

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591547

研究課題名(和文) MLL再構成陽性急性骨髄性白血病の新規治療標的の探索

研究課題名(英文) Identification of new therapeutic target for MLL rearranged acute myeloid leukemia

研究代表者

今村 俊彦 (Imamura, Toshihiko)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30444996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではMLL再構成陽性急性骨髄性白血病(MLLr-AML)の細胞株および患者検体を用い、MLLr-AMLに対するATRA感受性を検討した。その結果、MLL-AF9陽性細胞ではATRA感受性がある程度保たれていたが、MLL-AF4陽性細胞ではATRA抵抗性であり、その差は、RARAおよびPU.1のプロモーター領域、RUNX1のエンハンサー領域のH3K4ジメチル(H3K4me2)の程度に依存する事が明らかとなった。H3K4の脱メチル化酵素であるLSD1の阻害剤により、上記遺伝子のH3K4me2の程度が上昇し、MLL-AF4陽性細胞のATRA感受性が回復する事も明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：This study revealed the potential mechanism of high ATRA sensitivity of MLL-AF9-positive AML compared to MLL-AF4-positive AML. The level of dimethyl histone H3 lysine 4 (H3K4me2) in the RARA gene-promoter region, PU.1 upstream regulatory region (URE) and RUNX1 +24/+25 intronic enhancer was higher in MLL-AF9-positive cells than in MLL-AF4-positive cells, and inhibiting lysine-specific demethylase 1 (LSD1), which acts as a histone demethylase inhibitor, reactivated ATRA sensitivity in MLL-AF4-positive cell. These findings suggest that the level of H3K4me2 in the RARA gene-promoter region, PU.1 URE and RUNX1 intronic enhancer is determined by the MLL-fusion partner. Our findings provide insight into the mechanisms of ATRA sensitivity in AML and novel treatment strategies for ATRA-resistant AML.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：AML ATRA LSD1 H3K4me2 MLL

1. 研究開始当初の背景

*MLL* 再構成陽性急性骨髄性白血病 (AML) の治療成績において、再構成の相手方遺伝子の種類により予後が異なる可能性が報告されており、融合遺伝子の種類が化学療法反応性に影響する可能性が示唆されるが、詳細は全く不明である。一方、我々は ATRA と脱メチル化剤または mTOR 阻害剤を併用する事で、AML 細胞株及び患者検体において、(1) C/EBP $\alpha$ , Pu.1 といった転写因子の発現を誘導し、分化誘導が可能である事、(2) 主に FasL/Caspase 8 の活性化をとおしてアポトーシスの誘導が可能である事を明らかにしたが (Yoshida H, Imamura T et al. Leu Res 2012)、この分化誘導能およびアポトーシス誘導能に関して、*MLL* 融合遺伝子の種類が大きく影響する事を見出した (Fujiki A, Imamura T, et al. Biochem Biophys Res Commun 2012)。AML においては、分化の障害と増殖速度の亢進が芽球の形質の維持に重要であり、骨髄球系/単球系細胞の分化に関わる転写因子の発現及び機能の抑制が分化障害の本質であり、これを回復すると、細胞死を誘導できる事が知られている。我々の実験結果からは、*MLL* 融合遺伝子の種類が、この分化障害およびアポトーシス抵抗性に何らかの機序関わっている可能性が示唆され、その機序を解明する事によって、新規治療につながる糸口が明らかとなる可能性がある。

2. 研究の目的

*MLL* 再構成陽性急性骨髄性白血病細胞における、*MLL* 融合遺伝子の種類と芽球の細胞生物学的特性についての関係を解析し、新規治療法を探索する事を目的とする。

3. 研究の方法

*MLL* 遺伝子再構成陽性 AML 細胞株 (THP-1, MOLM13, KOCL-48) 及びレトロウイルス

遺伝子発現系を用い、異なる *MLL* 融合遺伝子 (*MLL-AF9*, *MLL-AF5q31*) を発現させたマウス造血幹細胞由来細胞株に ATRA を作用させ、C/EBPs, PU.1 といった転写因子の発現量の変化を定量 PCR 法またはウエスタンブロットで、また CD11b の発現の変化をフローサイトメトリー (FCM) にて解析し、その分化誘導能の差を検討した。また、細胞増殖能の ATRA による変化については、細胞周期解析や WST assay にて評価した。さらに、ATRA 抵抗性のメカニズムを明らかにするために、RAR $\alpha$  および PU.1 のプロモーター領域、RUNX1 のエンハンサー領域の H3K4me2 の程度を ChIP assay によって評価した。また、細胞株の ATRA 抵抗性の解除を誘導する薬剤として LSD1 阻害剤に着目し、その効果を WST assay を用いて in vitro で検討した。

4. 研究成果

(1) ATRA は *MLL-AF9* 陽性細胞株である THP-1, MOLM-13 において、核の成熟、細胞質の増加、顆粒の出現といった変化を誘導した。こうした変化は *MLL-AF4* 陽性細胞株である KOCL-48 では見られなかった。また、NBT 還元能についても、THP-1, MOLM-13 においては ATRA により増加が見られたが、KOCL-48 では増加を認めなかった (図 1)。

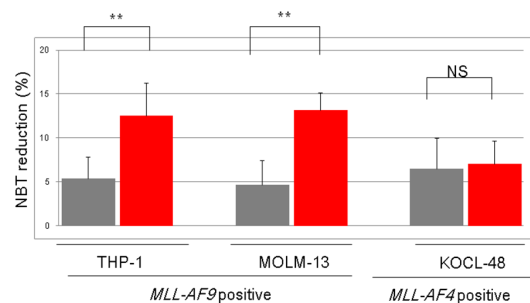


図 1 : NBT 還元能の変化

さらに、FCM による CD11b 発現解析でも、THP-1, MOLM-13 では、CD11b の発現増強を認めた。細胞増殖については、THP-1, MOLM-13 でより顕著に

G0/G1 停止を誘導し、ATRA の IC50 についても THP-1, MOLM-13 で KOCL-48 に比して低値であった ( $3.91 \pm 0.87$ ,  $1.24 \pm 0.70$  vs  $77.2 \pm 7.37 \mu\text{M}$ )。

(2) 顆粒球分化に関わる、C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\epsilon$ , RAR $\alpha$ , PU.1 の発現量の変化をウエスタンブロットで解析したところ、THP-1 および MOLM-13 においては、ATRA に反応して、これら 4 種類の蛋白の発現増加が見られたが、KOCL-48 では増加が見られなかった (図 2)。

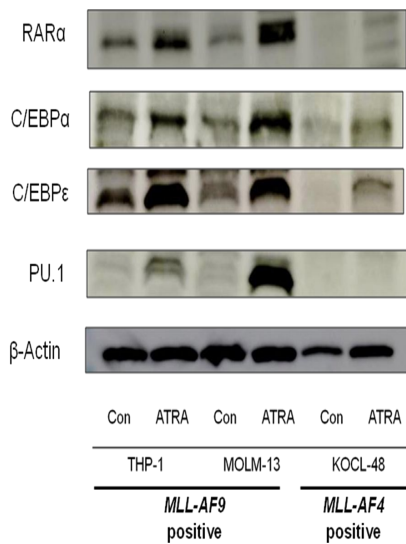


図 2 : ATRA による転写因子の変化

(3) MLL-AF9 陽性細胞株の ATRA 感受性が、患者細胞でも見られるかどうかを明らかにするために、2 名の MLL-AF9 陽性 AML 患者の保存白血病細胞を用いて、C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\epsilon$ , RAR $\alpha$ , PU.1 の発現量の ATRA による変化を定量 RT-PCR 法を用いて検討した。細胞株での結果と同様に、上記 4 種類の転写因子の遺伝子発現は、ATRA 投与により誘導された。以上の結果より、MLL-AF9 陽性 AML では ATRA 感受性がある程度保たれている事が明らかとなった。

(4) ATRA 感受性の差が、MLL 融合蛋白の種類に依存するの否かを明らかにするため、マウス造血幹細胞を MLL-AF9 および MLL-AF5q31 (AF4 とほぼ同様の機能を持つ) を導入し不死化した 2 種類の細

胞を用いて、ATRA 感受性の有無を検討した。MLL-AF9 発現細胞は、ヒト由来細胞株と同様の形態的变化を誘導し、NBT 還元能の増加、Mac-1 発現の増加を伴っていた (図 3)。

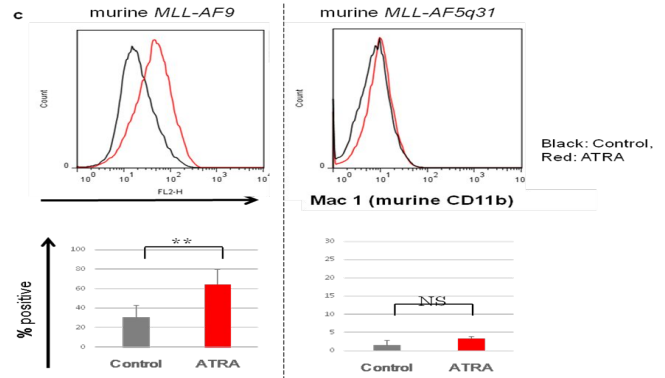


図 3 : マウス細胞株の Mac-1 発現量の変化

また、G0/G1 停止は MLL-AF9 発現細胞で顕著であり、ATRA の IC50 についても MLL-AF9 発現細胞では MLL-AF5q31 発現細胞に比して、低値であった ( $2.01 \pm 0.39$  vs  $32.6 \pm 14.5 \mu\text{M}$ )。さらに、C/ebp $\alpha$ , C/ebp $\epsilon$ , Rar $\alpha$ , Sfp1.1 の発現について検討した所、MLL-AF9 発現細胞で顕著な発現増加が見られた (図 4)。

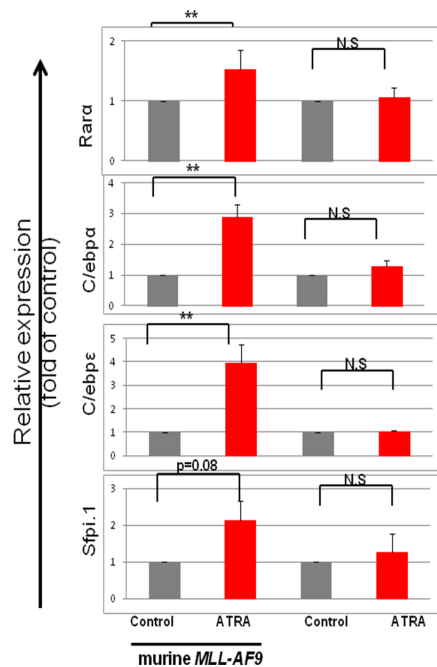


図 4 : マウス細胞株における各種転写

### 因子の発現量の変化

以上の結果は、ヒト由来細胞株および患者細胞のデータを再現するものであり、MLL 再構成陽性 AML の ATRA 感受性が、MLL 融合遺伝子の種類によって規定される事を示していると考えられた。

(5) MLL-AF9 陽性 AML において、ATRA 感受性がある程度保たれている事から、AML の化学療法において、ATRA の併用が既存の化学療法に対して、相乗的に作用するか否かを *in vitro* で検討した。THP-1 および MOLM-13 について ATRA とシタラピン (AraC) の併用が、AraC の IC50 を有意に低下させるか否かを検討したところ、いずれの細胞株でも、有意な IC50 の低下を認めた (図 5)。

b	IC50(μM)	AraC without ATRA 1μM	AraC with ATRA 1μM	Combination Index
THP-1	3.69±1.00	0.17±0.075	0.23	
MOLM-13	0.042±0.030	0.0038±0.0031	0.46	
murine MLL-AF9	0.060±0.012	0.015±0.0026	0.82	

図 5 : ATRA と AraC の相乗効果

(6) MLL 再構成陽性 AML の ATRA 感受性の差が生じるメカニズムを明らかにするために、*RARα* のプロモーター領域、*PU.1* の proximal or distal upper regulatory region (URE), *RUNX1* の +24/+25 intronic enhancer 領域の H3K4me2 の程度を ChIP assay にて検討した。いずれの領域も THP-1, MOLM-13 において KOCL-48 にひして H3K4me2 の程度は増加しており、各々の細胞株の ATRA 感受性と相関する結果であった (図 6)。

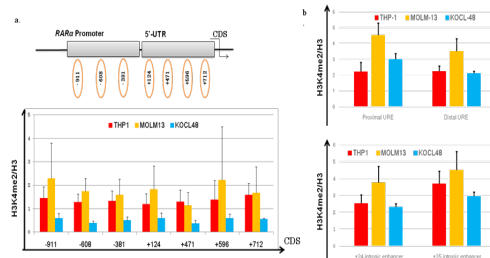


図 6

また、MLL-AF9, MLL-AF5q31 発現マウス細胞株でも、同様の解析を行ったところ、MLL-AF9 発現細胞において、*Rara* promoter, *Sfpi.1* URE, *Runx1* intronic enhancer の H3K4me2 の程度が強く、ヒト由来細胞株でのデータと同様であった (図 7)。

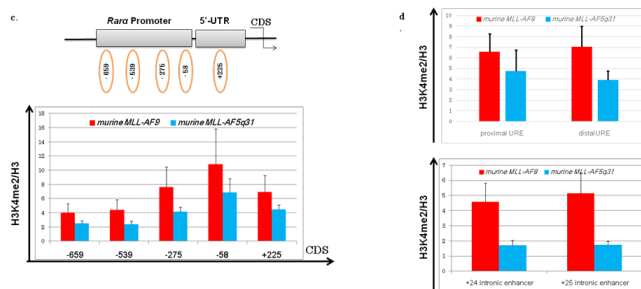


図 7

以上より、*RARα* のプロモーター領域、*PU.1* の URE, *RUNX1* の +24/+25 intronic enhancer 領域の H3K4me2 の程度は、MLL 融合蛋白の種類によって規定される事が明らかとなった。

(7) H3K4me2 の脱メチル化を促進する酵素として LSD1 が知られている。我々は、LSD1 阻害が *RARα*, *PU.1*, *RUNX1* の H3K4me2 の増加を誘導し、ATRA 抵抗性の解除をもたらす可能性を検討するため、LSD1 阻害剤 (TCP) と ATRA の併用が KOCL-48 細胞株の ATRA 抵抗性を解除するか否かを検討した。LSD1 阻害剤と ATRA の併用により、KOCL-48 は顆粒球分化に特徴的な細胞形態の変化を示し、NBT 還元能の上昇、CD11b の発現増加が誘導された (図 8)。

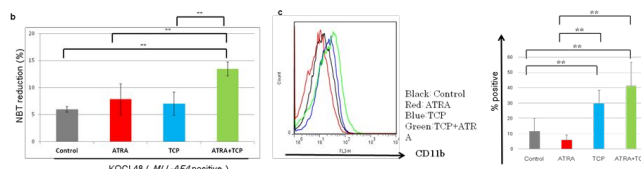


図 8

また、ウェスタンブロットにて C/EBPα, C/EBPε, *RARα*, *PU.1* の発現誘導も確認され、ATRA の IC50 も有意に低下した (72.2

$\pm 7.95$  vs  $12.9 \pm 3.04 \mu\text{M}$ ) さらに、TCP 投与下での ChIP assay にて  $\text{RAR}\alpha$ , PU.1, RUNX1 の H3K4me2 の増加も確認された( 図 9 )

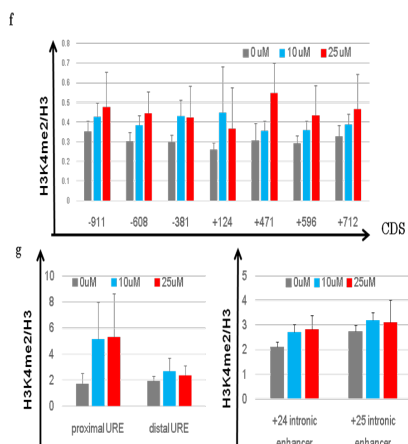


図 9

以上により、LSD1 阻害剤 (TCP) は、LSD1 阻害による、 $\text{RAR}\alpha$ , PU.1, RUNX1 の H3K4me2 の増強を介して、ATRA 抵抗性を解除したと考えられ、ATRA 抵抗性 AML の新規治療となり得る可能性を示唆する結果であった。

#### 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 3 件)

Yoshida H, Imamura T, Fujiki A, Hirashima Y, Miyachi M, Inukai T, Hosoi H. Post-transcriptional modulation of C/EBP $\alpha$  prompts monocytic differentiation and apoptosis in acute myelomonocytic leukaemia cells. *Leuk Res.* 査読あり 36: 735-741, 2012.

Fujiki A, Imamura T, Sakamoto K, Kawashima S, Yoshida H, Hirashima Y, Miyachi M, Yagyu S, Nakatani T, Sugita K, Hosoi H. All-trans retinoic acid combined with 5-Aza-2'-deoxycytidine induces C/EBP $\alpha$  expression and growth inhibition in MLL-AF9-positive leukemic cells. *Biochem*

*Biophys Res Commun.* 査読あり 428: 216-223, 2012.

Sakamoto K, Imamura T, Yano M, Yoshida H, Fujiki A, Hirashima Y, Hosoi H. Sensitivity of MLL-rearranged AML cells to all-transretinoic acid is associated with the level of H3K4me2 in the *RAR $\alpha$*  promoter region. *Blood Cancer Journal* 2014 査読あり 4, e205; doi:10.1038/bcj.2014.25

[学会発表](計 5 件)

Yano M, Imamura T, Sakamoto K, Yoshida H, Fujiki A, Hirashima Y, Ishida H, Hosoi H. LSD1 inhibitor activates retinoic acid pathway in MLL fusion positive acute myeloid leukemia. 54th ASH Annual Meeting and Exposition, Atlanta, GA, U.S.A., 2012.12.8-11.

Sakamoto K, Imamura T, Yano M, Yoshida H, Fujiki A, Hirashima Y, Hosoi H. MLL-AF9 positive acute myeloid leukemia cells are sensitive to all-trans retinoic acid. 55th ASH Annual Meeting and Exposition, New Orleans, LA, U.S.A., 2013.12.7-10.

Fujiki A, Imamura T, Yoshida H, Hirashima Y, Miyachi M, Yagyu S, Nakatani T, Hosoi H. MLL fusion partners affect the sensitivity of human and murine leukemic cell lines to DNMTi. 第 73 回日本血液学会, 名古屋, 2011.10.14-16.

矢野未央, 今村俊彦, 坂本謙一, 吉田秀樹, 藤木 敦, 平嶋良章, 石田宏之, 細井 創. LSD1 阻害薬は MLL 融合遺伝子陽性急性骨髄性白血病においてレチノイン酸受容体経路の活性化を誘導する. 第 54 回日本小児血液・がん学会. 横浜, 2012.11.30-12.2.

坂本謙一, 今村俊彦, 矢野未央, 吉田

秀樹, 藤木 敦, 平嶋良章, 細井 創.

MLL-AF9 陽性急性骨髄性白血病細胞は  
ATRA 感受性を示す. 第 55 回日本小児血  
液・がん学会, 福岡, 2013.11.29-12.1.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

今村俊彦 (Imamura, Toshihiko)  
京都府立医科大学・大学院医学研究科・  
講師

研究者番号 : 30444996