

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16512

研究課題名（和文）急性骨髄性白血病の薬剤耐性機序におけるDNA修復遺伝子の関わりと新規治療法の開発

研究課題名（英文）Involvement of DNA repair genes in the mechanism of drug resistance in acute myeloid leukemia and development of novel therapeutic strategies

研究代表者

後藤 七海（Gotoh, Nanami）

群馬大学・大学院保健学研究科・助教

研究者番号：80782482

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：我々の知る限りでは、急性骨髄性白血病においてAPE1 knockout株の作成に関する報告はない。従って、我々の成果は、急性骨髄性白血病における、APE1の役割の解明において重要な成果であると考えている。今後、薬剤誘導型APE1 knockout株を用いてAML細胞の増殖や抗がん剤の感受性への影響を検討していく予定である。APE1はDNA修復だけでなく、がん微小環境における低酸素や酸化ストレスなどの様々なストレスにも反応し、複数の転写因子を活性化する多機能タンパク質である。そのため、RNAシーケンス等の包括的な応答経路の検討が必要と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、急性骨髄性白血病の細胞株においてAPE1をknockoutすることに成功した。現時点では、急性骨髄性白血病におけるAPE1 knockout株の報告はない。この成果は、APE1と急性骨髄性白血病の病態の関係を明らかにする新たな一歩として期待される。我々の検討によれば、APE1 knockout株は増殖能力が非常に低かった。APE1はDNA修復だけでなく、がん微小環境における低酸素や酸化ストレスなどの様々なストレスにも反応し、複数の転写因子を活性化する多機能タンパク質である。そのため、RNAシーケンスなどの包括的な解析を通じて、急性骨髄性白血病の治療抵抗性の解明につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：To our knowledge, there are no reports on the generation of APE1 knockout strains in acute myeloid leukemia. Therefore, we believe that our results are important in elucidating the role of APE1 in acute myeloid leukemia. In the future, we plan to examine the effects of drug-induced APE1 knockout lines on AML cell proliferation and sensitivity to anticancer drugs. APE1 is a multifunctional protein that activates multiple transcription factors. Therefore, it is considered necessary to examine comprehensive response pathways such as RNA sequencing.

研究分野：病態検査学

キーワード：急性骨髄性白血病 DNA修復

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

高齢化に伴い急性骨髄性白血病の発症率が増加している。本疾患は寛解後も半数が再発するため新たな治療戦略が求められているところである。薬剤耐性は急性骨髄性白血病の治療抵抗性の核心をなす形質である。近年、急性骨髄性白血病の薬剤耐性機構において、DNA修復の亢進が着目されている。我々は、主に酸化されたDNA損傷を修復する塩基除去修復の関連遺伝子に着目し、APE1が白血病細胞の増殖に寄与すること、PARP1高発現が急性骨髄性白血病の予後不良に関わることを発見した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、塩基除去修復関連遺伝子に着目し検討した、前述の我々の研究成果を発展させ、DNA修復機構を介した薬剤耐性機構を明らかにし、予後不良の急性骨髄性白血病に対する新しい治療戦略へ発展させることを目的とした。

### 3. 研究の方法

- 1) APE1 knockdown 株の樹立と細胞増殖への影響の検討
- 2) APE1 knockout 株の樹立と細胞増殖への影響の検討
- 3) 薬剤誘導型 APE1 knockout 株の樹立

### 4. 研究成果

- 1) APE1 knockdown 株の樹立と細胞増殖への影響の検討

Tet-on system を用い、APE1 knockdown 株を樹立した。

細胞増殖への影響を検討したところ、コントロールに比べて軽度増殖が抑制された。

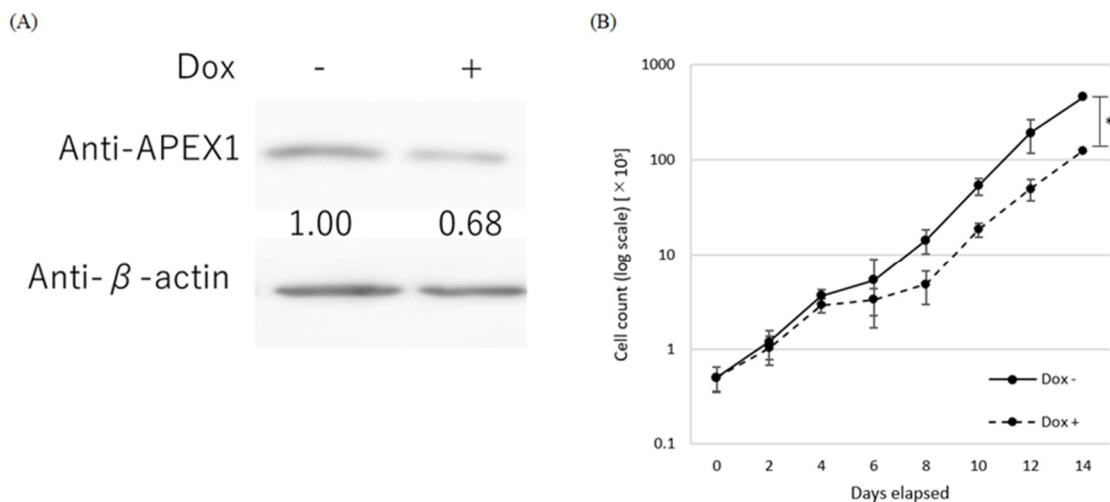


図 1: Tet-on システムによる APE1 knockdown 株の APE1 発現量(A)。APE1 knockdown による AML 細胞の増殖抑制(B)。

APE1 knockdown 株について細胞増殖抑制のメカニズムを明らかにするため、細胞周期ならびに細胞内シグナル伝達系の発現およびリン酸化の程度を検討した。細胞周期は、G2/M 期がわずかに減少していた。シグナル伝達系(p38, p44/42, p65)の発現やリン酸化に明らかな差は見られなかったが、p-p38 がわずかに減少していた。どちらの検討においても明らかな変化はなく、細胞増殖抑制の機序の解明には至らなかった。原因として、APE1 の発現抑制が弱いことが考えられ、他の shRNA の配列も検討したが十分な knockdown には至らず、APE1 knockout 株の作製に着手した。

## 2) APE1 knockout 株の樹立と細胞増殖への影響の検討

HL60 を用い、CRISPR/Cas9 システムで APE1 knockout 株を作製した。Knockout 株は細胞増殖が著明に抑制され、ほとんど増殖しなかった。また、knockout 株は培養を継続すると、数週間以内に死滅してしまうことから、APE1 は AML 細胞の増殖に必須な遺伝子であることが示唆される。

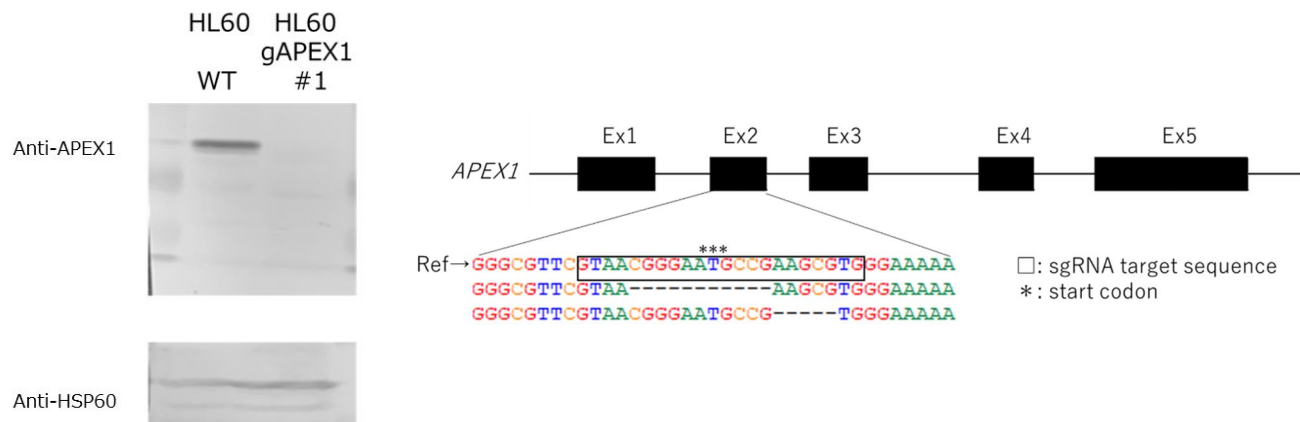


図 2: APE1 knockout 株における APE1 蛋白発現および変異部位のシーケンス

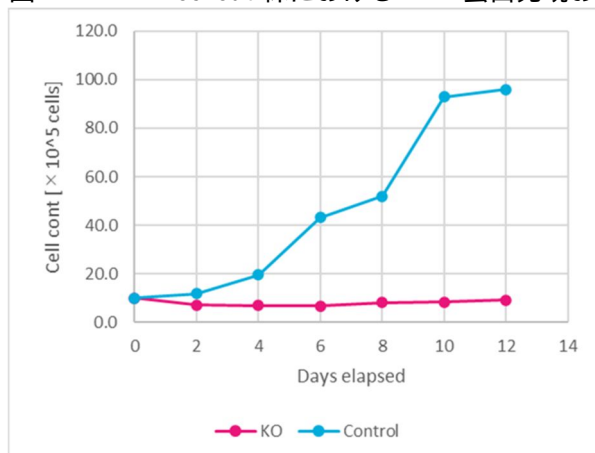


図 3: APE1 knockout 株における細胞増殖曲線

## 3) 薬剤誘導型 APE1 knockout 株の樹立

Tet-on system を応用し、薬剤誘導型の APE1 knockout 株の樹立を試みている。現在 HL60 を用い、Cas9 を薬剤誘導性に発現する細胞株を樹立したところである。その後、gRNA を導入し、薬剤誘導型 APE1 knockout 株とする予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------