

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08810

研究課題名(和文)急性骨髄性白血病における変異型セリンプロテアーゼの高発現とその生物学的意義の解明

研究課題名(英文)Serine protease expression and its biological significance in AML

研究代表者

石川 裕一(Ishikawa, Yuichi)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：80721092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：急性骨髄性白血病(AML)は依然として難治性悪性疾患の一つであり、研究代表者らは再発AML検体を用いたRNAシーケンス解析を実施したところ、セリンプロテアーゼである好中球エラスターゼ遺伝子群の高発現と異常転写産物発現を同定した。本研究ではAMLにおけるセリンプロテアーゼの遺伝子発現、その生物学的意義の解明を目的とした。AML患者試料を用いた検討では、白血病細胞の分化および細胞系列とPRTN3遺伝子発現量の関連が認められた。また、細胞株、マウス白血病モデルでのPRTN3遺伝子の欠損は、シグナル伝達経路への影響を通じてAML発症、細胞増殖に影響を与え、その治療標的としての可能性を見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、難治性AML試料から同定した好中球エラスターゼ発現の臨床的、生物学的意義について解析を行い、AML発症に関連する分化、融合遺伝子や遺伝子変異と好中球エラスターゼ高発現との関わりについて明らかにした。また、本研究では、同分子が細胞内シグナル伝達経路と関連してAMLの発症進展に重要である事も示し、AMLの発症基盤および治療抵抗因子の解明、新規疾患層別化とその克服につながる成果が得られた。さらに、好中球エラスターゼは、造血器腫瘍以外の悪性腫瘍では殺細胞効果を示すとされ、同分子とその周辺シグナル経路との関わりは、造血器腫瘍のみならず固形腫瘍における新規治療法への発展も考えられる。

研究成果の概要(英文)：Acute myeloid leukemia (AML) is still one of the refractory malignant diseases and relapsed in more than half of patients. We identified high expression of neutrophil elastase gene which encoded serine protease and its abnormal transcripts in recurrent AML specimens by RNA sequence analysis. The purpose of this study was to elucidate the clinical and biological significance of the expression of serine protease genes in AML. In patient samples, leukemic cell differentiation and cell lineage and PRTN3 gene expression was closely associated. In addition, the deletion of the PRTN3 gene in cell lines and mouse leukemia model affected the onset of AML and leukemia cell proliferation through the downregulation of signal transduction pathways and suggested the potency of PRTN3 gene as a therapeutic target for AML treatment.

研究分野：造血器腫瘍

キーワード：造血器腫瘍 急性骨髄性白血病 セリンプロテアーゼ 好中球エラスターゼ 細胞内シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病(AML)のうち約 25%を占める core binding factor-AML(CBF-AML)は染色体異常 t(8;21)もしくは inv(16)/t(16;16)から生じるキメラ融合分子が白血病発症に深く関わっているが、白血病発症には融合遺伝子のみでは不十分であり、他の分子異常の蓄積が必要とされている。また、AML の中でも予後良好群とされる CBF-AML であるが、約 40%の患者で再発が認められ、他の癌腫と比較しても予後良好とは言い難いのが現状であり、その発症、治療抵抗メカニズムについては十分に明らかでない。本研究者は、CBF-AML の病態形成、再発難治性に関わる分子異常検索を目的に、難治性 CBF-AML の初発時・寛解時・再発時の骨髄検体を用いて、全エクソンシーケンシング、RNA シーケンシング解析を行った。その結果から、これらの検体で高頻度に、セリンプロテアーゼの一つである PRTN3 遺伝子の新規異常転写産物を見いだした。以前より、AML で PRTN3 遺伝子の高発現が報告されており、同遺伝子の正常転写産物と異常転写産物の発現量の定量化を AML 検体で行ったところ、CBF-AML および、それ以外の AML の一部で異常転写産物の発現量の増加が認められた。正常 PRTN3 分子はアポトーシス経路に関連する分子の cleavage、活性化、細胞増殖経路に抑制的に関与していることから、その機能喪失が骨髄系細胞の不死化、細胞増殖を導き白血病発症、治療抵抗性に関与する可能性が考えられた。また、CBF-AML 同様に、染色体転座により生じるキメラ遺伝子、*PML-RARA* が白血病発症に関わっている急性前骨髄球性白血病(APL)において、セリンプロテアーゼの一種である *ELA2* 遺伝子の高発現が報告されている。さらに、マウス血球に *PML-RARA* を導入した白血病マウスの検討では、*ELA2* 遺伝子を欠損させたマウスでは有意に白血病発症頻度が低下したと報告され、このように、白血病発症に重要な役割を果たす染色体転座によるキメラ融合蛋白とセリンプロテアーゼの関わりが報告されているが、その詳細については解明されていない。

2. 研究の目的

本研究は、今回同定した PRTN3 異常転写産物も含めて、セリンプロテアーゼの AML における発現異常と白血病発症および治療抵抗性との関わりについて着目し、その臨床的意義、生物学的意義の解明を通じてそれらを標的とする新規 AML 治療法開発の可能性について検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)正常、異常 PRTN3 遺伝子転写産物の発現と AML 病型、分子異常との関わりについての検討前実験による検討より、CBF-AML を含む AML の病型による正常もしくは変異型 PRTN3 転写産物の発現が異なることが示唆され、このような背景から以下の解析を行った。

- ・CBF-AML および他の AML 患者検体を用いて AML 細胞における、正常もしくは異常 PRTN3 遺伝子転写産物の発現量、その発現比率について解析を行う。
- ・正常、異常 PRTN3 遺伝子転写産物の発現と AML 病型、染色体異常、遺伝子異常との関係についての解析し、PRTN3 高発現、異常転写産物の発現と関連する分子異常を明らかにする。
- ・これにより、セリンプロテアーゼ発現から見た新たな疾患群の層別化を行い、それらを治療標的とするのにより適した AML 疾患群を同定する。

(2)PRTN3 遺伝子発現の発現、欠失が白血病細胞へもたらす影響およびそれに関わるメカニズム

の検討

・白血病細胞株で PRTN3 遺伝子を欠損、発現させた細胞にて、細胞増殖、細胞周期、アポトーシスへの影響について検討を行う。

・また、同遺伝子を欠失させた細胞株を用いて遺伝子発現解析、蛋白発現解析を行い、プロファイルの変化により造血細胞における機能、白血病発症に関わる分子異常について検討し、セリンプロテアーゼ異常と白血病発症に関わる分子経路を同定する。

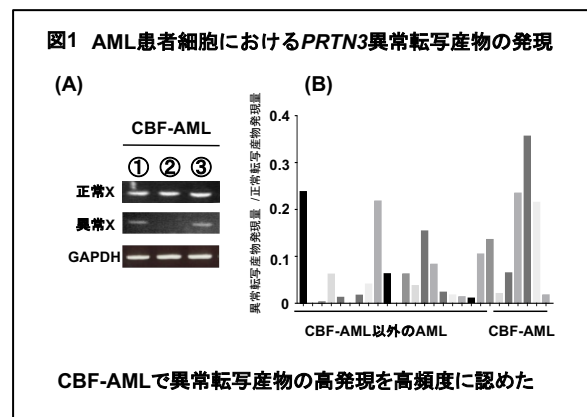
(3) マウス白血病モデルを用いた PRTN3 発現による白血病細胞への影響と治療標的としての検討

・PRTN3 欠損白血病細胞をマウスに再移植を行い in vivo における PRTN3 発現と白血病発症、進展の関わりを検討する。

4. 研究成果

(1) 正常、異常遺伝子 PRTN3 転写産物の発現と AML 病型、分子異常との関わりについての検討

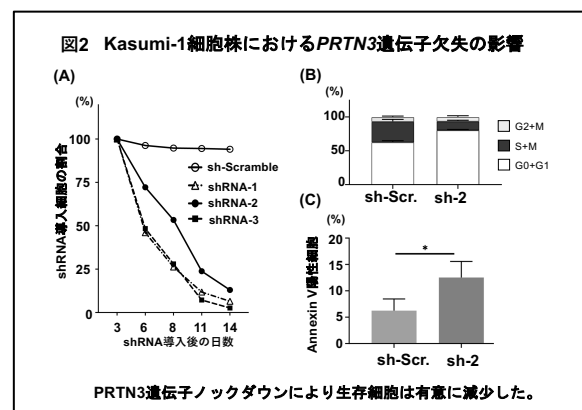
合計 AML56 例での PRTN3 遺伝子発現検討では、染色体異常 t(8;21)、inv(16)を有する CBF-AML で高発現が認められ、異常転写産物の発現も高い傾向が認められた(図 1)。併存する遺伝子変異との関わりについての検討では、AML で高頻度に報告されている 50 以上の遺伝子における遺伝子変異と PRTN3 遺伝子発現レベルには相関は認められなかった。FAB 分類別でみた検討では、M0、M1、M5、および M6 症例での発現量は低く、AML 細胞



の分化および細胞系列と同遺伝子発現量の関連が認められた。一方で、例外的な AML 細胞も認められ、更なる検体の追加による分子異常との関連についての解析が必要と考えられた。

(2) PRTN3 遺伝子、同異常転写産物の発現、欠失が白血病細胞へもたらす影響およびそれに関わるメカニズムの検討

正常及び変異型 PRTN3 を共発現する CBF-AML 細胞株 Kasumi-1 に正常型と変異型に共通する配列を標的とした shRNA を導入すると、ノックダウンされた細胞では有意に細胞増殖の抑制が認められ、アポトーシスに関する検討では、shRNA 導入細胞におけるアネキシン V 陽性細胞割合の増加が認められた。また、細胞周期解析では、shRNA 導入細胞において G1 期細胞の増加、G2-M 期細胞の減少が認められ、PRTN3 のノックダウンによりアポトーシス細胞の増加、細胞周期への影響が確認された(図 2A, B, C)。他の細胞株を用いた検討では、Kasumi-1 同様に CBF-AML 細胞株である、SKN0-1 細胞株においても、PRTN3 遺伝子のノックダウンにより細胞増殖の抑制が認め、PRTN3 を発現している細胞株で同様の結果が得られた。一方で、K562、HEL の赤芽球系白血病細胞株では、前述の患者試料を用いた検討同様に PRTN3 の発現量が低値であり、PRTN3 遺伝子ノックダウンによる細



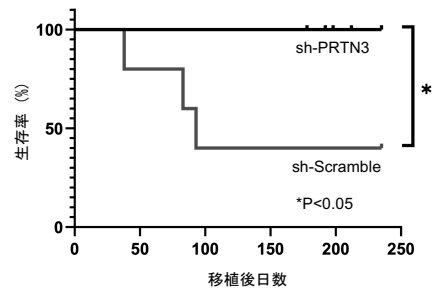
胞増殖への影響も乏しかった。次いで、Kasumi-1、SKNO-1の両細胞株にshRNAを導入した細胞でトランスクリプトーム解析を実施したところ、両細胞株において、シグナル伝達経路を制御する遺伝子群の発現低下が認められた。また、RNAシーケンスの結果から、細胞分裂、細胞骨格形成に関わる遺伝子の発現にも影響が認められ、これらの経路を通じた、AMLの発症、進展との関わりが示唆された。

(3) マウス白血病モデルを用いたPRTN3発現による白血病細胞への影響と治療標的としての検討

MLL-AF9キメラ遺伝子を導入した白血病マウスモデルから得られたAML細胞にPRTN3遺伝子に対するshRNAを遺伝子導入して2次移植を行い、白血病発症並びに生存へ与える影響について検討を行った。PRTN3に対するshRNA導入細胞を移植したマウス群では、AML発症頻度が減少、発症遅延が認められ、有意に生存が延長した(図3)。これらより、AML細胞におけるPRTN3の発現は、白血病マウスモデルにおいても白血病の発症・進展に深く関わっている可能性が示唆された。

以上の結果より、好中球エラスターゼの一つである、PRTN3遺伝子は白血病細胞の増殖、細胞死に関わり、そのノックダウンによりAML細胞の増殖がin vitro、in vivoのいずれにおいても抑制され、そのメカニズムとして細胞内シグナル伝達経路を通じた細胞分裂、細胞骨格形成への影響も考えられた。これらより、同分子、これらの経路を標的とするような新規白血病治療の可能性が示された。

図3 PRTN3 遺伝子欠失AML細胞移植マウスの生存解析



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kawashima Naomi, Ishikawa Yuichi, Kim Jeong Hui, Ushijima Yoko, Akashi Akimi, Yamaguchi Yohei, Hattori Hikaru, Nakashima Marie, Ikeno Seara, Kihara Rika, Nishiyama Takahiro, Morishita Takano, Watanabe Koichi, Ozawa Yukiyasu, Kitamura Kunio, Kiyoi Hitoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Comparison of clonal architecture between primary and immunodeficient mouse-engrafted acute myeloid leukemia cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1624
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-29304-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kiyoi Hitoshi, Kawashima Naomi, Ishikawa Yuichi	4. 巻 111
2. 論文標題 FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: Therapeutic paradigm beyond inhibitor development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 312 ~ 322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14274	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石川裕一
2. 発表標題 AML治療におけるFLT3阻害剤の現状と課題
3. 学会等名 第59回 日本癌治療学会学術集会2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中島麻梨絵、石川裕一、川島直実、金 貞姫、黒川貴司、寺島浩史、成瀬世新、牛島洋子、清井 仁。
2. 発表標題 急性骨髄性白血病に対するVenetoclax/Azacitidine併用療法の有効性とその予測因子の検討。
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石川裕一
2. 発表標題 急性骨髄性白血病におけるMRDの意義
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金 貞姫、石川裕一、中島麻梨絵、川島直実、成瀬世新、牛島洋子、松下 正、清井 仁.
2. 発表標題 FLT3変異陽性AML-PDXモデルにおけるFLT3阻害剤感受性の検討
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川島直実、石川裕一、金 貞姫、木原里香、西山誉大、後藤辰徳、森下喬允、中島麻梨絵、牛島洋子、池野世新、綿本浩一、北村邦朗、小澤幸泰、清井仁
2. 発表標題 PDXモデルを用いた再発難治性AMLにおける細胞接着因子の発現解析
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中島麻梨絵、石川裕一、大平悠太、鶴飼由範、金 貞姫、川島直実、牛島洋子、松浦 正、清井 仁
2. 発表標題 新規抗トランスフェリン抗体TSP-A74のAML治療における有効性
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金 貞姫、石川裕一、川島直実、 中島麻梨絵、原田靖彦、牛島洋子、清井 仁.
2. 発表標題 FLT3変異陽性AML細胞における野生型FLT3の発現とFLT3阻害剤の阻害活性
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田靖彦、石川裕一、川島直実、 金 貞姫、中島麻梨絵、足立佳也、牛島洋子、清井 仁.
2. 発表標題 AMLにおけるFLT3阻害剤の効果予測バイオマーカーと至適治療法の開発
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------