

|           |   |
|-----------|---|
| 研究種目：     | 若手研究(B)   |
| 研究期間：     | 2008 ～ 2010   |
| 課題番号：     | 20790753  |
| 研究課題名（和文） | 難治性急性前骨髄性白血病における新規レチノイド化合物の分化誘導機構の解明  |
| 研究課題名（英文） | Differentiation of refractory acute promyelocytic leukemia cells by retinoids |
| 研究代表者     |   |
|           | 井上 彰子 (Inoue Akiko)   |
|           | 大阪医科大学・医学部・助教   |
|           | 研究者番号： 90330076   |

## 研究成果の概要（和文）：

急性前骨髄性白血病 (APL) に対する all-trans retinoic acid (ATRA) 療法は、分子標的療法である。ATRA と化学療法の併用により高い寛解率が得られるようになった。しかし、ATRA 投与により、薬物耐性の出現が問題となった。その原因として、薬物代謝の亢進、耐性遺伝子の出現があげられる。そのため新たな創薬および分化誘導機構の解明が最重要課題である。我々は、分化過程において抗菌ペプチドである defensin が誘導されることを見いだした。さらにこの現象を培養細胞においても確認した。

## 研究成果の概要（英文）：

All-trans retinoic acid (ATRA) is a metabolite of vitamin A that is used for molecular targeting therapy of acute promyelocytic leukemia (APL). Most patients with relapse after ATRA therapy show acquired resistance to ATRA, which seems to result from low plasma levels of the drug during therapy. This may be because of increased oxidative catabolism of ATRA or expression of the multi-drug resistance gene product. It is important to discover novel retinoids for refractory APL cells and investigate differentiation mechanisms of APL cells induced by retinoids. In the present study, we examined induced genes of APL cells by ATRA using DNA microarray systems. Increased expression of defensins, bactericidal peptides, were identified. Moreover, defensins genes expression in HL-60 cell line are induced by ATRA.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2008 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2009 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2010 年度 | 800,000   | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：小児血液学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：急性前骨髄性白血病、レチノイン酸、分化誘導

## 1. 研究開始当初の背景

急性前骨髄性白血病 (acute promyelocytic leukemia; APL) に対する all-trans retinoic acid (ATRA) 療法は、APL の染色体 15 ; 17 転座に伴う PML/RAR 融合遺伝子を標的とした分子標的療法である。APL の治療は ATRA による分化誘導療法であり、ATRA と化学療法の併用により高い寛解率 (88-95%) と長期生存が得られるようになった。その後の地固め療法および維持療法が行われるが、約 20% の再発が見られる。ATRA 投与により、薬物耐性の出現が、分化誘導療法の大きな壁となっている。その原因として

### 1) ATRA 長期投与による血中濃度の低下

(細胞内レチノイン酸結合タンパク質の増加、チトクローム P450 (CYP26A1) 遺伝子発現の増加によるレチノイン酸代謝の亢進などが原因)

### 2) 新たな薬物耐性遺伝子 (multi-drug resistance gene; MDR) の出現

### 3) 染色体転座により生じる PML/RAR 融合遺伝子の変異

などが考えられる (Leukemia, 2005)。

これらの問題を解決するために新規レチノイド化合物 Am80 が開発され、2005 年に再発・難治性の APL 治療薬として認可された (Blood, 1997)。ATRA 耐性の克服を目的として、日本で開発された合成レチノイドである。その他にも多数のレチノイド化合物が開発中である。しかし、その分化誘導メカニズムは不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

分化誘導療法のメカニズムとして、PML/RAR 融合遺伝子と相互作用する転写共役因子の存在が重要である。転写共役因子とは RAR (レチノイン酸受容体) などの受容体と相互作用し、転写レベルで標的遺伝子の発現を調節する蛋白質である。これには転写を促進する因子、抑制する因子などがある。APL では PML/RAR 融合蛋白質および抑制系の転写共役因子が、複合体を形成することで、正常な転写が抑制され、癌化することが考えられる (Nature, 1998)。

さらにはどのような遺伝子群がレチノイン酸投与により誘導されるかも重要な検討課題である。難治性 APL の場合、誘導される遺伝子群が異なることが考えられる。そこでまず、難治性 APL において、ATRA により誘導される遺伝子群を検討してみた。

## 3. 研究の方法

レチノイン酸による分化誘導のメカニズムについては不明な点が多い。近年 DNA マイクロアレイ法を利用して、ATRA により誘導される遺伝子群の網羅的解析が報告されている。しかし、APL 症例の ATRA 治療経過での検討はあまりない。今回我々は、ATRA を投与された APL 患児において、投与前後の末梢血単核球を用いて DNA マイクロアレイ法を行ない、誘導される遺伝子群の網羅的解析を試みた。さらに in vitro の解析を試みた。

1) 再発性 APL 患児に ATRA を投与し、投与前・投与 7 日目に採取した末梢単核球から RNA を単離し、実験に利用した。DNA マイクロアレイ法 (アライアンスバイオシステムズ、17000 遺伝子) を用いて、発現する遺伝子群を検討した。

2) 発現が誘導された遺伝子群の in vitro において、ATRA による誘導を再検討した。

## 4. 研究成果

(1) ATRA 投与で誘導される遺伝子は 132 遺伝子、抑制される遺伝子は 48 遺伝子であった。誘導される遺伝子群として、転写因子、代謝酵素、マトリックスたんぱく質、接着因子などが挙げられる。これらは in vitro の報告と同様の遺伝子が含まれていた。発現が誘導される主な遺伝子群 (一部) を下記に示す。また転写因子では、好中球分化に関係する CEBP (CCAAT/enhancer binding protein) の発現が上昇した。ATRA により好中球分化に関連する転写因子が誘導されることが示唆された。レチノイン酸により誘導される遺伝子群を検討することは、分化誘導機構の解明に貢献することが考えられる。

### a) Cell adhesion

R22412 CD31 (platelet/endothelial cell adhesion molecule)

AA479188 intercellular adhesion molecule 3

H00662 selectin L (lymphocyte adhesion molecule 1)

### b) Cell growth

AI815076 cationic amino acid transporter

H38650 facilitated glucose/fructose transporter

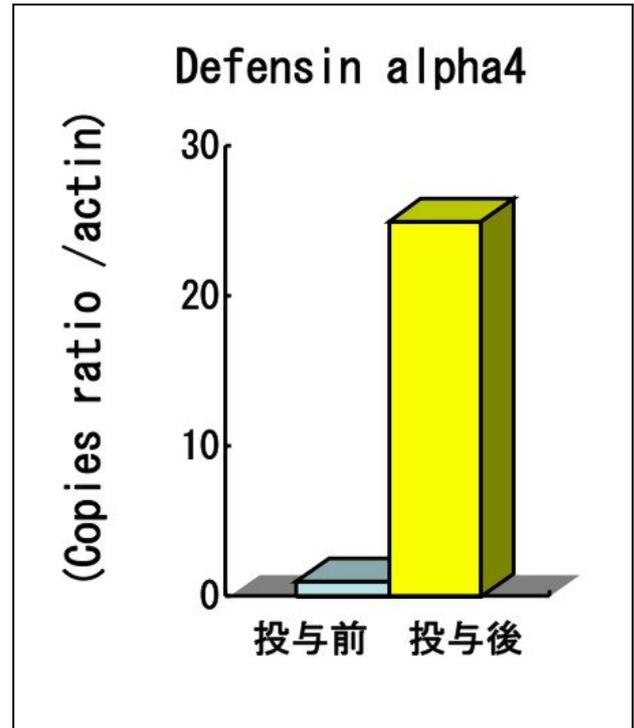
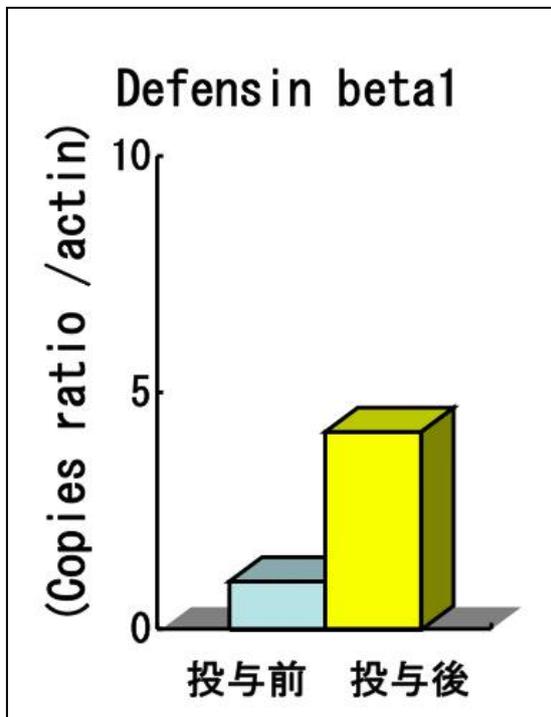
T52564 iron-regulated transporter

T61913 choline transporter-like protein 1

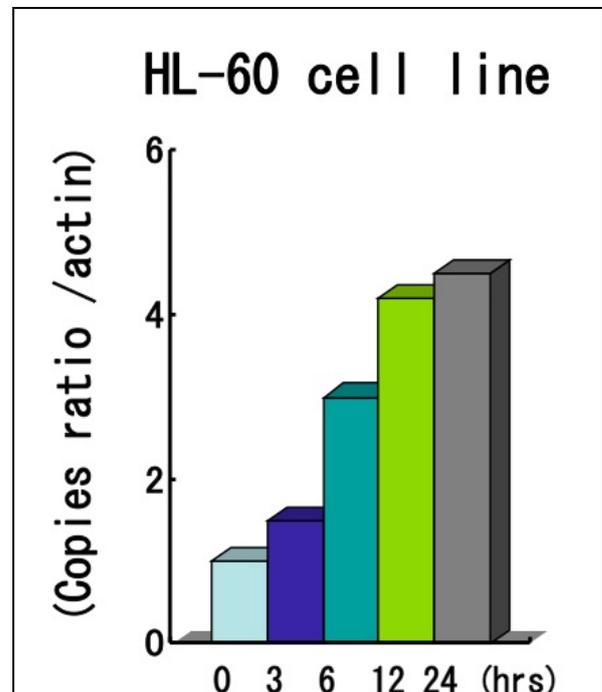
- c) Cell surface linked signal transduction
  - AA489245 mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3
  - AA279531 CD18
  - AI309439 CD11b (p170)
  - N64384 CD11C (p150)
  - R00276 CD38
- d) Intracellular signaling
  - AI250799 defensin, alpha 4
  - AI769855 defensin, beta 1
- e) Apoptosis regulator
  - T95052 caspase 1
  - AA150416 TNFR, member 1B
  - AA457114 TNF alpha-induced protein 2
- f) Nucleic acid binding
  - AI244667 LF-B3; variant hepatic nuclear factor
  - AA284174 transcription factor 4
  - AI522280 transcription factor E
- g) Enzymes
  - T46924 amiloride binding protein
  - AA464970 phospholipase C, beta 2
  - AA910884 phospholipase B
  - AA478553 dopachrome tautomerase

(2) Defensin 群の遺伝子発現

Defensin は、好中球分化過程の myelocyte に高発現する。微生物を直接殺菌する作用を有する。本遺伝子群を real-time RT PCR 法にて検討した。



(3) HL-60 培養細胞における Defensin alpha4 遺伝子発現の検討 (real-time RT PCR 法)



## 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 8 件)

- 1) Inoue A, Takitani K, Koh M, Kawakami C, Kuno K, Tamai H.  
Induction of apoptosis by  $\gamma$ -tocotrienol in human cancer cell lines and leukemic blasts from patients: dependency on Bid, cytochrome c and caspase pathway.  
Nutrition and Cancer 査読有 (印刷中)
- 2) Kawakami C, Inoue A, Takitani K, Ikemoto T, Yonetani N, Takubo T, Tamai H. Acute monocytic leukemia blasts with cuplike nuclear morphology: a case report. *Pediatr Hematol Oncol.* 査読有 28, 2011, 147-9.
- 3) Kawakami C, Inoue A, Takitani K, Kanegane H, Miyawaki T, Tamai H.  
X-linked agammaglobulinemia complicated with endobronchial tuberculosis. *Acta Paediatr.* 査読有 100, 2011, 466-8.
- 4) 井上彰子、河上千尋、青松友槻、宮崎敬士、瀧谷公隆、余田篤、玉井浩. GVHD を合併した C 型慢性肝炎に対するインターフェロン治療経験  
日本小児血液学会雑誌. 査読有 25, 2011, 26-30.
- 5) 井上彰子、瀧谷公隆.  
神経芽腫とレチノイド  
ビタミン 査読有 84, 2010, 493-495.
- 6) Kawakami C, Inoue A, Takitani K, Yuki M, Tamai H. Successful treatment of acute monocytic leukemia with intracranial hemorrhage as the first manifestation. *Pediatr Int.* 査読有 52, 2010, e218-20.
- 7) Kawakami C, Inoue A, Koh M, Takitani K, Kanegane H, Miyawaki T, Tamai H. Three brothers of X-linked agammaglobulinemia: the relation between phenotype and neutropenia. *Int J Hematol.* 査読有 90, 2009, 117-9.
- 8) Takitani K, Inoue A, Kawakami C, Miyazaki H, Aomatsu T, Yoden A, Suzuki K, Tamai H.  
Reduced plasma all-trans retinoic acid level in a patient with Crohn's disease

with acute promyelocytic leukemia.  
*Leuk Lymphoma.* 査読有 50, 2009, 300-2.

[学会発表] (計 5 件)

- 1) 井上彰子、河上千尋、瀧谷公隆、玉井浩.  
小児急性前骨髄球性白血病に対する亜ヒ酸/ゲムツズマブオゾガマイシンの使用経験.  
第 52 回日本小児血液学会・第 26 回日本小児がん学会、2010 年 12 月、大阪
- 2) 井上彰子、瀧谷公隆、河上千尋、玉井浩.  
小児急性前骨髄球性白血病に対する亜ヒ酸/ゲムツズマブオゾガマイシンの使用経験. 第 37 回日本小児臨床薬理学会、2010 年 11 月、東京
- 3) 井上彰子、瀧谷公隆、玉井浩.  
癌細胞株におけるビタミン E (トコトリエール) のアポトーシス誘導機構解析.  
第 6 回日本小児栄養研究会、2009 年 3 月、東京
- 4) 井上彰子、河上千尋、植田直樹、玉井浩.  
小脳髄芽腫治療後に発症した脛骨骨肉腫の 1 例. 第 50 回日本小児血液学会・第 24 回日本小児がん学会、2008 年 11 月、千葉
- 5) 井上彰子、河上千尋、瀧谷公隆、宮崎敬士、青松友槻、余田篤、玉井浩  
Crohn 病に合併した急性前骨髄球性白血病ー  
トレチノイン体内動態を含めてー  
第 70 回日本血液学会、2008 年 10 月、京都

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.osaka-med.ac.jp/deps/ped/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 彰子 (Inoue Akiko)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 90330076