

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790677
 研究課題名(和文) 多発性骨髄腫における予後不良因子としての PU.1 発現低下を基にした患者層別化
 研究課題名(英文) Stratification of multiple myeloma according to PU.1 expression level
 研究代表者
 立津 央 (TATETSU HIRO)
 熊本大学・医学部附属病院・医員
 研究者番号：00433029

研究成果の概要 (和文)：

多発性骨髄腫は、難治性の血液疾患であり、治癒に向けては、患者層別化や新たな分子標的の同定が必要と考えられる。我々は、これまで、NF- κ B や PU.1 などの転写因子が、分子標的、患者層別化に寄与する可能性を示してきた。今回、PU.1 に MUM1 (Multiple Myeloma Oncogene 1 or IRF4) を加えることにより、さらに患者層別化を行うことを目的とした。CD138 ビーズで純化した骨髄腫細胞において、PU.1 low IRF4 low、PU.1 low IRF4 high、PU.1 high IRF4 high、PU.1 high IRF4 high の 4 群に分けて、予後の解析を行った。予後は、PU.1 low IRF4 high の群が予後不良な傾向にあった。今後は、PU.1、IRF4 の発現による予後の有意差を確認するために、さらに症例を蓄積し、解析する予定としている。

研究成果の概要 (英文)：

Multiple myeloma is an incurable hematological malignancy that is resistant to several chemotherapeutic agents so that we need to define new biologic parameters and molecular targets. We previously reported that PU.1 and NF- κ B are the molecular targets of multiple myeloma patients. Here, we investigated the correlation between survival of 39 myeloma patients and their expression levels of PU.1 and MUM1 (Multiple Myeloma Oncogene 1 or IRF4). Based on PU.1 and IRF4 expression level, we provisionally divided the myeloma patients into four groups (i.e. PU.1 low IRF4 low, PU.1 low IRF4 high, PU.1 high IRF4 high, PU.1 high IRF4 high). Patients in low PU.1 and high IRF4 expression subset may have a poor prognosis compared with other groups. Exogenous expression of IRF4 could not cancel the growth arrest of KMS12PE expressing PU.1. Additional follow-up studies will be required to define that the expression levels of PU.1 and IRF4 expressions are useful prognostic factors for multiple myeloma patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

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：血液腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

1990年代以降、癌の分子生物学的解明が急速に進み、分子慢性骨髄性白血病に対しては、ST571 (グリベック)、悪性リンパ腫に対しては、抗 CD20 抗体 (リツキサン) といった分子標的とした画期的な治療薬が開発され、目覚ましい効果が得られている。一方、多発性骨髄腫においても、徐々にプロテアソーム阻害剤 (ベルケイド) などの分子標的治療薬が報告されてきているが、未だに治癒には至らない。また、メルファラン、サリドマイド、ベルケイドなどに効果を認める症例や認めない症例が存在するが、効果、予後に関して未だ治療法を決定するような層別化はなされていない。そのため、骨髄腫患者総数は、年々増加傾向にあり、患者の層別化、新たな分子標的治療薬の開発、また、新たな分子標的の発見が急務であると考えられる。

我々は、NF- κ B、PU.1 などの転写因子発現調節が患者の層別化、治療に結びつく可能性を示してきた (Tatetsu H. Mol Cancer Ther. 2005;4(7):1114-20, Tatetsu H et al. Cancer Res. 2007;67:5328-5336)。PU.1 は、lymphoid の分化に必須の転写因子であり、多発性骨髄腫でその発現が低下していることが報告されている。我々は、Real time PCR を用いて骨髄腫細胞株において PU.1 の発現低下を確認した。その発現低下のメカニズムとして PU.1 遺伝子のプロモーター及び 17kb 上流にあるエンハンサー領域のメチル化が主に関わっていることを報告した。PU.1 非発現骨髄腫細胞株 U266 と KMS12PE に tet-off の系を用いて PU.1 を conditional に発現させると細胞増殖停止及び細胞死が誘導された。このことは、骨髄腫細胞において、PU.1 の発現低下がその発症ないしは細胞増殖維持に関与していることを示しており、PU.1 が形質細胞においては癌抑制遺伝子としての側面を持っている可能性が示唆された。さらに、多発性骨髄腫患者 30 例の純化骨髄腫細胞において PU.1 の発現量を Real time PCR で検討したところ、様々な発現レベルで低下を認めたが、一部に PU.1 の発現が非常に低い群が存在することを明らかにした。発現の低い方から 25% をカ

ットオフ値とし、2 群に分け、患者年齢、性別、Durie and Salmon 臨床病期、monoclonal isotype で検討を行ったが有意差は認めなかった。そこで、予後を Kaplan-Meier 法を用いて解析したところ PU.1 の低い群は、有意差をもって予後が不良であった。

一方、MUM1 は、多発性骨髄腫の染色体転座で単離された遺伝子であり (Iida S et al. Nat Genet 1997;17:226-230)、PU.1 と協調的に働くが、骨髄腫におけるその詳細な意義は未だ不明である。MUM1 は、発現上昇が単独で予後不良因子との報告もあるが (Heintel D et al. Leukemia. 2007; Aug 9)、PU.1 と MUM1 の発現量を同時に解析した報告はない。PU.1、MUM1 の発現量の解析を進めることは、患者の層別化につながり、また、治療法の決定につながると考えられた。

2. 研究の目的

(1) PU.1 発現と予後との関係を多数例の骨髄腫患者において行い統計学的に解析する。

(2) 骨髄腫における PU.1 と MUM1 (Multiple Myeloma Oncogene 1 or IRF4) の発現が予後に及ぼす影響及び、その機能について目的 1 と合わせて検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 多発性骨髄腫患者から骨髄細胞を採取し、スミア標本作製、フローサイトメトリーによる解析、一部、CD138 抗体と磁気ビーズを用いて患者骨髄腫細胞を分離し RNA 及び genomic DNA を分離する。cDNA を作製し、Real Time PCR を用いて、PU.1、MUM1 の発現を定量的に解析する。

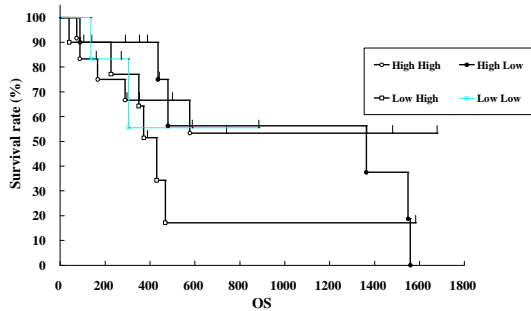
(2) 我々が作成したテトラサイクリンオフのシステムを利用して PU.1 を発現させた KMS12PE 細胞の核蛋白を使用し、ゲルシフトアッセイを行い、また、スーパーシフトを PU.1、IRF4 で確認する。

(3) U266 細胞及び U266^{tetPU.1} 細胞に対して MUM1 を導入して細胞の増殖への影響を検討する。

4. 研究成果

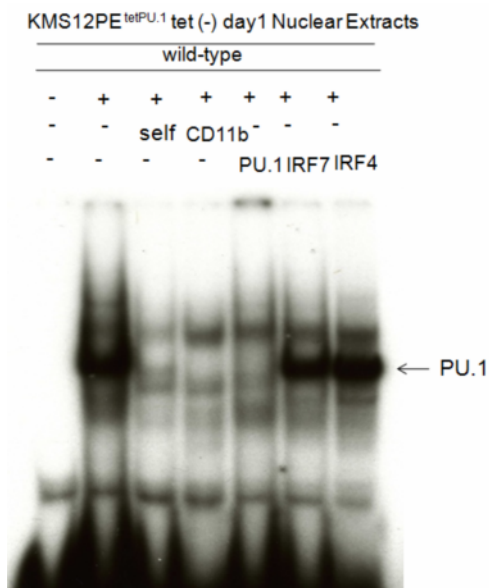
(1) 我々は、新たに計 39 例の純化した患者骨髄腫細胞を PU.1(+)/IRF4(+), PU.1(+)/IRF4(-), PU.1(-)/IRF4(+), PU.1(-)/IRF4(-) の 4 群に分けて、予後の解析を行った。予後は、それぞれの群で有意差はないものの、PU.1 low IRF4 high の群が予後不良な傾向にあった (図 1)。

図 1



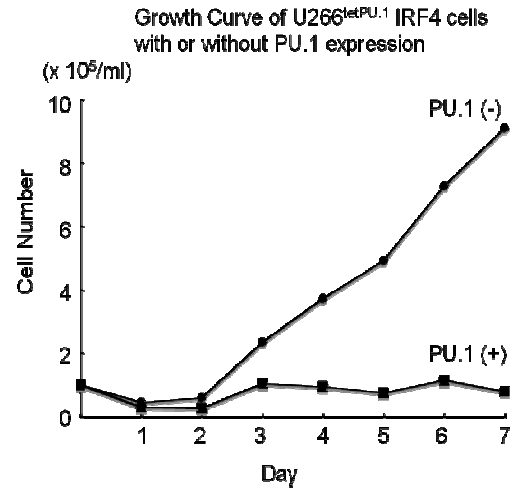
(2) 我々が作成したテトラサイクリンオフのシステムを利用して PU.1 を発現させた KMS12PE 細胞の核蛋白を使用し、ゲルシフトアッセイを行った。核蛋白のみを使用した 2 番目のレーンでこのようにバンドが 2 本みられ、自分自身の cold 及び PU.1 の binding site をもつ CD11b の promoter 部分を competitor として使用したところ、2 つのバンドのうち下のバンドが消失した。さらに、このバンドは抗 PU.1 抗体でのみ消失し、抗 IRF4 抗体をしたレーンでは消失しなかった。以上から PU.1 と IRF4 は協調して作用していることは、我々の実験系では、確認できなかった (図 2)。

(図 2)



(3) また、我々が作成したテトラサイクリンオフのシステムを利用して PU.1 を発現させた U266 細胞にさらに IRF4 を発現させたところ、IRF4 は細胞増殖に影響をもたらさなかったことから、我々の実験系では、IRF4 の細胞増殖作用は、PU.1 の増殖抑制作用に勝ることはないことが確認された (図 3)。

(図 3)



以上から、PU.1 発現低下は骨髄腫患者において予後不良因子であることが、再確認され、一方で、IRF4 単独では明らかな予後不良因子とはならないことが示唆された骨髄腫細胞株において、明らかな PU.1 と IRF4 の協調作用は認めなかった。患者骨髄腫細胞において、PU.1 low IRF4 high の群が予後不良な傾向にあったが、有意差は認めず、さらに症例を蓄積中が必要と考えられた。

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 1 件)

Ueno S, Tatetsu H, Hata H, Iino T, Niino H, Akashi K, Tenen DG, Mitsuya H, Okuno Y. PU.1 induces apoptosis in myeloma cells through direct transactivation of TRAIL. *Oncogene*. 2009 Nov 19;28(46):4116-25. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

上野 志貴子ら、PU.1 発現による骨髄腫細胞株のアポトーシスには TRAIL が、増殖抑制には p21 が関与する、日本血液学会、2009 年 10 月 23 日、京都、京都国際会議場

Shikiko Ueno et al. Conditionally Expressed PU.1 Transactivates TRAIL Gene and Induces Apoptosis in Myeloma Cell Lines, 50th American society of hematology

annual meeting, 2008, December 6, San Francisco

6 . 研究組織

(1)研究代表者

立津 央 (TATETSU HIRO)

熊本大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00433029

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4)研究協力者

奥野 豊 (OKUNO YUTAKA)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80363539

畑 裕之 (HATA HIROYUKI)

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70271129

上野 志貴子 (UENO SHIKIKO)

熊本大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40571047