

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791052

研究課題名(和文)白血球細胞の薬剤耐性化とエピジェネティクスの解析

研究課題名(英文)The epigenetics of leukemic cell drug resistance

## 研究代表者

坂口 公祥(SAKAGUCHI, KIMIYOSHI)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00402280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円

研究成果の概要(和文)：脱メチル化剤であるデシタピンは抗白血病薬であるクロファラビンやエトポシドの殺細胞効果を相乗的に増加させること、また、その殺細胞効果はカスパーゼ-3/7を介するものであることが確認された。また、デシタピンはBID, BAX, BAD, PUMA, CASP3のmRNA発現を増加させることを確認した。しかし、BID, BAX, BAD, CASP3はデシタピンによって脱メチル化されたわけではなかった。網羅的な遺伝子発現解析とメチル化状態解析を行った。その結果、デシタピンによってAATKのCpG領域が脱メチル化され、遺伝子発現が増加したことが判明した。

研究成果の概要(英文)：We confirmed that the demethylating agent (decitabine) enhances the cytotoxic effect of anti-leukemic agents such as clofarabine and etoposide synergistically, and the cytotoxic effect is depend on caspase-3/7 activity. Then, we confirmed that decitabine increase mRNA expression levels of BID, BAX, BAD, PUMA, CASP3. Although, decitabine did not demethylate the CpG of BID, BAX, BAD, CASP3. Therefore, we carried out genome-wide gene expression studies and epigenome-wide association studies. The results showed that decitabine demethylate the CpG of AATK and increase its mRNA expression.

研究分野：小児血液学

キーワード：癌 遺伝子 発現制御

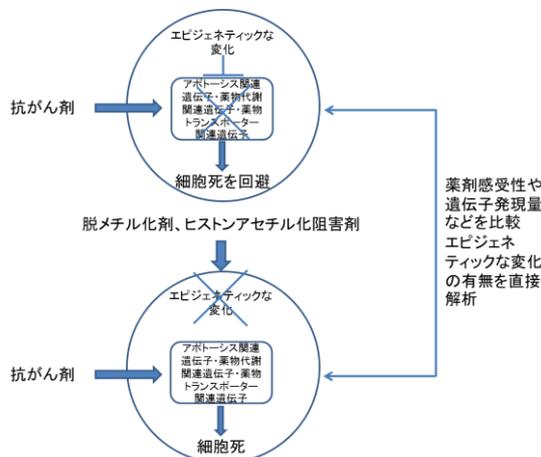
1. 研究開始当初の背景

急性白血物の抗がん剤耐性化に関しては、いまだ不明な点が多い。近年、脱メチル化剤やヒストン脱アセチル化阻害剤などの遺伝子機能発現に変化を加える薬剤の添加で、抗がん剤耐性化が改善したとの報告があった。このため、アポトーシス関連遺伝子や薬物代謝遺伝子、抗がん剤トランスポーターのエピジェネティックな変化が関与している可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

白血病細胞の抗がん剤耐性化の機序に関して白血病細胞内のエピジェネティックな変化が認められることが判明した。アポトーシス関連遺伝子などのエピジェネティックな変化と白血病細胞の薬剤感受性試験を合わせて解析することにより、白血病細胞の薬剤耐性化機序の解明を行うことを目的とした。

図1: エピジェネティックな変化と耐性化に関する仮説

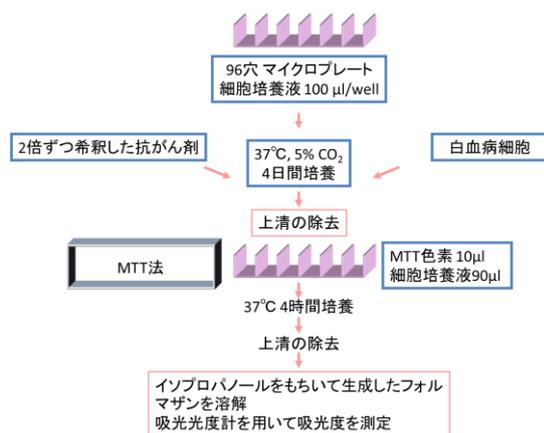


3. 研究の方法

(1) 白血病細胞株 (CCRF-CEM) において一般的な抗がん剤 (プレドニゾロン、デキサメサゾン、ビンクリスチン、L-アスパラギナーゼ、シタラビン、ダウノルビシン、エトポシド、クロファラビン、フルダラビン) と脱メチル化剤 (デシタビン) を併用した場合の薬剤感受性を MTT 法により評価する。

具体的な MTT 法の方法は、下の図 2 に示すとおり、白血病細胞に抗がん剤を添加して培養

図2: MTT 法の概要



し、上清を吸引後 MTT 色素を添加して培養する。生細胞は MTT 色素を紫色のフォルマザンに変換可能である。フォルマザンをイソプロパノールで溶解し、吸光度を測定し、抗がん剤を加えないコントロールと比較することで、生細胞率を測定できる。

今回の研究においては一般的な抗がん剤とともに脱メチル化剤を加えて白血病細胞を培養することで、併用時の薬剤感受性を評価する。

(2) 上記の検査結果を CalcSyn ソフトウェアを用いて解析し、薬剤の併用効果を評価する。薬剤の併用効果の指標であるコンビネーション・インデックス (CI) が 1 以上であれば脱メチル化剤の併用は相乗効果であったと判断し、1 未満であれば拮抗効果と判断する。(3) 併用時に脱メチル化剤と相乗効果を示した抗がん剤に関しては、 $\langle 1 \rangle$  白血病細胞株のみ、 $\langle 2 \rangle$  脱メチル化剤のみを白血病細胞株に加える、 $\langle 3 \rangle$  抗がん剤のみを白血病細胞株に加える、 $\langle 4 \rangle$  脱メチル化剤と抗がん剤を白血病細胞株に加える、の 4 種類の方法で培養し、FITC で標識した Annexin V と PI を添加して、フローサイトメトリーによりアポトーシスを確認する。これにより、抗がん剤を加えて白血病細胞株を培養したときに MTT 法で認められる吸光度の低下が、細胞の増殖不良では無く、アポトーシスを介した細胞死が起こっていることを確認する。また、アポトーシスの経路がカスパーゼを用いる経路であるかを確認するため、上記 $\langle 1 \rangle \sim \langle 4 \rangle$ の方法で白血病細胞株を培養した後に、カスパーゼ-3/7 アッセイを実施する。

(4) 通常の培養を行った白血病細胞株と脱メチル化剤を加えて培養を行った白血病細胞株からそれぞれ mRNA を抽出し、cDNA を作成した後、real-time PCR 法を用いてアポトーシス関連遺伝子 (*Bax*, *Bid*, *Bim* など) の発現量を計測する。その後通常の培養を行った白血病細胞株と脱メチル化剤を加えて培養を行った白血病細胞株との間で遺伝子発現量を比較する。これにより脱メチル化剤を加えることで発現量が増加した遺伝子、すなわち脱メチル化したことが推測される遺伝子を同定していく。

(5) 通常の培養を行った白血病細胞株と脱メチル化剤を加えて培養を行った白血病細胞株からそれぞれ DNA を抽出し、バイサルファイト法でメチル化されたシトシンをウラシルに変換する。その後サンガー法による DNA シークエンスを行い、アポトーシス関連遺伝子 (*Bax*, *Bid*, *Bim* など) の CpG 領域がどの程度のシトシンがメチル化されているかを通常の培養を行った白血病細胞株と脱メチル化剤を加えて培養を行った白血病細胞株で比較する。これにより脱メチル化剤を加えることで実際に脱メチル化した遺伝子を同定していく。

(6) 上記(4)および(5)の方法を用いても脱メチル化剤で脱メチル化され、薬剤感受性の改

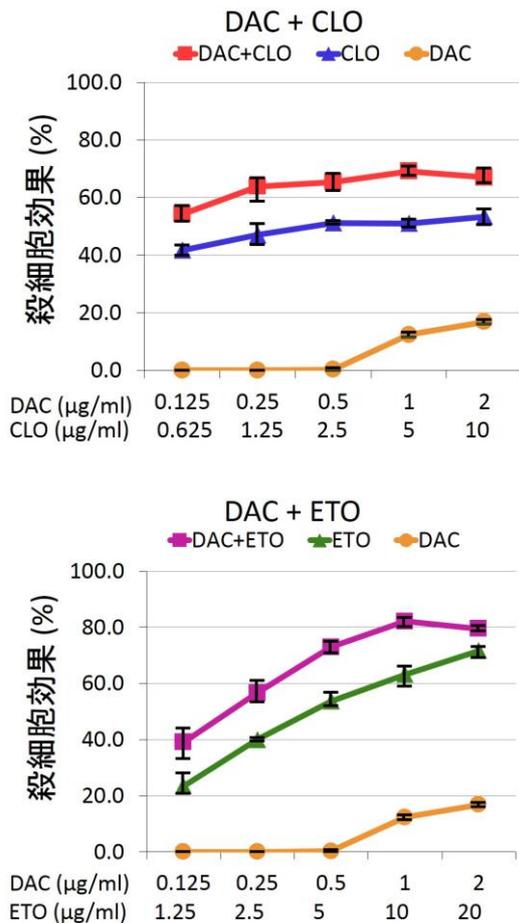
善に寄与するアポトーシス関連遺伝子 (*Bax*, *Bid*, *Bim* など) が同定できない場合には、マイクロアレイ法を用いた網羅的な遺伝子発現解析や網羅的なメチル化状態の解析を追加する。これにより、薬剤感受性の改善に寄与するアポトーシス関連遺伝子 (*Bax*, *Bid*, *Bim* など) を推定する。推定できた場合には再度その遺伝子に対して(4)および(5)と同様に通常の real-time PCR 法による発現解析やバイサルファイトシーケンスによるメチル化状態の解析を行う。

(7) 上記(1)~(6)が順調に実施できた場合には脱メチル化剤をヒストンアセチル化阻害剤に変更して同様の検討を行う。

#### 4. 研究成果

(1) 白血病細胞株 (CCRF-CEM) において一般的な抗がん剤と脱メチル化剤であるデシタビン (DAC) を併用し、MTT 法によって薬剤感受性を評価した。MTT 法の結果から 2 剤の併用によって相乗効果がありそうな薬剤はクロファラビン (CLO) とエトポシド (ETO) の 2 種類であった。その結果を以下の図 3 に示す。

図 3: デシタビン併用による薬剤感受性試験結果



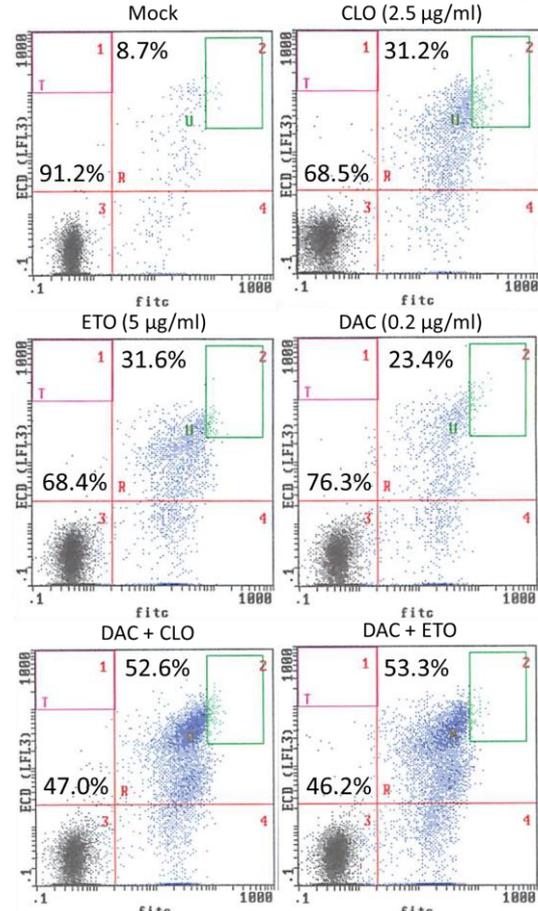
クロファラビン単独の 50% 阻止濃度は 3.36 μg/ml であったのに対してクロファラビンとデシタビンの併用時のクロファラビンの 50% 阻止濃度は 0.615 μg/ml 未満と改善していた。また、エトポシド単独の 50% 阻止濃度は 4.96 μg/ml であったのに対してエトポシ

ドとデシタビンの併用時のクロファラビンの 50% 阻止濃度は 0.431 μg/ml と改善していた。

(2) 上記(1)において認められたデシタビン (DAC) とクロファラビン (CLO)、デシタビン (DAC) とエトポシド (ETO) のコンビネーション・インデックス (CI) はそれぞれ 0.026、0.431 であり、クロファラビン、エトポシドの両薬剤ともデシタビンに対して相乗効果が認められた。

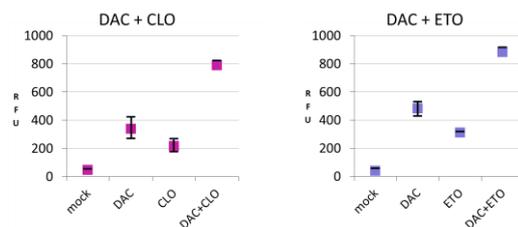
(3) FITC で標識した Annexin V と PI を用いてフローサイトメトリーにより白血病細胞のアポトーシスを確認した結果は以下の図 4 に示す。

図 4: フローサイトメトリーによるアポトーシス確認



また、カスパーゼ-3/7 アッセイの結果を以下の図 5 に示す。

図 5: カスパーゼ-3/7 アッセイ結果

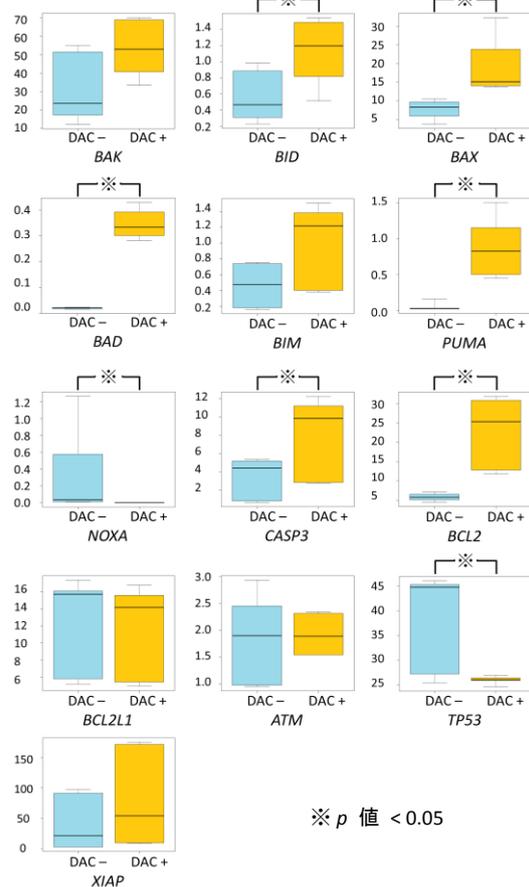


これらの結果より、デシタビン (DAC) の併用により、クロファラビン (CLO) もしくはエトポシド (ETO) 単独投与の場合と比較してアポトーシス-3/7 を介するアポトーシスが增

加したため、殺細胞効果が増強されたことが確認された。

(4) (3)の結果をもとにカスパーゼ-3/7 を介するアポトーシス経路を中心に、デシタビン (DAC) 投与あり/なしでのアポトーシス関連遺伝子の mRNA 発現を確認した。その結果を以下の図 6 に示す。

図 6: アポトーシス関連遺伝子の発現結果



この結果からデシタビン投与によってアポトーシス促進遺伝子である *BID*, *BAX*, *BAD*, *PUMA*, *CASP3* の発現が増加していることが判明した。また、アポトーシス抑制遺伝子である *TP53* の発現が減少していることが判明した。これらはデシタビン投与によってアポトーシス促進遺伝子の発現が増加し、アポトーシス抑制遺伝子の発現は減少するという仮説に沿うものである。一方、デシタビン投与によってアポトーシス促進遺伝子である *NOXA* の発現が減少し、アポトーシス抑制遺伝子である *BCL2* の発現が増加していることも判明した。これは仮説に反するものであるが、アポトーシス関連遺伝子は複雑なシグナル伝達系を持つため、すべてのアポトーシス関連遺伝子が仮説の通りに増減するわけではないと考えた。

(5) (4)の結果をもとにカスパーゼ-3/7 を介するアポトーシス経路を中心に、デシタビン (DAC) 投与あり/なしでのアポトーシス関連遺伝子の CpG 領域のメチル化の状態をバイサルファイトシーケンスで確認した。その結

果を以下の表 1 に示す。

表 1: アポトーシス関連遺伝子のメチル化比率

	BAK	BID	BAX	BAD	NOXA	CASP3	BCL2L1	ATM	TP53	XIAP
メチル化 CpG 比率 (%)	94.4	0.4	1.9	1.9	3.6	4.4	0.7	1.3	2.1	96.7
DAC なし										
メチル化 CpG 比率 (%)	81.2	2.4	1.3	2.6	3.3	2.9	2.5	2.4	2.9	72.9
DAC あり										
p 値	0.40	0.20	0.35	0.49	0.79	0.58	0.21	0.03	0.24	0.16

以上の結果よりアポトーシス関連遺伝子はいもともとあまりメチル化されていないか、解析したものとは別の場所がメチル化されている可能性が示唆された。しかし、数多くあるアポトーシス関連遺伝子の CpG 領域を一つずつバイサルファイトシーケンスで解析するのは労力の割に成果が少ないと考え、マイクロアレイ法を用いた網羅的な解析手法を取り入れることとした。

(6) (5)の結果をもとにマイクロアレイ法を用いた網羅的な遺伝子発現解析や網羅的なメチル化状態の解析を実施し、デシタビン (DAC) を投与した場合に、投与しなかった場合と比べて遺伝子発現量が増加したり、メチル化が解除されたりしたアポトーシス関連遺伝子を抽出した。

網羅的な遺伝子発現解析においては *CDIP1*, *CDKN1A*, *BCL3*, *AATK*, *NOL3*, *TP53INP1*, *TP53TG3D*, *TP53I3*, *TP53TG3*, *DRAM1* といったアポトーシス関連遺伝子の発現がデシタビン (DAC) 投与によって有意に増加していた。また、アポトーシス関連遺伝子のうち、デシタビン (DAC) 投与によって有意に脱メチル化されたものは *TP53I13*, *BCL11B*, *AATK* であった。

遺伝子発現解析とメチル化解析に共通して変化が認められた遺伝子は *AATK* である。*AATK* は肺がんや乳がんの細胞において高メチル化されていることが近年報告された。しかし、発がんに関与するとの報告であり、薬剤感受性との関連についての報告はない。今回の研究では real-time PCR による *AATK* の発現量の変化やバイサルファイトシーケンスによる *AATK* のメチル化状態の変化を確認できていないこと、他の白血病細胞株で同様の結果が得られていないことから、*AATK* が真に薬剤感受性に関連している遺伝子であるかはさらなる検討が必要である。

このため、今後は real-time PCR による *AATK* の発現量の変化やバイサルファイトシーケンスによる *AATK* のメチル化状態の変化を確認するとともに、他の NALM6 や BALL1 などの別の白血病細胞株でも同様の検討を行う必要がある。

また、*AATK* を過剰発現させた白血病細胞株の薬剤感受性が改善すること、さらにその白血病細胞株を RNAi の手法を用いて *AATK* をノックダウンさせた場合に薬剤感受性が低下することが確認できれば、*AATK* は急性白血病の薬剤感受性に強く関与する遺伝子といえる。

これらの結果が得られれば、*AATK* 遺伝子もしくは *AATK* 蛋白を標的とするような薬剤を開発することにより、耐性化した急性白血病の治療成績を向上させる一助となる可能性がある。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 坂口 公祥 他、2'-deoxy-5-azacytidine は急性リンパ性白血病細胞株に対する抗白血病薬の殺細胞効果を相乗的に増強する、第54回日本小児血液・がん学会学術集会、2012年11月30日～12月2日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
- ② 坂口 公祥 他、2'-Deoxy-5-azacytidine Enhances Cytotoxic Effect of Other Anti-leukemic Agents Synergistically in Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Line、The 5th JSH International Symposium 2014、2014年5月24日～25日、アクトシティ浜松 コンgressセンター(静岡県・浜松市)
- ③ 坂口 公祥 他、Decytidine Enhances Cytotoxic Effect of Other Anti-leukemic Agents Synergistically in Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Line、The 46th Congress of the International Society of Paediatric Oncology、2014年10月22日～25日、トロント(カナダ)

[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]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坂口 公祥 (SAKAGUCHI, Kimiyoshi)  
浜松医科大学・医学部附属病院小児科・助教  
研究者番号：00402280