

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19609

研究課題名(和文) マイクロアレイによる網羅的解析を用いた白血病細胞の薬剤感受性の解明

研究課題名(英文) Clarification of drug sensitivity in leukemia cells by comprehensive analysis by microarray technology

研究代表者

坂口 公祥 (Sakaguchi, Kimiyoshi)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00402280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：DNA脱メチル化薬であるデシタピンによって、急性リンパ性白血病株CCRF-CEM, Jurkat, BALL-1, NALM-6の薬剤感受性が改善することが示された。MEST, NDRG4, ZNF750の3種類の遺伝子はがん抑制遺伝子として知られており、デシタピン添加によってDNA脱メチル化とmRNA発現量増加が認められた。このため、これらの遺伝子が白血病細胞の薬剤感受性に関わる候補遺伝子と考えられた。ただし、これらの遺伝子が真に薬剤感受性に関わる遺伝子であるか、さらなる検討が必要であった。

研究成果の概要(英文)：Decitabine, a DNA demethylating agent, showed improved drug sensitivity in acute lymphocytic leukemia cell lines, CCRF-CEM, Jurkat, BALL-1, and NALM-6. Three genes, MEST, NDRG4, and ZNF750, are known as tumor suppressor genes, and observed DNA demethylation and increase in mRNA expression level by the addition of decitabine. Therefore, we considered these genes are the candidate genes concerning drug sensitivity in leukemia cells. However, further study was required to whether these genes are truly concerning drug sensitivity.

研究分野：小児血液学

キーワード：薬剤反応性 がん 遺伝子 マイクロアレイ

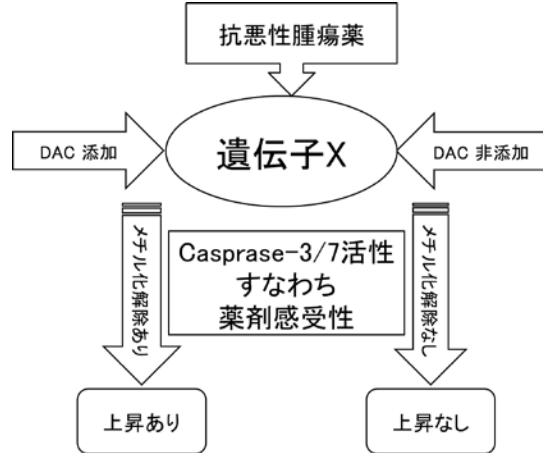
1. 研究開始当初の背景

白血病細胞を脱メチル化薬である decitabine (DAC) で処理することは、白血病細胞の抗悪性腫瘍薬に対する薬剤耐性を改善させる一つの方法であることを研究代表者は確認した。しかし、実際にどの遺伝子がターゲットであるかは不明であり、これを明らかにすることで白血病細胞の薬剤耐性化に関わる遺伝子が解明されれば、これに対する分子標的薬の開発などを通じて難治性白血病に対する新たな治療戦略の開発につながる可能性があると考えた。

2. 研究の目的

マイクロアレイを用いた網羅的な発現量の解析やメチル化状態の解析により薬剤感受性に関与する遺伝子を抽出し、検証することで、急性白血病の薬剤感受性に関わる機序を明らかにすることを目的とする。

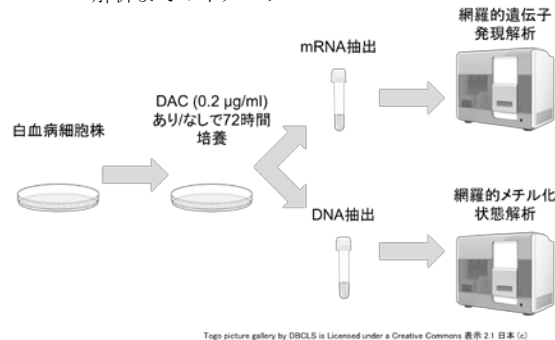
図1: DAC 処理による薬剤感受性改善イメージ



3. 研究の方法

(1) 白血病細胞株 (KG-1, HL60, THP-1, NALM-6, BALL-1, HAL-1, CCRF-CEM, MOLT4, Jurkat など) を脱メチル化薬 DAC で処理する。遺伝子発現量やメチル化状態の変化をマイクロアレイで解析し、DAC 処理のあり/なしで遺伝子発現量やメチル化状態に差が出た遺伝子を抽出する。

図2: DAC 処理からマイクロアレイによる網羅的解析までのイメージ



DNA 脱メチル化の判断基準としては、DAC 添加なしでメチル化率が 80%以上あり、DAC 添加時のメチル化率が DAC 非添加時のメチル化率よりも 1/2 未満になっているものを脱メチル化と判断した。また、遺伝子発現量増加は DAC 添加時の mRNA

発現量が DAC 非添加時の mRNA 発現量よりも 2 倍以上であったものを高発現と判断した。

(2) (1) で抽出された候補遺伝子の発現量やメチル化状態が DAC 処理のあり/なしで差があることを RQ-PCR 法や bisulfite sequence 法を用いて確認する。さらに、その遺伝子がコードする蛋白発現の変化もウェスタンブ

図3: 候補遺伝子 X のノックダウンによって薬剤感受性が改善するイメージ



ロット法を用いて確認する。

(3) (2) で DAC 処理のあり/なしで遺伝子発現量やメチル化状態、蛋白発現量に差がある標的遺伝子であることが証明されたら、当該標的遺伝子を RNAi によりノックダウンする。ノックダウン後に薬剤感受性試験を行い、ノックダウンなしの場合と比較して薬剤感受性が改善することを確認する。

4. 研究成果

平成 27 年度に急性リンパ性白血病株 Jurkat, BALL-1, NALM-6 に対し、DAC あり/なしで 72 時間培養を行った。これらの細胞から DNA および mRNA を抽出し、マイクロアレイを用いた網羅的 DNA メチル化状態解析と網羅的遺伝子発現解析を行った。CCRF-CEM に関してはすでに以前の検討で上記解析を行っていたため、資金の節約のために以前のデータを流用することとした。

DNA の脱メチル化と mRNA の発現上昇がともに認められた遺伝子は表 1 に示すとおり、CCRF-CEM では 30 種類あったが、Jurkat では 1 種類、NALM-6 では 3 種類のみであり、BALL-1 には存在しなかった。そしてこれら 4 種類の細胞株のうち、複数の細胞株で共通する遺伝子は ACRC, CTTN の 2 種類のみであった。

しかし、ACRC はがんに対する影響の不明な遺伝子であり、CTTN は骨肉腫において患者の生存率低下に関わる遺伝子であることが知られているため、これらの遺伝子発現の増加は薬剤感受性の改善につながらないと判断された。したがって、薬剤感受性に関わる候補遺伝子が存在しないことになり、マイクロアレイによる網羅的 DNA メチル化状態解析と網羅的遺伝子発現解析を用いて候補遺伝子を抽出し、その結果を利用してさらに検討を進めることが当初の方針であったため、この時点で大きく外れてしまった。反省点としては DAC 添加/非添加による薬剤感受性試験を同条件で検討していなかったため、真に薬剤感受性の改善した細胞株であったのか否かの結果を得ていないことであった。このた

め、候補遺伝子の抽出にあたっては DAC 添加/非添加による薬剤感受性試験も同条件で実施することが必要と判断した。

表 1: 脱メチル化かつ高発現となった遺伝子群 その 1

Jurkat ACRC	CCRF-CEM	NALM-6 ACRC	BALL-1 なし
	ADARB2		
	ADCY4		
	AGAP1		
	BASP1		
	C3orf67		
	CACNA2D4		
	CNPY1		
	COL23A1		
	CTTN	CTTN	
	GRIN2D		
	JAG2		
	JAKMIP3		
	JPH2		
	JPH4		
	KATNAL2		
	KCNG1		
	LAMA5		
	LMF1		
	MATN4		
	NLRP4		
	PCDHA4		
	PCDHGB3		
	PDCD1		
	PRKCZ		
	RIMS1		
	SLCO3A1		
	TIE1		
		TRPM4	
	WNT3		
	ZBTB46		
	ZFR2		

平成 28 年度には薬剤感受性試験実施のための試薬購入などのためのみに資金の使用を抑え、平成 29 年度に再度急性リンパ性白血病株 CCRF-CEM, Jurkat, BALL-1, NALM-6 に対してマイクロアレイを用いた網羅的 DNA メチル化状態解析と網羅的遺伝子発現解析を行った。また、検討にあたっては薬剤感受性

表 2: 脱メチル化かつ高発現となった遺伝子群 その 2

Jurkat	CCRF-CEM	NALM-6 ACRC	BALL-1 ACRC
			CNR2
	CXXC5		CXXC5
DNAJC5G			DNAJC5G
			GJB2
			GSN
		HMOX1	HMOX1
		HSPA2	HSPA2
	MEST	MEST	MEST
		NDRG4	NDRG4
		NMU	NMU
PYCR1			
		SULT4A1	SULT4A1
		TDRD9	TDRD9
		TUBB6	TUBB6
	ZNF750	ZNF750	ZNF750

試験も再び実施し、DAC 添加による薬剤感受性への影響のあり/なしも検討を行った。

再度の検討によって DNA の脱メチル化と mRNA の発現上昇がともに認められた遺伝子は法 2 に示すとおり、CCRF-CEM では 3 種類、Jurkat では 2 種類、NALM-6 では 10 種類、BALL-1 では 15 種類であった。4 種類の細胞株のうち、複数の細胞株で共通する遺伝子は ACRC, CXXC5, DNAJC5G, HMOX1, HSPA2, MEST, NDRG4, NMU, SULT4A1, TDRD9, TUBB6, ZNF750 の 12 種類であった。これら 12 種類の遺伝子のうち、ACRC, DNAJC5G, SULT4A1, TDRD9 はがんに対する影響の不明な遺伝子であった。CXXC5 は高発現によって白血病発生に関わること、担がん患者の生存率低下に関わることが知られている遺伝子であり、HMOX1, HSPA2 は高発現によって担がん患者の生存率低下に関わることが知られている遺伝子であるため、候補遺伝子から除外した。また、NMU はさまざまながん種において発がんの driver となっていることが示されている遺伝子であり、TUBB6 は高発現によって細胞死の一種である pyroptosis が減少することが知られているので、候補遺伝子から除外した。NDRG4, ZNF750 は高発現によって担がん患者の生存率向上が報告されており、がん抑制遺伝子として知られている。また、MEST は Wnt 経路を抑制することが知られていること、卵巣がん細胞では高メチル化されているとシスプラチンに対して耐性化することが知られている。このため、MEST, NDRG4, ZNF750 の 3 種類は脱メチル化と遺伝子発現量増加によって白血病細胞の薬剤感受性を改善させる候補遺伝子と考えられた。さらに、MEST, ZNF750 の 2 種類は Jurkat を除く 3 つの細胞株で共通していることで、より候補遺伝子である可能性が高いと判断された。

薬剤感受性試験においては表 3 に示すとおり、全ての細胞株において複数の薬剤で combination index が 1 未満であった。したがって、併用効果は「相乗」となり、今回検討した 4 種類の細胞株は全て DAC による薬剤感受性の改善が認められると判断された。

表 3: DAC 併用薬剤感受性試験結果

Combination index	Jurkat	CCRF-CEM	NALM-6	BALL-1
DAC + Dasatinib	N/A	N/A	0.60863	0.33309
DAC + Dexamethasone	0.51281	0.0038	0.46956	0.09367
DAC + Vincristine	0.01895	0.00305	0.33538	1.0712
DAC + L-asparaginase	0.01895	0.04224	0.84273	0.43613
DAC + Clofarabine	0.03714	1.28613	0.95617	0
DAC + Cytarabine	0.20865	2.32259	0.77745	0.00447
DAC + Etoposide	0	1.27367	0.80889	0.000041618
DAC + Daunorubicin	0.44701	1.83817	0.39929	N/A
DAC + Idarubicin	N/A	1.74099	1.42721	N/A
DAC + Mitoxantrone	N/A	0.2254	0.74185	N/A
DAC + Fludarabine	0	2.07962	1.42157	0
DAC + Prednisolone	N/A	1.63751	0.23537	N/A

このため、マイクロアレイによって得られた結果にも信頼性があると考えられた。

以上の結果より、脱メチル化と遺伝子発現量増加によって白血病細胞の薬剤感受性を改善させる可能性のある遺伝子として MEST, NDRG4, ZNF750 の 3 種類が候補となった。これが本研究の成果となる。

しかし、当初の計画では、候補遺伝子の抽出後に RQ-PCR 法や bisulfite sequence 法を用いてマイクロアレイによって得られた結果の確認をすること、候補遺伝子のノックダウンによる薬剤耐性化の確認などを行うこととなっていたが、資金の問題と、当初の計画よりも大幅に遅れてしまったことによって候補遺伝子の抽出以上の検討ができなかった。

白血病細胞の薬剤感受性に関わる候補遺伝子の抽出までは実施できたため、他の資金を獲得してさらなる検討を続けたい。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

坂口 公祥、Combined effects of demethylating agents and anthracyclines are different for each drug and cell, The 12th St. Jude Viva-Forum、2018 年 3 月 10 日～11 日、シンガポール (シンガポール)

[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・講師

研究者番号：00402280