

機関番号：32203

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591140

研究課題名 (和文) 白血病に対するデコイペプチドを用いた新規分子標的療法の開発に関する研究

研究課題名 (英文) Basic research on new therapy for leukemia by a decoy peptide.

研究代表者

牧 和宏 (MAKI KAZUHIRO)

獨協医科大学・医学部・講師

研究者番号：50337391

研究成果の概要 (和文) : RUNX1/EVI1 は、進行期の骨髄異形成症候群や慢性骨髄性白血病の急性転化期に出現するキメラ遺伝子である。RUNX1/EVI1 はマウス骨髄細胞の造血コロニー形成能を亢進する機能を有するが、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が、その表現型を特異的に抑制することがわかった。

研究成果の概要 (英文) : RUNX1/EVI1 is a chimeric gene that is observed in advanced-stage MDS and blastic crisis of chronic myelogenous leukemia. RUNX1/EVI1 enhances colony-forming and self-renewal abilities of mouse bone marrow progenitors. We have shown that Histone deacetylase inhibitors exhibit specific repression on these phenotypes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：造血器腫瘍

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：白血病、RUNX1/EVI1、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤

1. 研究開始当初の背景

t(3;21)は慢性骨髄性白血病の急性転化時や進行期の骨髄異形成症候群に見られる染色体転座で、この染色体転座の結果、RUNX1/EVI1 キメラ遺伝子が形成される。これまでの培養細胞を用いた報告からRUNX1/EVI1 キメラ蛋白は種々の造腫瘍活性を有することが示唆されていたが、RUNX1/EVI1 の個体レベルでの機能は不明であった。我々は RUNX1/EVI1 ノックイン

マウスを作製し、RUNX1/EVI1 ノックインヘテロマウスは胎生致死であること、胎児肝には高い自己複製能を持つ造血前駆細胞が存在するが、この造血前駆細胞は骨髄球系、赤芽球系、巨核球系のいずれにも分化障害を呈することを報告した (Maki et al., Blood, 2005)。さらに、我々は、RUNX1/EVI1 ノックインキメラマウスが白血病を発症することを最近報告している (Maki et al., Leukemia, 2006)。これらの報告は、

RUNX1/EVI1 陽性白血病の発症には RUNX1/EVI1 が重要な役割を果たしていることを示すものである。逆に言えば、RUNX1/EVI1 の機能を抑制することができれば、RUNX1/EVI1 陽性白血病の治療が可能になると考えられる。RUNX1/EVI1 の有する重要な機能に、RUNX1 に対するドミナントネガティブ効果、Smad を介する TGF β シグナルの抑制、および C/EBP α の転写活性化能の抑制があるが、我々は分子生物学的手法を用いた機能解析によりいずれの作用も、転写のコリプレッサー CtBP を介して発揮されることを報告した (Izutsu et al., Blood, 2001; Izutsu et al, Oncogene, 2002; Tokita et al., Can Sci, 2007)。CtBP によりヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) がリクルートされ、ヒストンの脱アセチル化により標的遺伝子の転写が抑制されることが白血病発症へとつながると考えられる。さらに、RUNX1/EVI1 の CtBP 結合部位 (5 アミノ酸 : PLDLS) を PLASS に置換した RUNX1/EVI1 変異体 (mCtBP) は、CtBP と結合することができず、RUNX1 に対する抑制効果、TGF β シグナル抑制能および C/EBP α の転写抑制能のいずれも持たないことは、RUNX1/EVI1 の機能 (白血病原性) におけるこの CtBP 結合部位の重要性を示していると考えられる。上記の機序より、RUNX1/EVI1 の機能抑制には HDAC 阻害剤 (HDACi) が有効であると予想される。

2. 研究の目的

RUNX1/EVI1 陽性白血病に対するヒストンアセチル化酵素阻害剤による治療の有用性を、マウス骨髄細胞を用いた系において検討すること。

3. 研究の方法

(1) マウス造血前駆細胞を用いた造血コロニーアッセイおよび骨髄球系分化実験を用いて、RUNX1/EVI1 の造腫瘍活性に対するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDACi) の効果を検討する。また、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤と同じエピジェネティック治療薬に属する DNA メチル化阻害剤の効果についても同様に検討する。

(2) RUNX1/EVI1 発現マウス骨髄細胞におけるヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の有用性を示したのち、その分子機構を解明するため

にヒストン脱アセチル化酵素阻害剤添加前後で発現に変化が見られる遺伝子について、アポトーシス関連遺伝子および細胞周期関連遺伝子の PCR アレイを用いて検討する。

4. 研究成果

(1) 造血コロニーアッセイにおいて、RUNX1/EVI1 導入マウス骨髄細胞は、Mock 細胞と比しより大きなコロニーを形成した。コロニーの継代培養にて、Mock 細胞は早期にコロニー形成能を失うのに対し、RUNX1/EVI1 発現細胞は長期に渡ってコロニー形成能を維持していた (表 1)。

表 1

genotype	in vitro passage		
	1	2	3
Mock	95	0	0
RUNX1/EVI1	14	456	614

(colonies/10⁴cells)

また IL-3, IL-6, SCF 添加の液体培養を行い、day7 における細胞形態を比較した。その結果、Mock 細胞は環状核を有する成熟好中球に終末分化を示すのに対し、RUNX1/EVI1 発現細胞では成熟傾向の乏しい比較的幼弱な細胞が多く認められた。(2) ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤として Trichostatin A (TSA) およびバルプロン酸 (VPA) を用いて、上記の RUNX1/EVI1 導入マウス骨髄細胞の表現型に対するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の影響を検討した。培養液への TSA および VPA いずれの添加においても、Mock 細胞ではコロニー形成にはほとんど影響が認められなかったが、RUNX1/EVI1 発現細胞ではコロニー形成の著しい障害が認められた。また、液体培養においてもヒストン脱アセチル化酵素阻害剤処理により RUNX1/EVI1 発現細胞の骨髄球系分化の回復が認められた。またメチル化阻害剤としてアザシチジンおよびデシタピンを用いて、同様に RUNX1/EVI1 導入マウス骨髄細胞の表現型に対するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の影響を検討した。メチル化阻害剤については、アザシチジンおよびデシタピンとも RUNX1/EVI1 発現細胞に特異的な効果を認めなかった (表 2)。

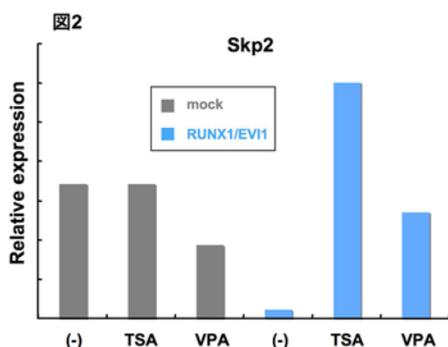
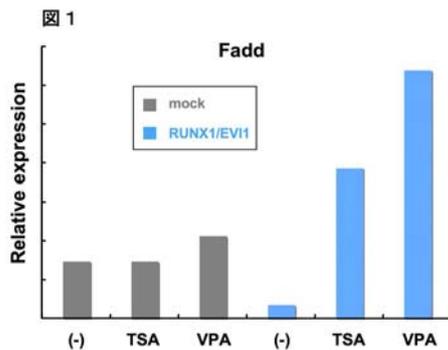
表2

	HDACi (-)	TSA	VPA	SAHA(mM)		5-AZA(μM)		decitabine(μM)	
		5ng/ml	1mM	2.0	3.0	1.0	1.5	0.02	0.05
Mock	113	96	83	51	0	29	54	92	28
RUNX1/EVI1	159	0	0	101	2	65	83	81	48

colonies/10⁴ cells

以上により、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は RUNX1/EVI1 の造腫瘍活性を in vivo で抑制することが示された。また、DNA メチル化は RUNX1/EVI1 の造腫瘍活性には関与していない可能性が示唆された。

(2) (1)に記したとおり、RUNX1/EVI1 発現マウス骨髄細胞において、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が特異的な阻害作用を発揮することが示された。次に、RUNX1/EVI1 の標的遺伝子を解明するために、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(-)、Trichostatin A 添加、バルブロン酸添加の各々について、Mock 細胞、RUNX1/EVI1 発現マウス骨髄細胞のPCRアレイを施行した。RUNX1/EVI1 は、標的遺伝子の発現を抑制すると考えられるため、Mock 細胞と比較し、RUNX1/EVI1 発現細胞で発現が抑制されている遺伝子のうち、Trichostatin A およびバルブロン酸の両者のヒストン脱アセチル化酵素阻害剤処理で RUNX1/EVI1 発現細胞でのみその発現が回復し、Mock 細胞では発現に変化が見られない遺伝子を抽出した。



その結果、Fadd 遺伝子 (図 1) と Skp2 遺伝子 (図 2) が抽出された。以上により、RUNX1/EVI1 の造腫瘍活性は、標的遺伝子候補である Fadd 遺伝子や Skp2 遺伝子の発現抑制により引き起こされる可能性が考えられる。また、今後、クロマチン免疫沈降法等により上記遺伝子が、実際に RUNX1/EVI1 の標的であることを確認する必要がある。

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 2 件)

- ①牧和宏、山形哲也、佐々木光、三谷絹子：ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬を用いた RUNX1/EVI1 の造腫瘍活性の抑制：第 7 回日本血液学会総会：2008.10.12 京都
- ②牧和宏、三谷絹子：Molecular pathogenesis of MDS and its clinical implications：第 7 2 回日本血液学会総会：2010.9.26 横浜

[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 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

6. 研究組織

(1)研究代表者：牧 和宏(MAKI KAZUHIRO)

獨協医科大学・医学部・講師

研究者番号：50337391

(2)研究分担者：三谷 絹子(MITANI KINUKO)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：50251244

研究分担者：佐々木 光(SASAKI KO)

獨協医科大学・医学部・講師

研究者番号：60282638

(3)連携研究者

該当なし