

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09000

研究課題名(和文) DNAメチル化の観点から骨髄異形成症候群の発症機序に迫る

研究課題名(英文) Approach to mechanism of pathogenesis in MDS using DNA methylation analysis

研究代表者

辻岡 貴之 (Tsujioka, Takayuki)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50330551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：DNAメチル化阻害薬(DNMTi)は骨髄異形成症候群(MDS)の治療に用いられる。我々はMDS細胞株をDNMTiで処理し、網羅的遺伝子発現解析とメチル化解析を行った後、薬剤処理で発現が上昇し脱メチル化された遺伝子を抽出した。特にCH25Hに注目した。CH25Hは25-OHCを産生する。CH25HはDNMTi処理により発現量が増加した。プロモーター解析でメチル化されていたが、薬剤処理で脱メチル化が起こり、mRNAの発現増加、CH25H-オキシステロール経路の活性化、25-OHCの産生、アポトーシスによる細胞死が誘導された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髄異形成症候群(MDS)は予後良好の血液悪性腫瘍である。治療は造血幹細胞移植しかないが、高齢発症が多いため、移植適応外患者の治療薬について以前から切望されてきた。最近、MDSに対するDNAメチル化阻害薬(DNMTi)の有用性が指摘されているが、作用機序の詳細、ターゲットになる遺伝子は同定されていない。今回、我々は網羅的遺伝子発現解析と次世代シーケンサーによる網羅的メチル化解析を行い、コレステロール-25-ヒドロキシラーゼ(CH25H)の発現増加に注目した。

研究成果の概要(英文)：DNA methyltransferase inhibitors (DNMT inhibitors) are administered for high-risk MDS, but their action mechanisms are not fully understood. We performed a genome-wide DNA methylation assay and focused on cholesterol 25-hydroxylase (CH25H) among the genes whose expression was up-regulated and whose promoter region was hypomethylated after decitabine (DAC) treatment. CH25H produces 25-hydroxycholesterol (25-OHC). Although CH25H mRNA expression level was low in MDS/leukemia cell lines, exposure to DNMT inhibitors enhanced CH25H mRNA expression. The promoter region of CH25H was hypermethylated in HL-60 and MDS-L cells, but DAC induced their hypomethylation together with increased CH25H mRNA expression, activation of CH25H-oxysterol pathway, 25-OHC production and apoptotic cell death. The present study raises a possibility that DNMT inhibitors activate CH25H-oxysterol pathway by their hypomethylating mechanism and induce leukemic cell death.

研究分野：血液検査学

キーワード：MDS DNMTi 白血病 DNAメチル化 コレステロール-25-ヒドロキシラーゼ 25-オキシステロール

## 1. 研究開始当初の背景

DNAメチル化阻害薬(DNMTIs)は高リスクMDS患者を対象としたAZA-001 study(Fenaux P et al. Lancet Oncol 2009)において従来の治療法と比べ全生存期間に有意差を認めた。近年、MDS症例の約20%でDNA脱メチル化機序に係わるTET2遺伝子に変異を認めることが報告された(Shih AH et al. Nat Rev Cancer 2012)。

我々は、in vitro MDSモデルを用いてDNMTIsの効果を検討し、極めて低濃度で腫瘍細胞に対して増殖抑制効果を認めることを報告した(Tsujioka T et al. Curr Pharm Des 2012, Tsujioka T et al. Exp Hematol 2013)。また、DNAマイクロアレイと網羅的メチル化解析によって増殖抑制に関係する遺伝子としてCH25Hに注目した(Tsujioka T et al. Sci Rep 2015)。

最近の報告ではインターフェロン処理による抗ウイルス効果の機序とCH25H発現上昇の関係が注目されている(Liu SY:Immunity, 2013)。

我々はMDSにおいて、CH25Hがメチル化阻害薬により脱メチル化されその発現上昇に伴い、下流の代謝産物である25-OHC、胆汁酸が産生過剰となり細胞死が誘導されるという仮説の検証を試みる。

## 2. 研究の目的

骨髄異形成症候群(Myelodysplastic syndromes, MDS)は造血幹細胞の腫瘍性増殖と無効造血を特徴とした難治性後天性造血障害である。他の血液疾患と比べて分子基盤に基づいた診断・治療が大きく立ち遅れた分野であり、疾患の分子機序解明と新規治療法の確立が不可欠である。DNAメチル化阻害薬(DNMTIs: decitabine, azacitidine)は高リスクMDS患者を対象とした臨床研究において従来の治療と比べて予後の向上を認めたが、作用基盤は極めて不明瞭である。当教室では独自のin vitro MDS細胞モデルを用いて、DNMTIsの増殖抑制効果を検討し、コレステロール25-ヒドロキシラーゼ(CH25H)の発現増加に注目してきた。今回の研究ではCH25Hの増殖抑制効果に及ぼす影響や、下流にあるオキシステロール、胆汁酸が細胞に与える影響を明らかにしていく。さらに、DNAメチル化の観点からCH25Hの発現が、MDSの病因、治療効果、予後にどう関係するか検討しMDS患者の予後向上に貢献する。

「DNMTIsによるCH25Hの脱メチル化がMDS細胞の増殖にどのような影響を及ぼすかを明らかにすること。」である。

高齢者に好発し難治性血液疾患であるMDSは通常の化学療法に抵抗性で、有力な治療法が存在せず長年、対症療法(輸血)が中心であった。DNMTIsの臨床への導入で予後の改善が得られたが、どの遺伝子に効果を与えているのか未だに不明瞭である。当教室のMDS in vitro modelは世界に類を見ない細胞株でありこの点を明らかにするツールとして最適である。

DNMTIsが作用しているターゲット遺伝子が明らかになれば、それを標的とした分子標的治療の開発につながる可能性がある。また本遺伝子発現の有無やメチル化の有無とMDSの疾患予後、治療前に治療効果を予測することが可能になる。

## 3. 研究の方法

- ・患者細胞を用いたCH25H mRNAの定量、メチル化解析。当該症例の治療効果・予後の観察。
- ・患者細胞にLenti-virusを用いてCH25HshRNAを導入し細胞増殖への関与を検討する。
- ・下流代謝産物(オキシステロール・胆汁酸)を質量分析装置(LC/MS)で測定する。

## 4. 研究成果

CH25Hが細胞株のレベルでDNMTIsの増殖抑制に関わっていることは分かったが患者検体での検証が必要である。CH25Hの下流代謝産物の細胞への影響も明らかにする必要がある。

○患者MDS, 急性白血病(Acute Leukemia: AL)細胞を用いた検証実験。

DNMTIs処理群, 未処理群からgenome DNAとmRNAを抽出した(50例解析予定。既に17例解析済)。現在解析済みの症例ではCH25Hプロモーター部位にメチル化のみられた症例は1例のみである。DNMTIs処理により複数の症例でCH25H mRNAの発現増加を認めた。

今後の展望: 対象患者の臨床情報を取得。治療効果や予後を観察する。

予想される結果: 患者症例のCH25H発現が低下している可能性がある。メチル化の有無(メチル化シークエンスで検索)でDNMTIsに対する感受性や予後を予想出来る可能性がある。

○患者MDS, AL細胞にCH25HshRNAを導入し細胞増殖抑制への関与を検討する。

細胞株と同様に DNMT1s で処理した場合、CH25H 発現低下により細胞増殖抑制が阻害されることを期待する。

○ 最終代謝産物である胆汁酸の増加を確認することによって CH25H を中心としたコレステロール・オキシステロール代謝経路が活性化していることを証明する。

細胞ペレットと培養上清を外部検査会社に委託し質量分析装置 (LC/MS) で測定中である。

薬剤処理群で胆汁酸の増加を認めた。次の展開として、無血清培養を行い、胎児血清中の胆汁酸ではなく、確実に細胞内で新生されたものか確認する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

[http://www.kawasaki-m.ac.jp/lh/research\\_act.htm](http://www.kawasaki-m.ac.jp/lh/research_act.htm)

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----