

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 22 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591405

研究課題名(和文) ヒストン修飾を介した造血器悪性腫瘍細胞の耐性化機構の解明と治療への応用

研究課題名(英文) Identification of a critical epigenetic mechanism via histone modification in drug resistance of blood cancer cells.

研究代表者

菊池 次郎 (Kikuchi, Jiro)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60371035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：多発性骨髄腫など造血器悪性腫瘍の薬剤耐性獲得において、骨髄微小環境との相互作用は重要な役割を果たしている。そこで、造血器悪性腫瘍の中から多発性骨髄腫細胞を用いて、抗がん剤処理時のヒストン修飾様式の変化を骨髄ストローマ細胞との接着/非接着下間で比較した。その結果、非接着下ではアポトーシス誘導に伴うヒストンH3の複数箇所のリジン残基へのメチル化誘導が観察されたが、接着下ではアポトーシスの抑制と共にヒストンH3のK27のトリメチル化(H3K27me3)が特異的に抑制されていた。ここから、多発性骨髄腫細胞の接着耐性獲得には、H3K27me3抑制を介した機序が重要な役割を担っている可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cell adhesion mediated-drug resistance (CAM-DR) is a major obstacle in achieving cure in patients with hematologic malignancies including multiple myeloma (MM). We found that di or trimethylation was moderately induced in histone H3 lysine 4 (K4) and K36, and markedly in K9 and K27 by anti-MM drug treatment without adhesion to stromal cells. In contrast, trimethylation to K27 (H3K27me3) was absent in cell adhesion mediated-drug resistant MM cells. Inhibition of H3K27me3 significantly inhibited anti-MM drug-induced apoptosis in stroma free condition. These results suggest that cell adhesion-induced H3K27me3 inhibition is a critical step in drug resistance of MM cells.

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：血液腫瘍学 エピジェネティクス 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

白血病や悪性リンパ腫、多発性骨髄腫などの造血器悪性腫瘍には、アルキル化薬や副腎皮質ホルモン剤等による化学療法に加え骨髄移植を併用した治療が行われている。しかしながら多くの症例で治療抵抗性・耐性の出現や再発が起こり、現在も完治に至る治療法が未確立のままである。中でも薬剤耐性獲得機構には未解明の点が多く、鍵分子の同定などその機構の解明は重要な研究課題である。

近年、エピジェネティクスと呼ばれるゲノム DNA とヒストンタンパク等から構成されるクロマチンの化学的、構造的な修飾を介した遺伝子発現制御機構が着目されている。真核細胞の核内で、DNA は4種類のコアヒストン (H2A、H2B、H3、H4) 各2分子からなるヒストンオクタマーの周囲を1.75周 (146bp) 巻いた形で存在している。コアヒストンの N 末端領域はアセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化など様々な修飾を受け、これに伴いクロマチン構造が変化し遺伝子発現に影響を与える。例えば、アセチル基の付加はヒストンと DNA との結合力を弱め転写因子のアクセシビリティを高めることから転写活性化に働く。逆に脱アセチル化はコアヒストンをきつく締め転写因子がアクセスできず転写抑制的に働く。このように、ヒストン修飾は、転写活性化のタイミングや部位を決定する認識コードでありエピジェネティックコードまたはヒストンコードと呼ばれている。また、このヒストンコードはクロマチンの部位や修飾を受けるリジン残基の位置など多様性に富み、可塑性が高く時空的に変化する特徴を有している。

Sharma らは *in vitro* で非小細胞肺がん細胞株に大過剰の EGF 受容体キナーゼ阻害剤を作用させた際、細胞毎に反応性が異なり、耐性化した細胞が生き残るだけでなく次第に増殖能を示すことを明らかにした。解析の結果、耐性化細胞はヒストン H3 の lysine-4

が特異的に脱メチル化されており、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤によりこの部位の脱メチル化を抑制すると耐性化が抑制された (Cell, 141, 69, 2010)。次いで、Zhang らもイマチニブに耐性の quiescent な慢性骨髄性白血病幹細胞に対する HDAC 阻害剤の有効性を示した (Cancer Cell, 17, 427, 2010)。

一方、申請者らは、かねてより HDAC 阻害剤の抗腫瘍効果に着目するだけでなく、正常造血や腫瘍化における HDAC の機能について解析を進めてきた。その結果、HDAC が造血器悪性腫瘍細胞に過剰発現することや、過剰発現が分化とアポトーシス抑制に働くことを明らかにした (J Biol Chem, 284, 30673, 2009)。また、多発性骨髄腫の有効な治療薬であるプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブが、骨髄腫細胞の HDAC 発現低下による活性抑制を介して作用すること (Blood, 116, 406, 2010)、悪性リンパ腫細胞において、HDAC 阻害剤が CD20 発現を転写レベルで亢進させ、CD20 発現の減退によるリツキサン耐性の解除に有効なこと (Leukemia, 24, 1760, 2010) 等を明らかにした。これらの結果は、ヒストンの脱アセチル化抑制等を介したヒストンコードの変化が、腫瘍化または耐性化の原因となった転写異常を修正しその下流で制御を受ける遺伝子発現を変化させて作用することを示している。

以上の通り、ヒストンコードの変化は造血器悪性腫瘍細胞の耐性化に重要な役割を果たしていることが示唆される。さらに、薬剤耐性獲得のステップが、まず最初にエピジェネティックな変化によって誘導され、その後ジェネティックな変化が蓄積して耐性が固定化することや、エピジェネティックな変化はジェネティックな異常と異なり可逆性であることから、その制御は耐性の克服においてより重要と思われる。しかしながら、多種多様な様式を示すヒストンコードのうち、耐

性化に鍵となる特徴的なヒストンコードや、その下流で制御を受ける遺伝子群などその役割や作用機序は未解明のままであった。

2. 研究の目的

造血器腫瘍細胞の薬剤耐性獲得において、造血幹細胞の主なプールである骨髄微小環境との相互作用は重要な役割を果たしている。そこで、本研究では、造血器悪性腫瘍細胞が骨髄ストローマ細胞との接着を介して薬剤耐性（接着耐性）を獲得する際のヒストン修飾様式の解析から、耐性化に鍵となるヒストンコードの同定を目指した。さらに、その下流で制御される遺伝子の中から耐性化の鍵分子を同定する等により、ヒストン修飾を介した機構の耐性化における役割とその分子機構を解明し、耐性を克服しうる新規治療法の開発を目指した。

3. 研究の方法

【造血器悪性腫瘍細胞の接着耐性獲得時のヒストンコードの解析】

(1)セルカルチャーインサートを用いて造血器腫瘍細胞株を骨髄ストローマ細胞と接着させた状態で共培養し、抗がん剤に対する接着耐性を再現する *in vitro* のシステムを構築した。

(2)このシステムを用いて造血器腫瘍細胞の抗がん剤処理時のヒストン修飾様式の変化を接着/非接着下間で比較した。

これまでの報告から、転写活性化に働くヒストンコードとしてヒストン全般のアセチル化や、ヒストンH3のlysine-4（以下H3K4と略）やH3K36のメチル化が、転写抑制に働くヒストンコードとしてヒストン全般の脱アセチル化とH3K9やH3K27のメチル化の関与が示されている。そこで、接着/非接着下におけるヒストン修飾様式の変化を、ウェスタンブロットにより解析した。同時に、CBP/p300やPCAFなどのヒストンアセチル化酵素やHDACファミリー、

G9aやSUV39H1などのヒストンメチル化酵素、LSD1やUTXなどのヒストン脱メチル化酵素等、ヒストン修飾制御因子についてもその発現様式を解析した。

なお、造血器腫瘍細胞には、骨髄内で増殖し骨髄ストローマ細胞との接着を介した相互作用が薬剤耐性に関与することが示されている多発性骨髄腫細胞を用いた。また骨髄ストローマ細胞にはhTERT導入により不死化させた骨髄ストローマ細胞株を用いた。

4. 研究成果

セルカルチャーインサートを用いて骨髄腫細胞株KMS12-BM、RPMI8226やU266細胞を、骨髄ストローマ細胞株UBE6T-7やstroma-NK細胞と接着状態で共培養し、抗がん剤に対する接着耐性を再現する *in vitro* のシステムを構築した。このシステムを用いて骨髄腫細胞の抗がん剤処理時のヒストン修飾様式の変化を接着/非接着下で比較した。その結果、ストローマ細胞と非接着下では抗がん剤処理によるアポトーシスの誘導に伴いヒストンH3K9及びH3K27の顕著なメチル化とH3K4及びH3K36への軽微なメチル化誘導が観察された。しかしながら、ストローマ細胞との接着下ではアポトーシスが抑制されると共にヒストンH3K27へのメチル化が顕著に抑制されていた。なお、H3K27メチル化と同様転写抑制に働くH3K9、また、転写活性化に働くH3K4やH3K36のメチル化様式には接着/非接着下間で違いは見られなかった。この現象は今回用いたすべての骨髄腫細胞株と骨髄ストローマ細胞株の組み合わせにおいて同様であった。

一方、抗がん剤作用時に誘導されるH3K27のトリメチル化をメチル化阻害剤(DZNeP)により抑制すると細胞死の誘導は有意に抑制された。しかしながら、H3K9のメチル化阻害剤(Chaetocin)やヒストン脱メチル化酵素阻害剤には、有意な細胞死抑制効果は見られなかった。

さらにH3K27トリメチル化酵素であるEZH2をshRNAによりノックダウンすると、抗がん剤作用時に誘導されるH3K27のトリメチル化抑制と共に有意な細胞死の抑制が観察された。

以上より、多発性骨髄腫細胞の接着耐性獲得には、H3K27のトリメチル化の抑制が重要な役割を担っている可能性が明らかになった。これまでの報告によると、多発性骨髄腫の生存には転写因子HOXA9やIRF4が必須であること (Nature, 454, 226, 2008, Nature, 471, 467, 2011, Cell, 146, 904, 2011)、これら転写因子の発現が転写調節領域のH3K27トリメチル化により制御されることが示されている (Nature, 471, 467, 2011, Nat Immunol, 11, 936, 2010)。従って、接着シグナルを介したH3K27トリメチル化抑制が、これら遺伝子の発現亢進を介して接着耐性獲得に働いている可能性が明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

- 1) Kikuchi J, Koyama D, Mukai H, and Furukawa Y. Suitable drug combination with bortezomib for multiple myeloma under stroma-free conditions and in contact with fibronectin or bone marrow stromal cells. **Int J Hematol**. doi:10.1007/s12185-014-1573-3 accepted article preview online April 6, 2014.
- 2) Koyama D, Kikuchi J, Hiraoka N, Wada T, Kurosawa H, Chiba S, and Furukawa Y. Proteasome inhibitors exert cytotoxicity and increase chemosensitivity via transcriptional repression of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**. doi:10.1038/leu.2013.366; accepted article preview online December 4, 2013.
- 3) Sripayap P, Nagai T, Noborio-Hatano K, Kikuchi J, Furukawa Y, and Ozawa K.

Romidepsin overcomes cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma cells.

Acta Hematol, 132, 1-4, 2013.

4) Hiraoka N, Kikuchi J, Koyama D, Wada T, Mori S, Nakamura Y, and Furukawa Y. Alkylating agents induce histone H3K18 hyperacetylation and potentiate HDAC inhibitor-mediated global histone acetylation and cytotoxicity in mantle cell lymphoma.

Blood Cancer J, 3, e169, 2013.

5) Kikuchi J, Yamada S, Koyama D, Wada T, Nobuyoshi M, Izumi T, Akutsu M, Kano Y, and Furukawa Y. The novel orally active proteasome inhibitor K-7174 exerts anti-myeloma activity *in vitro* and *in vivo* by down-regulating the expression of class I histone deacetylases.

J Biol Chem, 288, 25593-25602, 2013.

6) Kikuchi J, Shibayama N, Yamada S, Wada T, Nobuyoshi M, Izumi T, Akutsu M, Kano Y, Sugiyama K, Ohki M, Park SY, and Furukawa Y. Homopiperazine derivatives as a novel class of proteasome inhibitors with a unique mode of proteasome binding.

PLoS One, 8, e60649, 2013.

7) Calero-Nieto FJ, Joshi A, Bonadies N, Kinston S, Chan WI, Gudgin E, Pridans C, Landry JR, Kikuchi J, Huntly BJ, and Gottgens B. HOX-mediated LMO2 expression in embryonic mesoderm is recapitulated in acute leukaemias.

Oncogene, 32, 5471-5480, 2013.

8) Kuroda I, Inukai T, Zhang X, Kikuchi J, Furukawa Y, Nemoto A, Akahane K, Hirose K, Honna-Oshiro H, Goi K, Kagami K, Yagita H, Tauchi T, Maeda Y, Sugita K. BCR-ABL regulates death receptor expression for TNF-related apoptosis-inducing ligand

(TRAIL) in Philadelphia chromosome-positive leukemia.

Oncogene, 32, 1670-1681, 2013.

〔学会発表〕(計3件)

1) Furukawa Y, Kikuchi J. Bortezomib overcomes the cell adhesion mediated drug resistance by down-regulating HDAC expression in multiple myeloma. 14th International Myeloma Workshop, 2013.4.3.Kyoto, Japan.

2) Kikuchi J, Shibayama N, Yamada S, Wada T, Nobuyoshi M, Izumi T, Akutsu M, Kano Y, Sugiyama K, Ohki M, Park SY, and Furukawa Y. Homopiperazine derivatives as a novel class of proteasome inhibitors with a unique mode of proteasome binding. 14th International Myeloma Workshop, 2013.4.3.Kyoto, Japan.

3) Kikuchi J, Shibayama N, Yamada S, Wada T, Nobuyoshi M, Izumi T, Akutsu M, Kano Y, Sugiyama K, Ohki M, Park SY, and Furukawa Y. Homopiperazine derivatives as a novel class of proteasome inhibitors with a unique mode of proteasome binding.第75回日本血液学会学術集会、2013年10月12日、札幌。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページにて研究成果を発信した。

(1) 難治性白血病に対する新規治療薬を発見しました

<http://www.jichi.ac.jp/news/research/2014/20140409.html>

(2) プロテアソーム阻害を介する新規抗がん剤を発見しました

<http://www.jichi.ac.jp/news/research/2014/20140403.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

菊池 次郎 (KIKUCHI Jiro)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：6037103

(2)研究分担者

(3)連携研究者

古川 雄祐 (FURUKAWA Yusuke)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：00199431