

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590687

研究課題名(和文)造血器腫瘍におけるエピジェネティック薬剤効果検査マーカーの確立

研究課題名(英文) Establishment of predictive marker for epigenetic drugs in hematological malignancies

研究代表者

高橋 伸一郎 (Takahashi, Shinichiro)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号：40375069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：まず最初に、各種PU.1発現改変白血病細胞株を作成し、検討を行った結果、DNAメチル化酵素阻害剤の分化誘導効果とPU.1発現との間に相関関係を見出した。さらに、独自に見出したPU.1の抑制性標的遺伝子であるメタロチオネイン(MT)遺伝子に関して解析した。MT過剰発現細胞株を作成し、検討を行ったところ、予想通り、DNAメチル化酵素阻害剤同様に分化誘導を引き起こす全トランス型レチノイン酸の効果とMT発現との間に負の相関を見出した。これら一連の研究により、PU.1及びMT遺伝子発現の検討が、エピジェネティック薬剤等の分化誘導療法の効果を予測するバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：First, we examined the effect of DNA methylation inhibitor on various PU.1 transgenic leukemia cell lines. As a result, we found a positive correlations for PU.1 expression and DNA methylation inhibitor effect, which induced differentiation and finally elimination of leukemia cells. Next, we assessed whether this effect is correlated with metallothionein (MT) expression, which we recently found an novel suppressive target gene of PU.1. To this aim, we generated MT over-expressed acute promyelocytic leukemia NB4 cell line (NB4MTOE cells) and examined the effect of all-trans retinoic acid (ATRA), which is a potent differentiation inducer for NB4 cells. We revealed that the effect of ATRA is inhibited in NB4MTOE cells. This is quite consistent with our prediction, because PU.1 is a suppressive regulator of MT. Collectively, these results suggest that expressions of PU.1 and MT may serve as useful biomarkers to predict the efficacy of epigenetic drugs which have differentiation effects.

研究分野：病態検査学

キーワード：バイオマーカー 分化 PU.1 メタロチオネイン 白血病

1. 研究開始当初の背景

造血器腫瘍、特に急性骨髄性白血病 (AML) や骨髄異形成症候群 (MDS)、多発性骨髄腫などは、抗がん剤による化学療法のみでは、治療成績は頭打ちの状態である。そこで、MDS などの造血器悪性腫瘍治療薬として注目を集めている DNA メチル化酵素 (Dnmt) 阻害剤といったエピジェネティック薬剤を併用した治療法の開発などによる治療成績の向上が待たれていた。

2. 研究の目的

造血器腫瘍は、Dnmt 阻害剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤などエピジェネティック薬剤の投与が行われているが、効果はまだ不十分である。それは、薬効機序が解明されておらず、有効な薬効判定及び予測バイオマーカーが確立されていなかったためと考えられる。申請者は本研究の準備段階で、これら薬剤の薬効と造血系転写因子 PU.1 との発現量との間に、密接な関連があることを発見した。本研究では、そのエピジェネティック薬剤に対する新たな検査マーカーの確立を目指した。

3. 研究の方法

(1)既に樹立している各種 PU.1 発現改変細胞株に対して、Dnmt 阻害剤などのエピジェネティック薬剤を投与し、これら薬剤の特異的な効果にどのように関わっているかについて解析を行った。

(2)PU.1 標的遺伝子であるメタロチオネイン (MT) 及びビメンチン (VIM) 過剰発現細胞株を樹立し、分化、細胞増殖能等を検討することにより、これら遺伝子の機能を明らかにする。さらに、エピジェネティック薬剤を投与し、特異的な効果が見られるかを明らかにした。

(3)AML 等の造血器腫瘍症例より検体を採取し、エピジェネティック薬剤効果と PU.1、PU.1 標的遺伝子発現、及び制御領域メチル化率との関連性を検討した。

4. 研究成果

(1)最初に、各種 PU.1 発現改変白血病細胞株を作成し、検討を行った結果、DNA メチル化酵素阻害剤 (5-aza-2'-deoxycytidine: 5-azadc) の効果と PU.1 発現との間に相関関係を見出した (Aoyama et al., Biochemical and Biophysical Research Communications

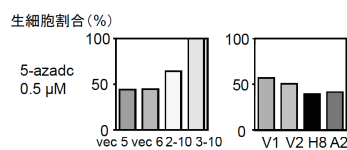


図1: 5-azadcに対してPU.1発現低下細胞は耐性であり、PU.1過剰発現細胞は高感受性をもつ  
5-azadc添加後72時間後の細胞に対して生細胞割合を測定した。2-10、3-10はPU.1発現低下K562(慢性骨髄性白血病)細胞、vec5、vec6はそのコントロール細胞、H8、A2はPU.1過剰発現K562細胞、V1、V2はそのコントロール細胞。

2012) (図1)

さらに、この薬剤の薬効は、分化マーカーの解析の結果、慢性骨髄性白血病 (K562) 細胞においてヘモグロビンA 発現誘導が認められることが判明し、分化誘導効果によりその効果が発揮されることが明らかになった (Aoyama et al.) (図2)。

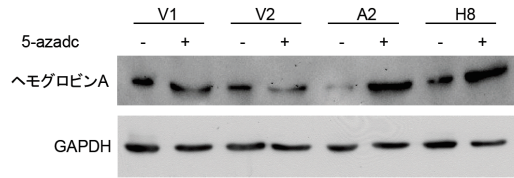


図2: PU.1過剰発現細胞では5-azadc添加後ヘモグロビンAの発現が上昇する  
ウエスタンブロットの結果を示す。H8、A2はPU.1過剰発現慢性骨髄性白血病 (K562) 細胞で、V1、V2はそのコントロール細胞。DNAメチル化酵素阻害剤5-azadcを添加するとPU.1過剰発現K562細胞で著しく、赤芽球系因子であるヘモグロビンAの発現上昇を認めた。

そこで、5-azadc 等のエピジェネティック薬剤等同様、低用量で分化誘導を引き起こすことが知られているシタラビン (Ara-C) を用いてその効果を検討したところ、やはり、PU.1 の発現量に関連してその薬剤の効果が認められることが判明した (Nakano et al., Biomedical Reports 2014) (図3)。

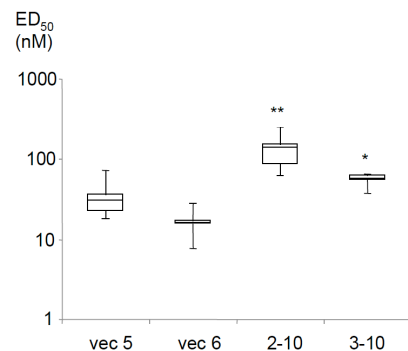


図3: PU.1発現低下細胞は低用量Ara-Cに対して耐性である  
2-10、3-10はPU.1発現低下K562(慢性骨髄性白血病)細胞、vec5、vec6はそのコントロール細胞。低用量Ara-C添加後の生細胞割合で測定した 50%有効濃度(ED50)を示す。PU.1発現低下K562細胞はコントロールに比して、有意にED50の上昇を認めた。

(2)次に、独自に見出した PU.1 の抑制性標的遺伝子であるメタロチオネイン (MT) 遺伝子に関して解析を行うこととした。そのため、MT 過剰発現細胞株の樹立を行った (図4)。

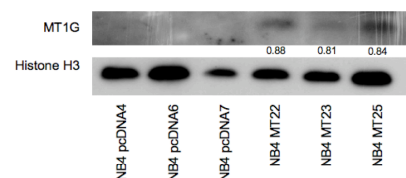


図4: メタロチオネイン(MT) 過剰発現急性前骨髄球性白血病 (NB4) 細胞株の樹立  
ウエスタンブロットの結果を示す。NB4MT22、MT23、MT25をMT過剰発現NB4細胞株としてその後の解析に用いた。

この細胞株を用いて検討を行ったところ、DNA メチル化酵素阻害剤同様に分化誘導を引

き起こす全トランス型レチノイン酸 (ATRA) の効果と MT 発現との間に負の関連を見出した (Hirako N et al., PLOS ONE 2014) (図 5)。なお、MT 同様 PU.1 標的遺伝子として同定

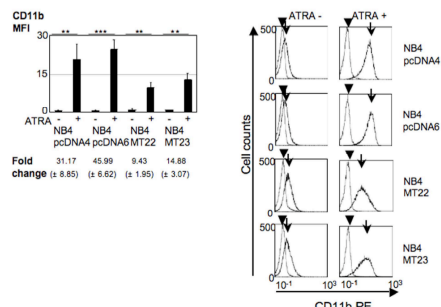


図5: MT過剰発現NB4細胞株は分化誘導薬である全トランス型レチノイン酸(ATRA)に抵抗性である  
フローサイトメトリーにより顆粒球系細胞分化マーカーであるCD11bを測定したところ、MT過剰発現NB4細胞株は、CD11b発現誘導の減弱が認められた。右:ヒストグラム、左:3回の実験結果をまとめたもの。

した VIM であるが、VIM 過剰発現 K562 細胞を作成し、5-azadc の添加を行ったが、分化マーカー変化における一定の傾向を認めず、VIM はエピジェネティック薬剤の明らかな薬効には関与していない可能性が示唆された。これら一連の研究により、PU.1 及び MT 遺伝子発現の検討が、エピジェネティック薬剤等の分化誘導療法の効果を予測するバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

(3) なお、北里大学医学部倫理委員会 (B 倫理 10-92、G 倫理 10-17) の承認のもと、AML 臨床検体を用いて、①MT-1 遺伝子制御領域の DNA メチル化比率と MT-1 発現の関連、②芽球を用いた 5-azadc 添加後の生細胞割合と MT-1 発現の検討を計 8 例で行った。その結果、少数例のためか①、②ともに関連が認められなかった。さらなる解析の続行を試みたが、新規患者検体を得られなくなったため、中断せざるを得なくなっている。よって、現時点では関連の証明は出来ていない。

## 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 18 件)

### 【総説】

1. Takahashi S, Positive and negative regulators of metallothionein gene, *Molecular Medicine Reports*, 査読あり, in press. doi: 10.3892/mmr.2015.3459.

2. Takahashi S, Epigenetic aberrations in myeloid malignancies, *International Journal of Molecular Medicine*, 査読あり, 32(3), p532-538, 2015. doi: 10.3892/ijmm.2013.1417.

3. Takahashi S, Molecular functions of metallothionein and its role in hematological malignances, *Journal of Hematology & Oncology*,

査読あり, 5(41), p1-8, 2012. doi: 10.1186/1756-8722-5-41.

4. Takahashi S, Current findings for recurring mutations in acute myeloid leukemia, *Journal of Hematology & Oncology*, 査読あり, 4(36), p1-11 (“Highly accessed” article), 2011. doi: 10.1186/1756-8722-4-36.

5. Takahashi S, Downstream molecular pathways of FLT3 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia: biology and therapeutic implications, *Journal of Hematology & Oncology*, 査読あり, 4(13), p1-10 (“Highly accessed” article), 2011. doi: 10.1186/1756-8722-4-13.

### 【原著】

6. Hirako N, Nakano H and Takahashi S, A PU.1 suppressive target gene, metallothionein 1G, inhibits retinoic acid-induced NB4 cell differentiation, *PLOS ONE*, 査読あり, 9(7), e103282, 2014. (Global Medical Discovery 社の Key Scientific Article に選定される) doi: 10.1371/journal.pone.0103282.

7. Nagashima R, Kawakami F, Takahashi S, Obata F and Kubo M, Allo-antigen stimulated CD8+ T cells Suppress NF- $\kappa$ B and Ets-1 DNA Binding Activity, and Inhibit Phosphorylated NF- $\kappa$ B p65 Nuclear Localization in CD4+ T cells, *Viral Immunology*, 査読あり, 27(6), p305-315, 2014. doi: 10.1089/vim.2013.0113.

8. Nakano H, Yanagita A and Takahashi S, The differentiation effect of low dose cytosine arabinoside is disturbed in PU.1-knockdown K562 cells, *Biomedical Reports*, 査読あり, 2(4), 564-568, 2014. doi:10.3892/br.2014.265

9. Satoh T, Miyazaki K, Shimohira A, Amano N, Okazaki Y, Nishimoto T, Akahoshi T, Munekata S, Kanoh Y, Ikeda Y, Higashihara M, Takahashi S and Kuwana M, *Fcg receptor IIB* gene polymorphism in adult Japanese patients with primary immune thrombocytopenia, *Blood*, 査読あり, 122(11), p1991-1992, 2013. doi: 10.1182/blood-2013-05-501858.

10. Suzuki S, Nakano H, Takahashi S, Epigenetic regulation of the metallothionein-1A promoter by PU.1 during differentiation of THP-1 cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読あり, 433(3), p349-353, 2013. doi:10.1016/j.bbrc.2013.03.007.

11. Fujiwara T, Yokoyama H, Okitsu Y, Kamata M, Fukuhara N, Onishi Y, Fujimaki S, Takahashi S, Ishizawa K, Bresnick E and Harigae H, Gene Expression Profiling Identifies HOXB4 as a Direct Downstream Target of GATA-2 in Human CD34+ Hematopoietic Cells, 査読あり, *PLOS*

ONE, 7(9), e40959, 2012. doi:  
10.1371/journal.pone.0040959.

12. Aoyama S, Nakano H, Danbara M, Higashihara M, Harigae H and Takahashi S, The differentiating and apoptotic effects of 2-aza-5'-deoxycytidine are dependent on the PU.1 expression level in PU.1-transgenic K562 cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読あり, 420(4), p775-781, 2012. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.03.071.

13. Nin DS, Kok WK, Li F, Takahashi S, Chng WJ and Khan M, Role of misfolded N-CoR mediated transcriptional deregulation of FLT3 in acute monocytic leukemia (AML)-M5 subtype, *PLOS ONE*, 査読あり, 7(4), e34501, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0034501.

14. Iseki Y, Nakahara M, Kubo M, Obata F, Harigae H and Takahashi S, Correlation of PU.1 and signal regulatory protein a1 expression in PU.1 transgenic K562 cells, *International Journal of Molecular Medicine*, 査読あり, 29(2), p319-323, 2012. doi: 10.3892/ijmm.2011.827.

15. Suzuki S, Inaba H, Satoh T, Okazaki T and Takahashi S, Activation of ERK and p38 by the addition of arsenic trioxide in Flt3-ITD cells, *Open Journal of Blood Diseases*, 査読あり, 1(2), p9-11, 2011. doi: 10.4236/ojbd.2011.12003

16. Okazaki T, Iwasaki T, Fukuoka A, Suzuki M, Katagiri H, Okano T, Takahashi S, Effects of albumin bound fatty acids on the growth of the human T lymphoblastic cell line Jurkat, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 査読あり, 47(9), p615-617, 2011. doi: 10.1007/s11626-011-9454-z.

17. Yamamura T, Takahashi S, Satoh T, Iwabuchi K and Okazaki T, Regulatory mechanism of silkworm hemocyte adherence to organs, *Zoological Science*, 査読あり, 28(6), p420-429, 2011. doi: 10.2108/zsj.28.420.

18. Maekawa T, Imoto A, Satoh T, Okazaki T and Takahashi S, Induction of b-catenin by the suppression of signal regulatory protein a1 in K562 cells, *International Journal of Molecular Medicine*, 査読あり, 27(6), p865-872, 2011. doi: 10.3892/ijmm.2011.630.

〔学会発表〕 (計 18 件)

【招待講演】

1. Takahashi S, Acute myeloid leukemia biology: recurrent mutations, and analysis of PU.1 target genes, Time on advances in haematological disorders, the "target therapy", 2014.1.30-2.1, Palermo, Italy.

【一般講演-海外】

2. Satoh T, Miyazaki T, Osawa E, Modegi N, Kita A, Kurihara S, Kawasaki Y, Shimada N, Nagane K, Higashihara M and Takahashi S. Detection of Anti-Thrombopoietin antibodies in patients with immune thrombocytopenia, American Society of Hematology Meeting (San Francisco, U.S.A.) 2014.12.8

3. Miyazaki T, Satoh T, Osawa E, Modegi N, Kita A, Kurihara S, Kawasaki Y, Shimada N, Nagane K, Higashihara M and Takahashi S. Detection of anti-thrombopoietin autoantibody among immune thrombocytopenic patients, 19<sup>th</sup> Congress of European Hematology Association Meeting (Milan, Italy), 2014. 6. 18

4. Fujiwara T, Yokoyama H, Okitsu Y, Kamata M, Fujimaki S, Moriguchi T, Takahashi S, Bresnick EH, and Harigae H. Decreased Expression of HOXB4 Gene in Aplastic Anemia; Regulatory Interaction with GATA-2, American Society of Hematology Meeting (San Diego, U.S.A.), 2011.12.12

【一般講演-国内】

5. Satoh T, Miyazaki K, Shimada N, Nagane K, Kita A, Kurihara S, Kawasaki Y, Kodaira Y, Osawa E, Modegi N, Higashihara M and Takahashi S, Analysis of anti-thrombopoietin antibody in patients with immune thrombocytopenia, 日本血液学会 (大阪府大阪市)、2014.11.2

6. 高橋伸一郎、メタロチオネイン 1-G の過剰発現は全トランス型レチノイン酸による急性前骨髄球性白血病細胞分化を阻害する、日本検査血液学会、(宮城県仙台市)、2014.7.20

7. 佐藤隆司、宮崎浩二、大沢絵莉子、茂出木菜穂美、喜多晃子、栗原紗恵子、川崎友里、小平祐衣、東原正明、高橋伸一郎、免疫性血小板減少症におけるトロンボポエチンに対する自己抗体の解析、日本血栓止血学会学術集会 (大阪府大阪市) 2014.5.31

8. 佐藤隆司、宮崎浩二、大沢絵莉子、茂出木菜穂美、喜多晃子、栗原紗恵子、川崎友里、小平祐衣、東原正明、高橋伸一郎、免疫性血小板減少症における抗トロンボポエチン抗体の解析、日本臨床免疫学会総会 (山口県下関市) 2013.11.27

9. Hirako N, Nakano H and Takahashi S, MT-1G disturbs ATRA induced differentiation of NB4 cells through the inhibition of p53, 日本血液学会 (北海道札幌市) 2013.10.13

10. Satoh T, Shimohira A, Amano N, Okazaki Y, Nishimoto T, Akahoshi T, Munekata S, Knoh Y, Okada J, Ikeda Y, Miyazaki K, Higashihara M, Kuwana M and Takahashi S, Analysis of Fcγ receptor 2A, 2B and 3A polymorphisms in adults with immune thrombocytopenia, 日本血液学会 (京都府京都市) 2012. 10. 20

11. 平子奈緒美、中野博子、高橋伸一郎、メタロチオネイン-1G の過剰発現は全トランス型レチノイン酸による急性前骨髄球性白血病細胞分化を阻害する、第 25 回北里大学バイオサイエンスフォーラム、北里大学薬学部コンベンションホール (東京都)、2012. 8. 2

12. 岩寄哲巳、福岡明美、片桐裕史、佐藤隆司、高橋伸一郎、岡野哲郎、岡崎登志夫 無血清培養白血病細胞増殖に及ぼす脂肪酸の影響、日本臨床検査医学会 (岡山県岡山市) 2011. 11. 19

13. 小川雄大、奥野広教、青山紗由理、鈴木佐和美、井本明美、高橋伸一郎、各種エピジェネティック薬剤が PU. 1 発現改変細胞に与える影響、神奈川医学検査学会 (神奈川県横浜市) 2011. 11. 6

14. 長島隆一、久保誠、高橋伸一郎、川上文貴、小幡文弥、アロ抗原刺激 CD8 陽性 T 細胞による HIV-1 複製制御機構の解明、第 24 回北里大学バイオサイエンスフォーラム、北里大学 L2 号館 (神奈川県相模原市)、2011. 8. 23

15. 小川雄大、奥野広教、青山紗由里、鈴木佐和美、井本明美、高橋伸一郎、各種エピジェネティック薬剤が PU. 1 発現改変細胞に与える影響、第 24 回北里大学バイオサイエンスフォーラム、北里大学 L2 号館 (神奈川県相模原市)、2011. 8. 23

16. 鈴木佐和美、井本明美、青山紗由里、佐藤隆司、岡崎登志夫、檀原幹生、東原正明、高橋伸一郎、PU. 1 によるエピジェネティックな遺伝子発現制御機構、第 24 回北里大学バイオサイエンスフォーラム、北里大学 L2 号館 (神奈川県相模原市)、2011. 8. 23

17. 山田雄基、川上文貴、鈴木小織、樋口奈沙、村山裕馬、高橋伸一郎、市川尊文、Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) による p53 のリン酸化に関する解析、第 24 回北里大学バイオサイエンスフォーラム、北里大学 L2 号館 (神奈川県相模原市)、2011. 8. 23

18. 下平麻子、佐藤隆司、宮崎浩二、天野直樹、岡崎登志夫、東原正明、桑名正隆、高橋

伸一郎、特発性血小板減少性紫斑病における FcγRIIB の一塩基多型解析、第 24 回北里大学バイオサイエンスフォーラム、北里大学 L2 号館 (神奈川県相模原市)、2011. 8. 23

[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 1 件)

名称：DNA メチル化阻害剤の薬剤効果検出方法  
発明者：高橋伸一郎  
権利者：学校法人北里研究所  
種類：特許  
番号：第 5592793 号  
出願年月日：平成 21 年 8 月 28 日  
取得年月日：平成 26 年 8 月 8 日  
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 伸一郎 (TAKAHASHI, Shinichiro)  
北里大学・医療衛生学部・教授  
研究者番号：40375069

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者

佐藤 隆司 (SATO, Takashi)  
北里大学・医療衛生学部・講師  
研究者番号：90407114