒト化モノクローナル抗体が悪性中皮腫に対して抗腫瘍効果があることを報告した (Clin Cancer Research 13:4191, 2007)。最近、この CD26 が、小児白血病の一部の症例において発現増強していることが報告された (J Enzyme Inhib Med Chem 24:708, 2009)。

これらの知見を背景にして本研究では、白血病化における MLL-PTD の関与する分子機構を KOPM-88 細胞株を用いて解明し、その分子機構を生体内外で評価することにより、分子標的療法の標的分子を検討することを目的として立案した。さらに、細胞株及び生体内モデルを活用し、CD26 陽性造血器腫瘍に対する抗 CD26 抗体療法について検討を加え、その作用機構を解析するものである。

2. 研究の目的

本研究は、MLL-PTD を有する小児 AML 細胞株 KOPM-88、及びその異種移植系による生体内モデルを用いた MLL-PTD 蛋白の機能解析を目的とする。さらに MLL-PTD を有する小児 AML に対する新規分子標的療法の標的分子を同定し検討する。

併せて難治性小児造血器腫瘍に対する新規分子標的療法としてヒト化抗 CD26 モノクローナル抗体の有効性を検討し作用機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) 材料

細胞株は MLL-PTD を有する小児 AML 細胞株 KOPM-88 を使用した。対照として MLL 再構成を伴わない細胞株を適宜使用した。

(2) 定量的 PCR プライマーの設計

(3) siRNA 配列の設計及び合成

(4) siRNA による MLL 遺伝子発現抑制系の確立

合成した siRNA は、導入試薬 INTERFERIN により KOPM-88 細胞に導入した。

(5) 定量的 PCR

(6) CD26 発現解析

抗 CD26 抗体を用いたフローサイトメトリー法により CD26 発現解析を行った。

(7) 細胞増殖アッセイ

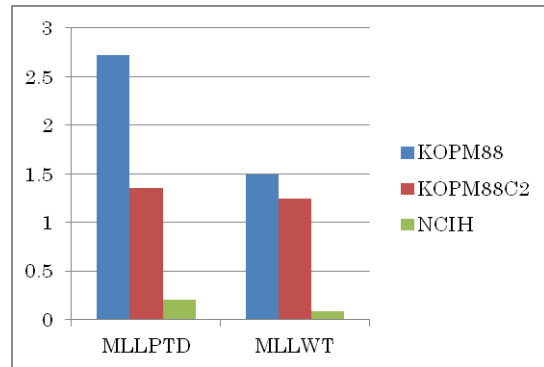
WST-1 試薬を用いた発色測定により細胞増殖アッセイを行った。

4. 研究成果

(1) 定量的 PCR プライマーの設計

MLL-PTD 遺伝子の接合部を挟んだ領域から適切な領域を抽出し定量的 PCR プライマーを設計・合成した。同様に、総 MLL 遺伝子プライ

マーを合成した。プライマーの感度と特異性を、MLL-PTD を有する小児白血病細胞株 KOPM-88 および MLL 遺伝子再構成を伴わない細胞株 NCIH2452 を用いて確認した。



(図 1) MLL-PTD、MLL-WT mRNA の発現
KOPM-88 および亜株 KOPM-88C2 においては MLL-PTD、MLL-WT 遺伝子がともに高発現しているが、MLL 遺伝子異常を伴わない細胞株 NCIH2452 においてその発現はわずかである。

(2) siRNA 配列の設計及び合成

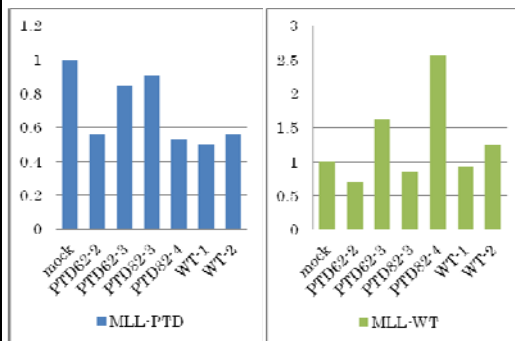
MLL-PTD 遺伝子特異的 siRNA は PTD 接合部の配列を含む 19 塩基対を抽出、siRNA の条件を満たし、既知の他の遺伝子配列との相溶性が低いものを選択して 4 種類の配列を決定し合成した。同様に総 MLL 遺伝子に対する siRNA を 2 種類設計した。

	名称	センス鎖 (5'→3')	アンチセンス鎖 (5'→3')
MLL-PTD	MLLPTD2-2	GCAAGCQAAGGATGAGCAUJ	UGCUCAUCCUUAAGUUGGUU
	MLLPTD2-3	CAAGCQAAGGAGUAGCAUJ	UGGCAUCCUUAAGUUGGUU
	MLLPTD2-3	CAAGCQAAGGAGUAGCAUJ	UGGCAUCCUUAAGUUGGUU
	MLLPTD2-4	CAUUGAGAGGAGUAGCAUJ	AUUGCUCAUCCUUAAGUUGGUU
MLL-WT	MLLWT-1	GUUACUAGUUGUAGUAGCAUJ	UUGAUCAAGUAGUAGUUGGUU
	MLLWT-2	CGAUCAUAGCCGCUUAGUJ	UUAAGCGGCUUAGUAGUUGGUU

(表 1) MLL-PTD に対する siRNA の配列

(3) siRNA による MLL 遺伝子発現抑制系の確立

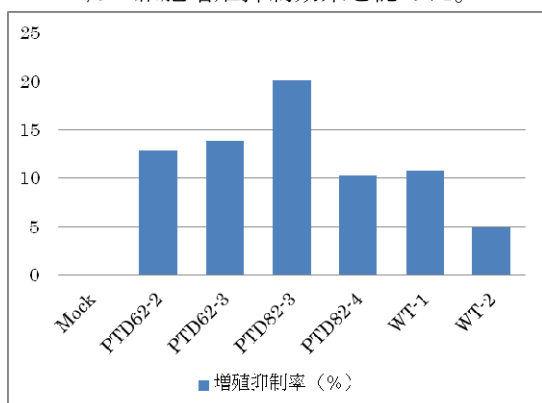
導入試薬 INTERFERIN を用いて KOPM-88 細胞株に上記 siRNA を導入した。定量的 PCR 法による確認で、対照ランダム siRNA と比較して最大約 50% の発現低下が得られた。



(図 2) siRNA による MLL-PTD 遺伝子の発現抑制 (対照ランダム siRNA (mock) を 1 とした相対比)

(4) MLL-PTD 遺伝子発現抑制による KOPM-88 細胞増殖抑制効果

siRNA による MLL 遺伝子発現抑制の細胞増殖抑制効果を WST-1 アッセイ法により解析した。10-20%の細胞増殖抑制効果を認めた。



(図 3) MLL-PTD 遺伝子 siRNA の KOPM-88 細胞に対する増殖抑制効果

(5) 造血器悪性腫瘍細胞株における CD26 分子の発現

当研究室が保有する造血器悪性腫瘍細胞株について、フローサイトメトリー法により CD26 分子の発現を検討したところ、Karpas299, HSB-2, CEM, MOLT3, NKL 細胞で CD26 分子陽性が確認された。

(6) 抗 CD26 ヒト化モノクローナル抗体の造血器悪性腫瘍に対する増殖抑制効果

抗 CD26 ヒト化モノクローナル抗体 YS110 は、CD26 陽性悪性リンパ腫細胞株 Karpas299 の増殖を約 60%に抑制した。

【研究成果の意義】

現時点で報告例のない、MLL-PTD の遺伝子抑制系を確立した。MLL-PTD が白血病細胞の維持・増殖に関与する分子機構を解明する手段となると考えられる。また、抗 CD26 ヒト化モノクローナル抗体の造血器悪性腫瘍に対する増殖抑制効果が確認され、今後 MLL-PTD 遺伝子産物およびその下流分子を含めた、分子標的治療の開発に有用であると考えられる。

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 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

(1) 林 睦、山田幸司、坂元亨宇、森本幾夫、山田健人

ヒト化抗 CD26 モノクローナル抗体による中皮腫の抗体療法の分子機構：細胞周期調節による抗腫瘍作用

第 101 回病理学会総会、2012. 4. 28、東京

(2) 山田幸司、林 睦、坂元亨宇、森本幾夫、山田健人

ヒト化 CD26 モノクローナル抗体による中皮腫の抗体療法の分子機構：CD26 核移行と転写調節を介して

第 101 回病理学会総会、2012. 4. 28、東京

(3) 山田幸司、林 睦、坂元亨宇、森本幾夫、山田健人

CD26 と抗 CD26 抗体の細胞膜-核間輸送機構とその機能

第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010. 12. 7、神戸

(4) Mutsumi Hayashi, Kohji Yamada, Wenlin Du, Michiie Sakamoto, Chikao Morimoto, Taketo Yamada

Humanized anti-CD26 monoclonal antibody therapy against mesothelioma and its molecular mechanisms.

第 69 回日本癌学会総会、2010. 9. 24、大阪

(5) 林 睦、山田幸司、杜ぶん林、坂元亨宇、山田健人

ヒト化抗 CD26 モノクローナル抗体を用いた悪性中皮腫の新規治療法の基礎的検討

第 99 回病理学会総会、2010. 4. 28、東京

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 睦 (HAYASHI MUTSUMI)
慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号：60327575