

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591395

研究課題名(和文) 骨髄腫細胞のPU.1による細胞増殖停止のメカニズムの解明及び治療への応用

研究課題名(英文) The elucidation of the mechanisms of growth arrest and apoptosis in myeloma cells induced by PU.1 and its utility for myeloma treatment

研究代表者

奥野 豊 (OKUNO, YUTAKA)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：80363539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：我々はB細胞に発現しているPU.1が発現低下しているB細胞の腫瘍であるHodgkinリンパ腫においてPU.1がHodgkin Lymphomaにおいて癌抑制遺伝子であることを証明した。我々はこれまで骨髄腫細胞においてもPU.1が癌抑制因子であることを示してきた。実際にin vivoでPU.1が成熟B細胞において癌抑制因子証明するためにpost germinal centerから形質細胞においてPU.1をknockoutしたconditional knock outマウスを作製した。これらのマウスでは形質細胞の増殖を認めるマウスを認めた。現在更なる解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：We conditionally expressed PU.1 in classical Hodgkin lymphoma cell lines, L-428 and KM-H2, and identified that PU.1 induced growth arrest and apoptosis in these cells. Lentiviral transduced PU.1 expression also induced apoptosis in primary Hodgkin lymphoma cells from patients. Therefore, we concluded that PU.1 is a potent tumor suppressor in classical Hodgkin lymphoma cells. We previously conditionally expressed PU.1 also induces growth arrest and apoptosis in myeloma cell lines, U266 and KMS12PE. To test whether PU.1 is a tumor suppressor in mature B cells, including plasma cells, in vivo, we generated conditional PU.1 knockout mice in post germinal center B cells and plasma cells. At the age of 18-24 months, some of these mice shows a proliferation plasma cells in spleen and/or bone marrow. Therefore, PU.1 might be a tumor suppressor in plasma cells in vivo. We are still analyzing these mice.

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：多発性骨髄腫 PU.1 細胞増殖停止 細胞死 癌抑制遺伝子

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫は本邦では高齢化に伴い近年増加傾向にある。骨髄腫に対しては新規治療薬が開発されその平均余命を3年から6年へと延長したと言われるが、完全治癒を得るには至っていない。現在においても骨髄腫の発症機構は不明であり、その解明が現在様々な血液疾患で用いられている分子標的療法等を含めた新たな治療法の確立に必須であると考えられる。

2. 研究の目的

多発性骨髄腫細胞株では PU.1 の発現が低下していること、多発性骨髄腫患者由来の骨髄腫細胞において一部の症例において PU.1 の発現が低下しており、その予後が他の患者に比べ不良であること、さらに 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と細胞死が誘導されることを報告した (Tatetsu H et al. *Cancer Res.* 2007;67:5328-5336)。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わっ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を示唆している。脱メチル化剤である 5-aza-2'-deoxycytidine でこれらの PU.1 非発現骨髄腫細胞株を処理すると PU.1 の発現と同時に細胞増殖停止と細胞死が誘導されることより脱メチル化剤を初めとする PU.1 を発現誘導する薬剤が多発性骨髄腫で PU.1 が発現低下している症例に有効である可能性があり、そのような薬剤をスクリーニングし開発を進める。さらに我々は、PU.1 が骨髄腫細胞の癌抑制因子であるかを in vivo で検証することを目的とする。

3. 研究の方法

我々は、PU.1により引き起こされる骨髄腫細胞株の細胞増殖停止と細胞死のメカニズムを解明している。PU.1の発現前後で発現の変化する遺伝子群をDNA microarray等を用いて明らかにし、それを基にしてこの細胞増殖停止と細胞死のメカニズムを解明中であり、これを今後も推進していく。我々はさらにPU.1発現誘導するような脱メチル化剤を含めた新規な分子標的療法薬の開発を目指す。同時にPU.1発現誘導により誘導ないしは抑制され細胞増殖と細胞死に直接関わる遺伝子を標的とした分子標的療法薬の開発も目指す。一方、実際PU.1の発現低下が多発性骨髄腫の発症に直接つながる

かどうか、PU.1を形質細胞のみで conditional knockoutしたマウスを作製し、そのphenotypeを解析する。

4. 研究成果

我々はB細胞に発現しているPU.1が発現低下しているB細胞の腫瘍である classical Hodgkin リンパ腫においてPU.1が癌抑制遺伝子として働いているかどうか調べた。実際には classical Hodgkin リンパ腫細胞株 L-428 と KM-H2 に tet-off の系を用いて PU.1 を発現させるとその増殖が完全に停止し細胞死も起こることがわかった。患者由来の primary classical Hodgkin lymphoma cell を純化してこれに lentivirus を用いて PU.1 を発現させても細胞死が誘導されることを証明した。以上から classical Hodgkin lymphoma cell においても PU.1 は癌抑制遺伝子として働くことを証明した。以上のように PU.1 を発現させると多発性骨髄腫とホジキンリンパ腫に細胞増殖停止と細胞死を引き起こす。このメカニズムを解明しこれらの疾患の新たな治療法の確立につなげたい。そのためには PU.1 によって引き起こされる細胞増殖停止と細胞死のメカニズムを解明する必要がある。まず我々は PU.1 に結合している転写因子群の同定するために PU.1 を発現させたホジキンリンパ腫細胞株と骨髄腫細胞株を用いて免疫沈降を行った。まずホジキンリンパ腫細胞株 L-428 細胞を大量に培養して蛋白をそこから抽出し抗 PU.1 抗体にて免疫沈降を行った。免疫沈降してきた蛋白を shotgun sequence を行って PU.1 に結合している蛋白の候補を 100 前後みつめてきた。この中には Geminin や MCM7 などの epigenetic な遺伝子発現量生や DNA 複製に関わる遺伝子群が含まれていた。現在これらの蛋白の中で実際に PU.1 と結合しているものの同定を進めているところである。一方、我々は in vivo で PU.1 が形質細胞で癌抑制遺伝子であることを直接調べるために形質細胞で PU.1 をノックアウトしたマウスを作成し、その表現型を解析した。このうち 18-24 ヶ月の高齢のマウスの 50%以上に M 蛋白血症を認めた。形質細胞への分化を促進するためにさらに NP-CGG でマウスを刺激すると M 蛋白を認めるマウスが 70%前後に増加した。これらのマウスを調べると脾腫を認めるものが認められた。従って、これらのマウスには成熟 B 細胞リンパ腫ないしは一部は骨髄腫様の病態が起こっていることがわかった。以上から PU.1 が成熟 B 細胞及び形質細胞の腫瘍抑制遺伝子である可能性が示された。

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8件)

1. Yuki H, Ueno S, Tatetsu H, Nihiro H, Iino T, Endo S, Kawano Y, Komohara Y, Takeya M, Hata H, Okada S, Watanabe T, Akashi K, Mitsuya H and Okuno Y. PU.1 is a potent tumor suppressor in classical Hodgkin lymphoma cells. *Blood*. 2013; 121(6):962-970. 査読あり
2. Kawano Y, Kikukawa Y, Fujiwara S, Wada N, Okuno Y, Mitsuya H, Hata H. Hypoxia reduces CD138 expression and induces an immature and stem cell-like transcriptional program in myeloma cells. *Int J Oncol*. 2013 Dec;43(6):1809-16 査読あり
3. Fujiwara S, Kawano Y, Yuki H, Okuno Y, Nosaka K, Mitsuya H and Hata H. PDK1 inhibition is a novel therapeutic target in multiple myeloma. *Br J Cancer*. 2013; 108(1):170-178.
4. Okuno Y and Yuki H. PU.1 is a tumor suppressor for B cell malignancies. *Oncotarget*. 2012; 3(12):1495-1496. 査読なし
5. Okuno Y, Tatetsu H, Nosaka K and Mitsuya H. Three cases of aggressive natural killer cell leukemia with a lethal hemorrhagic complication. *J Clin Exp Hematop*. 2012; 52(2):101-106. 査読あり
6. Kawano Y, Ueno S, Abe M, Kikukawa Y, Yuki H, Iyama K, Okuno Y, Mitsuya H and Hata H. TRAIL produced from multiple myeloma cells is associated with osteolytic markers. *Oncology Reports*. 2012; 27:39-44. 査読あり
7. Kawano Y, Fujiwara S, Wada N, Izaki M, Yuki H, Okuno Y, Iyama K, Yamasaki H, Sakai A, Mitsuya H and Hata H. Multiple myeloma cells expressing low levels of CD138 have an immature phenotype and reduced sensitivity to lenalidomide. *Int J Oncol*. 2012; 41(3):876-884. 査読あり
8. Levantini E, Lee S, Radomska H, Hetherington C, Alberich-Jorda M, Amabile G, Zhang P, Gonzalez D, Zhang J, Basseres D, Wilson

N, Koschmieder S, Huang G, Zhang D, Ebralidze A, Bonifer C, Okuno Y, Gottgens B, Tenen DG. RUNX1 regulates the CD34 gene in haematopoietic stem cells by mediating interactions with a distal regulatory element. *EMBO J*. 2011; 30(19):4059-4070. 査読あり

〔学会発表〕(計6件)

1) Successful treatment by VRCD therapy of multiple myeloma (MM) patients refractory to RCD or VCD

Yutaka Okuno, Eiko Miyagawa, Rie Furuta, Shinya Hirata, Hiroyuki Hata, Hiroaki Mitsuya
日本血液学会 2013/10/11 ロイトン札幌

2) Conditional knockout of PU.1 in plasma cells results in monoclonal gammopathy.

Shinya Endo, Hiromichi Yuki, Yoshihiro Komohara, Shikiko Ueno, Hiro Tatetsu, Motohiro Takeya, Seiji Okada, Koichi Akashi, Daniel G Tenen, Hiroaki Mitsuya, Yutaka Okuno
日本血液学会 2013/10/11 ロイトン札幌

3) IRF4 down-regulation may be involved in PU.1-induced growth arrest/apoptosis in myeloma cells.

Niina Ueno, Shikiko Ueno, Hiro Tatetsu, Hiromichi Yuki, Hiroyuki Hata, Tadafumi Iino, Hiroaki Nihiro, Koichi Akashi, Hiroaki Mitsuya, Yutaka Okuno
日本血液学会 2013/10/11 ロイトン札幌

4) PU.1 is a potent tumor suppressor in classical Hodgkin lymphoma cells

Hiromichi Yuki, Shikiko Ueno, Hiro Tatetsu, Hiroaki Nihiro, Hiroyuki Hata, Seiji Okada, Toshiki Watanabe, Koichi Akashi, Hiroaki Mitsuya, Yutaka Okuno

日本血液学会 2012/10/19 京都国際会議場

5) PU.1-induced growth arrest and apoptosis in classical Hodgkin lymphoma cells

Hiromichi Yuki, Shikiko Ueno, Hiroaki Nihiro, Hiro Tatetsu, Hiroyuki Hata, Toshiki Watanabe, Seiji Okada, Koichi Akashi, Hiroaki Mitsuya, Yutaka Okuno

アメリカ血液学会 2011/12/5 サンディエゴ

6) PU.1-induced growth arrest and apoptosis in classical Hodgkin lymphoma cell lines
Hiromichi Yuki, Shikiko Ueno, Hiro Tatetsu, Hiroaki Niuro, Hiroyuki Hata, Toshiki Watanabe, Koichi Akashi, Hiroaki Mitsuya, Yutaka Okuno
日本血液学会 2011/10/15 名古屋国際会議場

研究者番号：

〔図書〕(計3件)

1) 血液疾患最新の治療 2014-2016 “多発性骨髄腫”

奥野 豊、畑 裕之

南江堂、2014, 373 (204-207)

2) みのがしてはならない血液疾患 病理からみた44症例

菰原 義弘、奥野 豊、竹屋 元裕

医学書院、2014, 278 (159-164)

3) 血液症候群(第2版)III

奥野 豊

日本臨床社、2013, 767 (682-685)

〔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 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥野 豊 (OKUNO, YUTAKA)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：80363539

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()