

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08833

研究課題名(和文) TP53変異が急性リンパ性白血病の抗がん剤耐性に与える影響の解析

研究課題名(英文) Involvement of TP53 mutations in chemoresistance of B-precursor acute lymphoblastic leukemia

研究代表者

赤羽 弘資 (Akahane, Koshi)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：90377531

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)：本研究の目的は、TP53変異がB前駆細胞型急性リンパ性白血病(BCP-ALL)の抗がん剤感受性に与える影響を解析し、予後不良なTP53変異陽性BCP-ALLに対する新たな治療戦略を開発することである。私達は、CRISPR/Cas9によるゲノム編集技術を用いてTP53野生型のBCP-ALL細胞株からTP53ノックアウトクローンを樹立した。樹立したクローンの抗がん剤感受性を検討したところ、複数の抗がん剤(ダウノルビシン、ビンクリスチン、シタラビン)に対して親株よりも耐性を示した。本研究の結果から、TP53変異は多剤に対する耐性の結果として、BCP-ALLの予後不良に関連している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過去の臨床研究は、TP53変異がBCP-ALLの予後不良に関連している可能性を示唆している。しかし、これまでにTP53変異がBCP-ALL細胞の薬剤感受性に与える影響を検討した報告はなかった。また、実際のBCP-ALLの臨床では多剤併用の化学療法によって治療が行われるため、白血病細胞の個々の抗がん剤に対する感受性を臨床データから評価することは困難であった。本研究では、BCP-ALL細胞株においてTP53変異(ノックアウト)の導入が複数の抗がん剤に対する耐性を誘導することを明らかにしており、樹立したクローンはTP53変異陽性BCP-ALLの予後不良を克服する治療の開発にも貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：あThe purpose of this study is to analyze the impact of TP53 mutations on drug sensitivity of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) and to develop novel therapeutic strategies for poor prognostic BCP-ALL with TP53 mutation. We established TP53-knockout clones from BCP-ALL cell lines with wild-type TP53 using CRISPR/Cas9 genome editing technology. We investigated drug sensitivity of the established TP53-knockout clones and found that these TP53-knockout clones were more resistant to several anticancer drugs (daunorubicin, vincristine, and cytarabine) than the parental cells. Our results suggest that TP53 mutations may be associated with poor prognosis in BCP-ALL as a result of resistance to several anticancer drugs.

研究分野：小児血液腫瘍学

キーワード：急性リンパ性白血病 TP53変異 抗がん剤耐性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の多剤併用化学療法の進歩によって急性リンパ性白血病 (acute lymphoblastic leukemia: ALL) の治療成績は著しく向上したが、初期治療に不応な症例や再発症例の予後は依然として不良である。その中でも低二倍体 (染色体本数 44 本以下) 陽性の B 前駆細胞型急性リンパ性白血病 (B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: BCP-ALL) はきわめて予後不良であり、近年の治療プロトコールでも無病生存率は 20 ~ 38% と報告されている。米国 St. Jude 小児病院のグループは低二倍体を有する小児 BCP-ALL 症例の網羅的な遺伝子解析を実施したところ、染色体本数が 32 ~ 39 本の low-hypodiploid 症例の約 90% において *TP53* 遺伝子の変異が検出され、このうち約半数では *TP53* 変異の由来が生殖細胞系列であったことを報告した¹⁾。また、*TP53* 変異は BCP-ALL の再発症例において独立した予後不良因子であることも報告された²⁾。*TP53* 遺伝子でコードされる p53 は DNA 損傷などの細胞ストレスに応答して活性化される転写因子であり、アポトーシスや細胞周期停止等に関わる遺伝子群の発現を誘導する。過去の報告は *TP53* 変異が BCP-ALL の予後不良に寄与している可能性を示唆しているが、これまでに *TP53* 変異が BCP-ALL 細胞の薬剤感受性に与える影響を検討した研究は報告されていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、変異による p53 の機能喪失が BCP-ALL の抗がん剤感受性に与える影響を検討することである。さらに、*TP53* 変異で誘導される抗がん剤耐性のメカニズムを解明して、*TP53* 変異陽性 BCP-ALL の予後不良を克服する新たな治療戦略の開発を目指す。

3. 研究の方法

CRISPR/Cas9 システムを用いた *TP53* ノックアウトクローンの樹立

本研究では、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いて、*TP53* 野生型の BCP-ALL 細胞株から *TP53* ノックアウトクローンの樹立を試みた (図 1)。*TP53* 遺伝子ではその DNA 結合ドメイン内に R248 などの機能喪失型変異のホットスポットが複数存在しており、これらの変異は low-hypodiploid の BCP-ALL 症例でも検出されている¹⁾。そこで、*TP53* 変異の 3 つのホットスポットの近傍を特異的に認識して切断する guide RNA (gRNA) を作製し (R248 を標的とした KO#1、E221 を標的とした KO#2、F109 を標的とした KO#3)、Cas9 蛋白と共に electroporation 法で *TP53* 野生型の BCP-ALL 細胞株 (697 細胞と Nalm6 細胞) に導入した。gRNA の設計にはオンラインツールである CRISPR DESIGN³⁾ を使用し、各ホットスポットの近傍で off-target スコアの高い PAM 配列を標的として gRNA を設計した。このような CRISPR/Cas9 システムが作用した細胞では、非相同末端結合 (non-homologous end-joining: NHEJ) に伴う標的部位でのランダムな塩基の挿入・欠失 (insertion/deletion: indel) によって、*TP53* 遺伝子がノックアウトされると想定された。こうした CRISPR/Cas9 による変異の誘導で p53 の機能が失活した細胞を選別するために、MDM2 阻害剤である Nutlin-3a⁴⁾ を使用した。MDM2 阻害剤は MDM2 の機能を阻害することで p53 のユビキチン化を抑制し、p53 蛋白の発現を高めることで細胞死を誘導する。そのため、p53 機能が失活している細胞は MDM2 阻害剤に耐性を示す。本研究の予備実験では、697 細胞と Nalm6 細胞における Nutlin-3a の IC₅₀ (50% inhibitory concentration) 値は、それぞれ 0.96 μM と 2.21 μM であり、低値であった。そこで、各々の細胞に前述の CRISPR/Cas9 を導入してから 7 日後に 20 μM の Nutlin-3a を添加して、Nutlin-3a 耐性クローンを選択的に増殖させた。得られた Nutlin-3a 耐性クローンにおいて *TP53* 遺伝子のゲノム配列を TA クローニング法で確認し、*TP53* 遺伝子のノックアウトが実際に達成させているかを確認した。

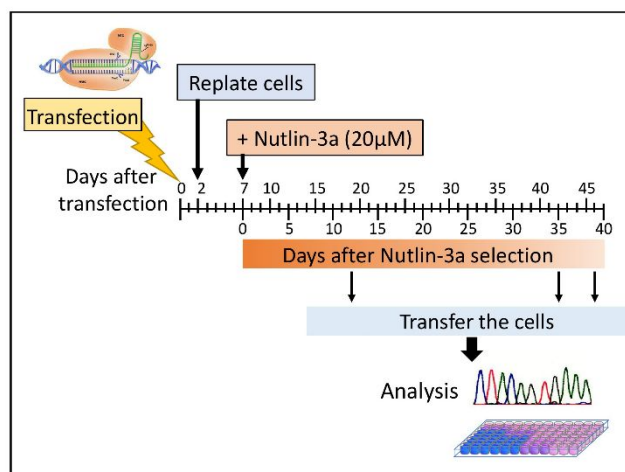


図 1 *TP53* 遺伝子ノックアウトクローンの樹立

TP53 変異が BCP-ALL 細胞株の抗がん剤感受性に与える影響の解析

で樹立した *TP53* ノックアウトクローンの各種抗がん剤 (ダウノルピシン、ピンクリスチン、シタラピン) に対する感受性を alamarBlue cell viability assay で検討した。得られた結果を親株と比較することで、*TP53* 変異が個々の抗がん剤感受性に与える影響を解析した。

TP53 変異陽性 BCP-ALL に対する治療戦略の開発

TP53 変異を高率に有する low-hypodiploid の BCP-ALL 細胞では Ras-MAPK 経路や PI3K-AKT 経路が恒常的に活性化されており、これらの白血病は PI3K 阻害剤に感受性を示すことが報告されている¹⁾。また、低二倍体を有する BCP-ALL の前臨床試験において BCL-2 選択的阻害剤が有効であることも報告されている⁵⁾。そこで、樹立した *TP53* ノックアウトクローンの PI3K 阻害剤 (GDC-0941) および BCL-2 阻害剤 (ABT-199) に対する感受性を検討し、得られた結果を親株と比較した。また、これらの阻害剤の抗がん剤 (ダウノルビシン) との併用効果を alamarBlue cell viability assay で検討した。

4. 研究成果

(1) *TP53* ノックアウトクローンの樹立

TP53 野生型の BCP-ALL 細胞株である 697 細胞と Nalm6 細胞を対象に、前述の方法を用いて CRISPR/Cas9 による *TP53* 遺伝子のノックアウトを行った。CRISPR/Cas9 の導入から 7 日後に 20 μ M の Nutlin-3a を添加して培養したところ、697 細胞 (Nutlin-3a の IC₅₀ 値: 0.96 μ M) の親株は数日で完全に死滅したのに対して、KO#1 および KO#2 を導入した細胞では添加 5 日後から、KO#3 を導入した細胞では添加 23 日後から Nutlin-3a に耐性の細胞が増殖してきた。一方、Nalm6 細胞 (Nutlin-3a の IC₅₀ 値: 2.21 μ M) でも親株は 20 μ M の Nutlin-3a 存在下で完全に死滅し、KO#1 を導入した細胞で添加 35 日後から Nutlin-3a に耐性の細胞が増殖してきたが、KO#2 および KO#3 を導入した細胞においては Nutlin-3a 耐性細胞を得られなかった。得られた Nutlin-3a 耐性細胞のうち、導入した各々の gRNA において独立して培養した 2 ウェルの細胞を対象として、TA クローニング法で *TP53* 遺伝子の gRNA 標的部局周辺のゲノム配列を確認した。その結果、解析した全てのクローンにおいて、gRNA の標的部局である PAM 配列の 3 塩基上流に indel によるフレームシフトが誘導されていた (図 2)。このことから、樹立したクローンにおいては、p53 機能が失活した結果として Nutlin-3a 耐性を獲得したことが確認された。

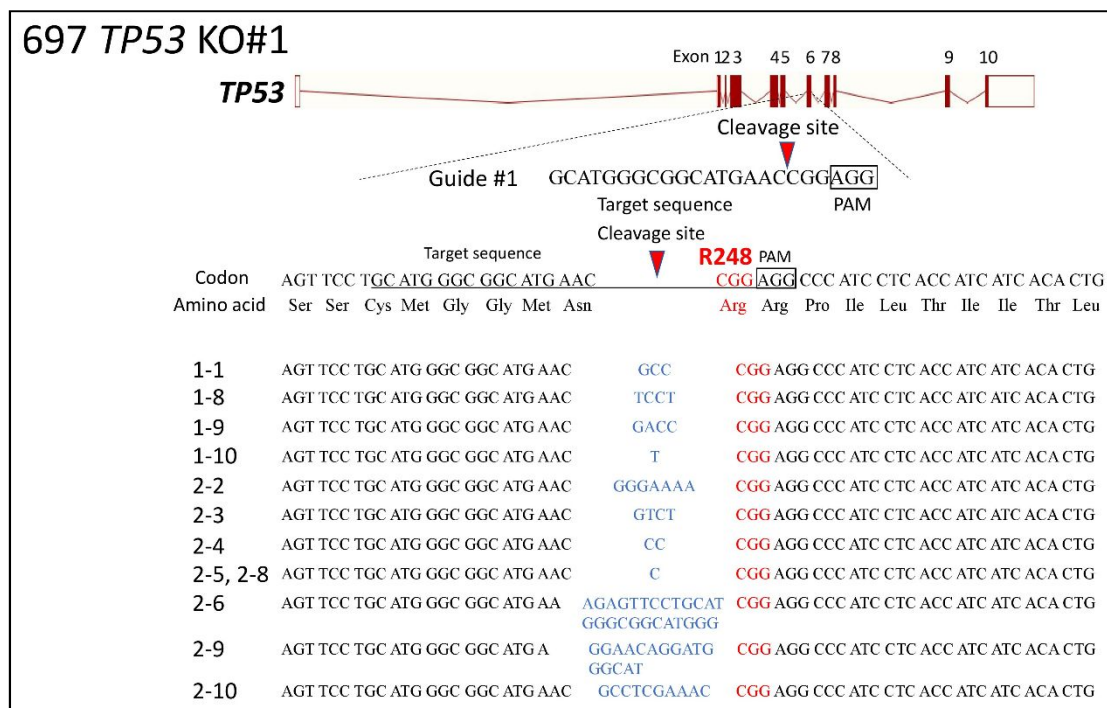


図 2 Nutlin-3a 耐性細胞における塩基配列 (*TP53* KO#1 を導入した 697 細胞) 上から *TP53* 遺伝子の模式図、gRNA の標的配列 (赤い三角は CRISPR による切断部位を示す)、野生型遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列、Nutlin-3a 耐性細胞 (1-1 ~ 2-10) で確認された塩基配列を示す。

(2) *TP53* ノックアウトクローンの抗がん剤感受性

得られた *TP53* ノックアウトクローンの抗がん剤感受性を alamarBlue cell viability assay で検討し、その結果を親株と比較した (図 3)。その結果、いずれのノックアウトクローンもダウノルビシン、ピンクリスチンおよびシタラピンの感受性において親株よりも耐性を示した。697 細胞の親株におけるダウノルビシン、ピンクリスチンおよびシタラピンの IC₅₀ 値はそれぞれ 9.5 ng/ml、6.3 ng/ml および 5.6 ng/ml であったのに対して、*TP53* ノックアウトクローンにおける IC₅₀ 値はそれぞれ 31 ~ 35 ng/ml、10 ~ 34 ng/ml および 8.5 ~ 21 ng/ml であった。また、Nalm6 細胞の親株におけるダウノルビシン、ピンクリスチンおよびシタラピンの IC₅₀ 値はそれぞれ 23 ng/ml、14 ng/ml および 5.1 ng/ml であったのに対して、*TP53* ノックアウトクローンにおける IC₅₀ 値はそれぞれ 55 ng/ml、57 ng/ml および 11 ng/ml であった。これらの結果から、*TP53* 変異は多剤に対する耐性の結果として、BCP-ALL の予後不良に関連している可能性が示唆された。

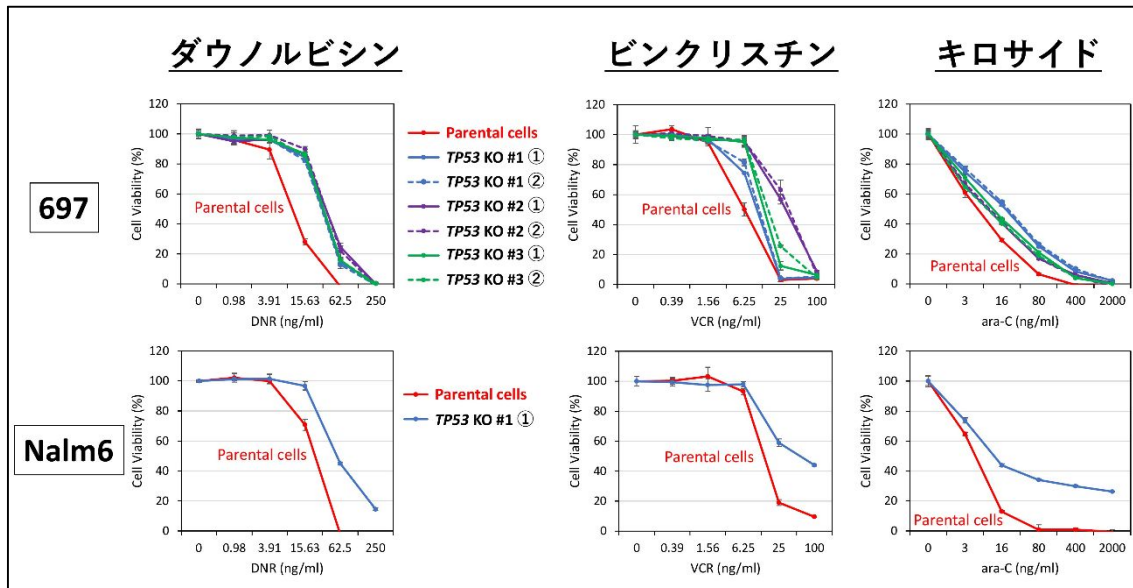


図3 697細胞およびNalm6細胞における親株 (Parental cells) と *TP53* ノックアウトクローンの抗がん剤感受性 (alamarBlue cell viability assay)

(3) *TP53* ノックアウトクローンのPI3K阻害剤およびBCL-2阻害剤に対する感受性

TP53 ノックアウトクローンのPI3K阻害剤 (GDC-0941) およびBCL-2阻害剤 (ABT-199) に対する感受性を alamarBlue cell viability assay で検討し、その結果を親株と比較した。GDC-0941 に対しては697細胞とNalm6細胞の *TP53* ノックアウトクローンで親株と同程度の感受性が認められ、ABT-199 に対してはNalm6細胞の *TP53* ノックアウトクローンで親株と同程度の感受性が、697細胞の *TP53* ノックアウトクローンではむしろ耐性傾向を示すことが確認された。次に、*TP53* ノックアウトクローンにおいて、GDC-0941 および ABT-199 の抗がん剤 (ダウノルビシン) との併用効果を alamarBlue cell viability assay で検討したところ、増殖抑制について明らかな併用効果は認められなかった。

引用文献

- 1) Holmfeldt L, et al. Nat Genet. 2013; 45(3): 242-52.
- 2) Hof J, et al. J Clin Oncol. 2011; 29(23): 3185-93.
- 3) Ran FA, et al. Nat Protoc. 2013; 8(11): 2281-308.
- 4) Vassilev LT, et al. Science. 2004; 303(5659): 844-8.
- 5) Diaz-Flores E, et al. Cancer Res. 2019; 79(9): 2339-51.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Koshi Akahane, Atsushi Watanabe, Nguyen Thi Thu Thao, Keiko Kagami, Masako Abe, Shin Kasai, Daisuke Harama, Kumiko Goi, Takeshi Inukai
2. 発表標題 Disruption of TP53 by CRISPR/Cas9 system induces multiagent resistance in BCP-ALL cell lines
3. 学会等名 第82回日本血液学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 赤羽弘資
2. 発表標題 ゲノム編集技術を用いた再発難治ALLモデル
3. 学会等名 第63回日本小児血液・がん学会
4. 発表年 2021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
---------	---------