

平成 27 年 6 月 30 日現在

機関番号：83904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591568

研究課題名(和文) 小児リンパ性白血病新規予後因子 IKZF1 ターゲティング細胞を用いた治療標的の探索

研究課題名(英文) Exploration for therapeutic target using a novel prognostic factor IKZF1 targeting cells in childhood acute lymphoblastic leukemia

研究代表者

服部 浩佳 (Hattori, Hiroyoshi)

独立行政法人国立病院機構(名古屋医療センター臨床研究センター)・その他部局等・その他

研究者番号：20624513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：小児の急性リンパ性白血病(ALL)は高リスク群では未だ約30%が再発する。近年、新たな予後因子としてIKZF1のDNAレベルでの欠失が見出された。このIKZF1の欠失がどのように小児ALLの治療成績に影響を与えるのかについて明らかにするため、モデル細胞を作成した。そしてIKZF1変異モデル細胞を用いて小児ALLで頻用される抗がん剤を検証したところ、幾つかの抗がん剤感受性はIKZF1変異の影響を受ける可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Patients with childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) in high risk recur about 30%. Recently, IKZF1 alteration in genomic DNA has been found as a prognostic factor. To elucidate the role of the IKZF1 alteration, we developed childhood ALL model cells with IKZF1 mutations. We investigated the relationship between the IKZF1 alteration and anti-cancer drug sensitivity which are frequently used in childhood ALL. The results showed the sensitivity to the several drugs may be dependent on the IKZF1 alteration.

研究分野：小児血液腫瘍学

キーワード：小児急性リンパ性白血病 抗がん剤感受性 予後因子

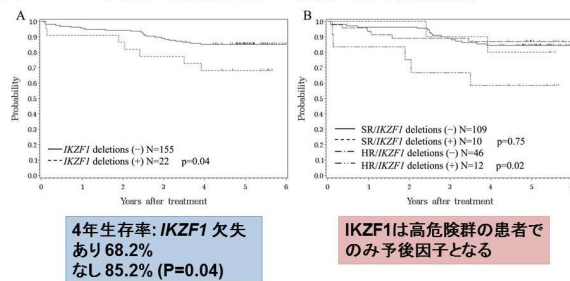
1. 研究開始当初の背景

(1) 小児 BCP-ALL における新たな予後因子としての IKZF1

小児期に発症する急性リンパ性白血病 (小児 ALL) の大部分を占める前駆 B 細胞性 ALL (BCP-ALL) のうち約 70% は長期寛解が得られるが、それ以外には再発がみられる。これら 30% を予測する新たな予後因子として、JAK2, IKZF1 における変異が注目されている。

我々の施設では、欧米の報告と比較して、日本人小児 BCP-ALL では IKZF1 の欠失変異が JAK2 に比べてより強力な予後因子であること (Yamashita Y et al. *Pediatr Blood Cancer*. 2013; 60:1587-92) を示し、小児 BCP-ALL における IKZF1 の重要性を見出した (図 1)。

図1. IKZF1欠失と小児急性リンパ性白血病の治療成績



Yamashita Y et al. *Pediatric Blood and Cancer* 2013

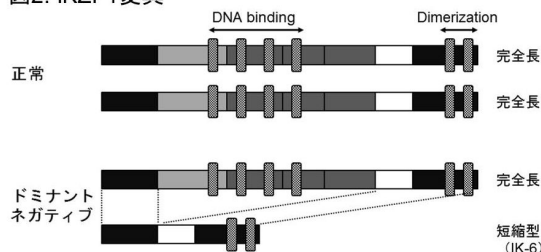
(2) 予後不良因子としての IKZF1 の生物学的意義

IKZF1 はリンパ球系の分化に必須の転写因子であり、ノックアウトマウスではリンパ球系の分化異常が起こり、リンパ性白血病を発症する。また白血病細胞において IKZF1 はいくつかの短縮型変異体を過剰発現しており、その一つである IK-6 は、細胞増殖能の亢進や抗がん剤に対する抵抗性の増加に寄与する (ドミナントネガティブ効果)。近年、この IK-6 生成のメカニズムとして、DNA レベルでの欠失変異が報告された (Mullighan CG et al. *Nature* 2008)。

(3) IKZF1 変異ヒト白血病モデル

IKZF1 に変異の見られるヒト白血病試料では片方のアリルは常に正常に保たれており、ヘテロ欠損体が白血病発症に重要であることが示唆されている (図 2)。

図2. IKZF1変異



一方、ノックアウトマウス由来の白血病はホ

モ欠損体である点が実際の BCP-ALL とは異なる。つまりヘテロ欠損体をベースラインにしたヒト細胞による解析系が IKZF1 の機序の解明には必要である。

2. 研究の目的

小児急性リンパ性白血病の予後因子として重要な IKZF1 変異を模倣したヒト白血病モデルを構築し、BCP-ALL における IKZF1 変異の意義を明らかにし、治療応用の可能性を探索することとした。

B 細胞性のリンパ性白血病株化細胞を用いた BCP-ALL モデルを用いることにより IKZF1 変異が確かに小児 BCP-ALL の予後に影響を与えているかどうかを、均一かつ生物学的に一致したバックグラウンドのもとに観察可能となる。

前駆 B 細胞性 ALL (BCP-ALL) コンテキスト; がん細胞はそれぞれ独自の遺伝学的・細胞学的コンテキストを有しており、各々の遺伝子機能はコンテキストに依存することを申請者は報告している (Hattori et al, *Mol Cancer Ther* 2011)。その点本研究の解析対象である BCP-ALL 由来の細胞を用いるためコンテキストも考慮した解析が可能となる。IKZF1 の変異体である IK-6 を遺伝子導入することで、siRNA および shRNA に比べてより均一なバックグラウンドでの比較が可能となる。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子ターゲティングによる IKZF1 変異を持つ BCP-ALL モデル細胞の作製を Zink Finger Nuclease を用いて試みたが、欠失部分が 10kb 以上と大きかったこともあり、成功しなかった。一部方針を変更し通常の DNA plasmid を用いて一過性発現系を作成し、変異蛋白質である IK-6 (IKZF1 の短縮型) を発現させた。ついでレトロウイルス系による発現系 GCDNsam IKZF1-IK-6-IRES-EGFP を用いて B 細胞性 ALL の細胞株に遺伝子導入を行い、モデル細胞系を確立した。

(2) 得られたモデル細胞株を使用して IKZF1 変異細胞株の細胞生物学的解析を行った。

細胞間の IKZF1 発現量を Western blotting で確認する。

B 細胞性 ALL 細胞株における genomic DNA レベルでの IKZF1 変異について MLPA 法を用いて解析した。

IKZF1 の一過性発現系を作成し、変異蛋白質である IK-6 (IKZF1 の短縮型) を発現させることにより細胞内局在を確認した。

細胞周期の解析

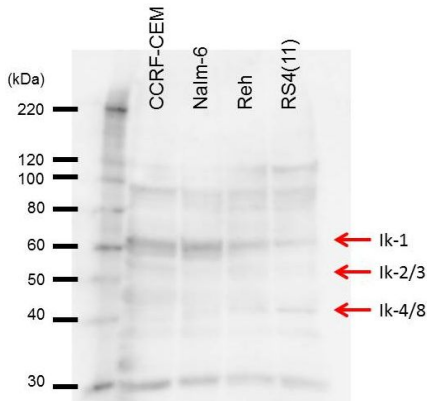
(3) 治療応用を目指したスクリーニング系の確立

(4) IKZF1 変異細胞株における薬剤感受性規程候補分子の検証

4. 研究成果

- (1) IKZF1 変異細胞株の細胞生物学的解析
細胞間の IKZF1 発現量の違い (図 3) を Western blotting にて確認した。

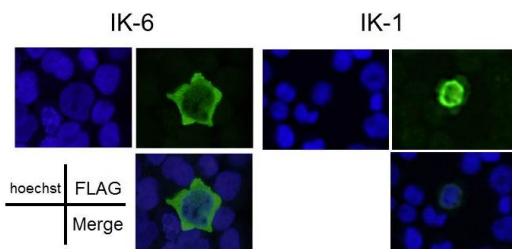
図3. IKZF1の蛋白量発現(細胞種別)



ペルでの IKZF1 変異について MLPA 法で解析を行った。その結果、RS4;11 は IKZF1 が染色体 DNA レベルで全長に渡って片アリルが欠失しており、いわゆる Haploinsufficiency の状態であることが分かった。Reh は IKZF1 は両アリルとも欠損なく存在していた。

IKZF1 の細胞内局在、一過性発現系を作成し、変異蛋白質である IK-6 (IKZF1 の短縮型) を発現させた。その細胞内局在を確認した(図 4)。

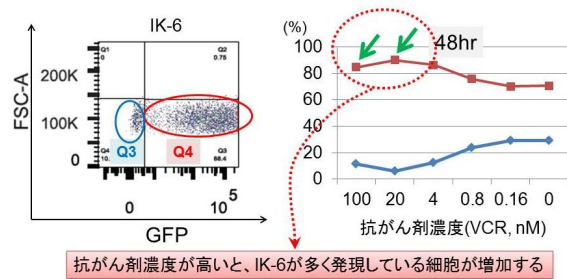
図4. IKZF1の細胞内局在



- (3) 治療応用を目指したスクリーニング系の確立と IKZF1 変異細胞株における薬剤感受性規程候補分子の検証

小児急性リンパ性白血病で主に使用する抗がん剤(ビンクリスチン、プレドニゾロン、L-アスパラギナーゼ、ダウノマイシン、メソトレキセート、エトポシド、シタラピン、THP-アドリアマイシン、6-メルカプトプリン、マイトマイシン C) を用いて IK-6 の有無でその感受性が変化するかを解析した。一部の薬剤で IK-6 の発現量が抗がん剤感受性を変化させる可能性が示唆された(図 5. ビンクリスチン)。

図5. FACSを用いたIK-6発現細胞の抗がん剤感受性測定系



抗がん剤濃度が高いと、IK-6が多く発現している細胞が増加する

現在は薬剤の種類を増やすとともに、他の抗がん剤感受性解析系(プレートリーダーによる解析)も加えて、検証中である。

また RS4;11, Reh 細胞等の B 細胞性細胞株に IK-6 を遺伝子導入した安定発現系は既に確立したので、これらを用いて IK-6 の発現量と抗がん剤感受性の量的関係を明らかにすることで、小児 BCP-ALL の予後因子として確立されつつある IKZF1 の抗がん剤感受性における意義を明らかにしていく予定である。

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 8 件)

Wakasa K, Kawabata R, Nakao S, Hattori H, Taguchi K, Uchida J, Yamanaka T, Maehara Y, Fukushima M, Oda S. Dynamic Modulation of Thymidylate Synthase Gene Expression and Fluorouracil Sensitivity in Human Colorectal Cancer Cells. PLoS One. (査読有) 2015; 10: e0123076 doi:10.1371/journal.pone.0123076.

Nakagawa Y, Sedukhina AS, Okamoto N, Nagasawa S, Suzuki N, Ohta T, Hattori H, Roche-Molina M, Narváez AJ, Jeyasekharan AD, Bernal JA, Sato K. NF- κ B signaling mediates acquired resistance after PARP inhibition. Oncotarget. (査読有) 2015; 6: 3825-39 [http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path\[\]=2868](http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path[]=2868)

Hattori H, Janky R, Nietfeld W, Aerts S, Babu MM, Venkitaraman AR. p53 shapes genome-wide and cell type-specific changes in microRNA expression during the human DNA damage response. Cell Cycle. (査読有) 2014;13: 2572-86 doi: 10.4161/15384101.2015.942209.

Sekimizu M, Yamashita Y, Ueki H, Akita

N, Hattori H, Maeda N, Horibe K. Nilotinib monotherapy induced complete remission in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia resistant to imatinib and dasatinib. *Leuk Lymphoma*. (査読有) 2014;55:1652-3 doi: 10.3109/10428194.2013.842984.

堀部敬三、服部浩佳、最新がん薬物療法学 がん薬物療法の最新知見 IV 臓器別がんの薬物療法 小児白血病 日本臨床 72 巻増刊号 2, 2014 pp.484-489

Jeyasekharan AD, Liu Y, Hattori H, Pisupati V, Jonsdottir AB, Rajendra E, Lee M, Sundaramoorthy E, Schlachter S, Kaminski CF, Ofir-Rosenfeld Y, Sato K, Savill J, Ayoub N, Venkitaraman AR. A cancer-associated BRCA2 mutation reveals masked nuclear export signals controlling localization. *Nat Struct Mol Biol*. (査読有) 2013; 20:1191-8 doi: 10.1038/nsmb.2666.

Mahen R, Hattori H, Lee M, Sharma P, Jeyasekharan AD and Venkitaraman AR. A-type lamins maintain the positional stability of DNA damage repair foci in mammalian nuclei. *PLoS ONE*. (査読有) 2013; 8:e61893 doi: 10.1371/journal.pone.0061893.

Sato K, Sundaramoorthy E, Rajendra E, Hattori H, Jeyasekharan AD, Ayoub N, Schiess R, Aebersold R, Nishikawa H, Sedukhina AS, Wada H, Ohta T, Venkitaraman AR. A DNA-damage selective role for BRCA1 E3 ligase in claspin ubiquitylation, CHK1 activation, and DNA repair. *Curr Biol*. (査読有) 2012; 22:1659-66 doi: 10.1016/j.cub.2012.07.034.

[学会発表](計 1件)

Hattori Hiroyoshi

Clinical Issues for The Treatment of Adolescents and Young Adults with Haematologic Malignancies and Bone and Soft Tissue Sarcoma in Japan; A Single Institute's Experience. 9th St. Jude-VIVA Forum in Pediatric Oncology 2015 年 3 月 28 ~ 29 日 Singapore.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部 浩佳 (HATTORI, Hiroyoshi)

独立行政法人国立病院機構名古屋医療セ

ンター 臨床研究センター 血液腫瘍研究部 予防治療研究室・室長
研究者番号：20624513

(2) 研究分担者

堀部 敬三 (HORIBE, Keizo)

独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター 臨床研究センター長

研究者番号：30209308

(3) 研究協力者

齋藤 祐子 (SAITO, Yuko)

山下 友加 (YAMASHITA, Yuka)