

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591558

研究課題名(和文) 新規レチノイドによる急性前骨髄球性白血病細胞分化のエピジェネティクス機構の解明

研究課題名(英文) Epigenetics in differentiation of acute promyelocytic leukemia cells by synthetic retinoids

研究代表者

井上 彰子 (Inoue, Akiko)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：90330076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：最近、エピジェネティクス機構がオールトランス型レチノイン酸(ATRA)による急性前骨髄球性白血病(APL)細胞分化に関与していることが判明した。今回、新規レチノイド化合物Am80が白血病細胞分化におけるエピジェネティクス機構への関与を検討した。その結果、Am80は、RARの転写活性をエピジェネティクスに関与する転写因子であるMLL5 (mixed lineage leukemia 5, short form)の存在下で増強することが判明した。新規レチノイドの分化機構の解明には、さらなる検討が必要と思われる。

研究成果の概要(英文)：Recently, it is reported that the differentiation of acute promyelocytic leukemia (APL) cells by all-trans retinoic acid (ATRA) is related with epigenetics mechanism. In the current study, we examined the epigenetics in differentiation of APL cells by synthetic retinoids. Am80 as synthetic retinoid up-regulated transcriptional activity of RAR and RXR with MLL5 (mixed lineage leukemia 5, short form), which is the key molecule of epigenetics in differentiation of APL cells. Further investigations are required to clarify this issue.

研究分野：小児血液腫瘍学

キーワード：急性前骨髄球性白血病 レチノイド エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

急性前骨髄球性白血病 (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 (J Clin Oncol, 1998)。しかし、ATRA 耐性細胞の出現が、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 薬物代謝の亢進、2) MDR (multi-drug resistance gene) 遺伝子の出現、3) PML/RAR 融合遺伝子の変異などが考えられる (Leukemia, 2005)。

近年、ATRA 耐性の克服を目的として、日本で開発された新規レチノイド Am80 は、2005 年に再発・難治性の APL 治療薬として認可された (Blood, 1997)。新規非環式レチノイド NIK-333 は、肝細胞癌の再発予防目的を対象とした臨床試験では、良好な成績を修めている (興和薬品)。NIK-333 は HL-60 細胞株に対して分化誘導作用を有する。また最近、RXR アゴニストであるレチノイド化合物 (HX630, PA024) が合成され、分化誘導能を呈することが報告されている (J Med Chem, 2005; 東京医科歯科大学 疾患生命科学研究所 影近弘之教授)。

2. 研究の目的

ATRA 分化誘導のメカニズムとして、レチノイン酸受容体である RAR/RXR の作用機構を知ることが重要である。RAR/RXR は核内受容体スーパーファミリーに属し、リガンド依存的に標的遺伝子の転写を制御する転写因子である。最近、核内受容体の作用機構には、エピジェネティクスが大きく関与することが判明した。すなわち、核内受容体が DNA ゲノム上に作用する時に、複数のタンパク質複合体が関与する。すなわち、核内受容体が HDAC 複合体と相互作用するときは不活性化し、HAT 複合体と結合するときには活性化する。この時に DNA に巻き付いているヒストン蛋白のアセチル化・メチル化などの変化が起こる。APL における ATRA 療法の作用機構を研究する際に、このエピジェネティクスを検討する必要がある。

PML/RAR 融合タンパク質あるいは、変異 PML/RAR 融合タンパク質が存在した場合は、このエピジェネティクス機構に変化することが考えられる。しかし詳細については解明されていない。さらに新規レチノイド化合物と ATRA の分子生物学的特性を比較した基礎的な研究はあまり多くない。特に新規レチノイドがエピジェネティクス機構への影響を検討した研究は、あまりない。最近、レチノ

イン酸による HL-60 細胞分化に MLL5 (mixed lineage leukemia5、メチル化酵素) と OGT (O-GlcNAc 転移酵素) が関与することが判明した。すなわち、単糖 GlcNAc (N アセチルグルコサミン) 付加した MLL5 が活性化し、ヒストン蛋白 H3 リジン 4 をメチル化し、RAR/RXR の転写活性を促進するのである。そこで、本研究では、APL 細胞における新規レチノイド化合物のエピジェネティクス機構への影響について、ATRA との差異を明確にする。

3. 研究の方法

新規レチノイド化合物が PML/RAR 融合蛋白質と MLL5 の相互作用に及ぼす影響
レチノイド化合物の存在下で、MLL5 および PML/RAR 融合タンパク質の転写活性への影響および両蛋白の相互作用を検討する。PCR 法にて、MLL5 遺伝子を増幅し、pcDNA ベクターに組み込む。

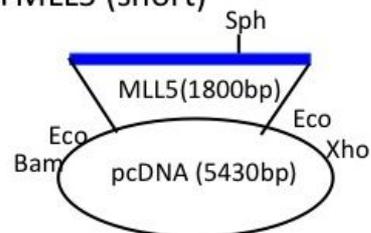
新規合成レチノイド Am80 投与による MLL5 および PML/RAR 融合タンパク質の転写活性の影響をルシフェラーゼ法にて確認する。

4. 研究成果

1) MLL5-pcDNA ベクターの構築

Lih-Wen Deng 先生 (シンガポール国立大学) から pEF6-flag MLL5-His TOP0 ベクター (MLL5 full length, 1858 アミノ酸) をご供与いただいた。このベクターを鋳型にして、N 末の MLL5 short form (609 アミノ酸) を PCR 法にて増幅し、pcDNA ベクターに組み込んだ (図 1)。これを発現ベクターとして使用した。

図 1 MLL5 (short)



2) RAR/PML 融合タンパク質と MLL5 (short form) の相互作用

RAR/PML 融合タンパク質と MLL5 の相互作用を検討した。PML/RAR 融合タンパク質および転写因子 MLL5 (short form) の転写活性をルシフェラーゼ法 (リポフェクタミン法) にて確認した。発現ベクターとして、pCMX-hRAR、pCMX-hRXR、pCMX-HA-PML/RXR、SRC-1 発現ベクターを利用し、レポーターとし tk-Luc

(thymidine kinase)あるいは tkTRE-Luc を使用した。その結果、MLL5 存在下で RAR および RXR の転写活性を Am80 の濃度依存的に上昇させた (図 2)。

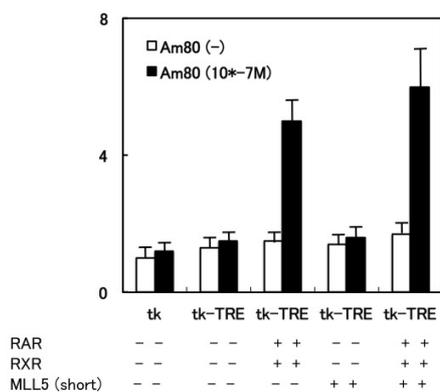


図2 転写活性実験: RARとMLL5 (short)

また MLL5 の存在下において、PML/RAR 融合遺伝子たんぱく質および RXR の転写活性についてもわずかながら上昇した (図 3)。

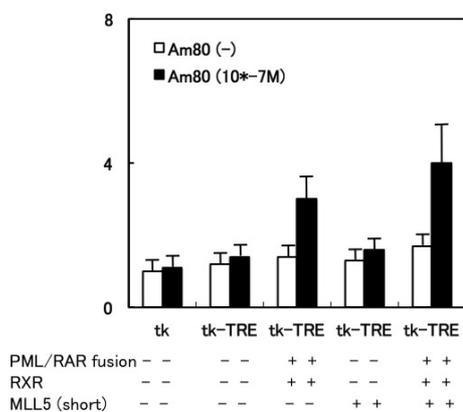


図3 転写活性実験: PML/RARとMLL5 (short)

さらに RAR および RXR の転写活性は、MLL5(short form)と転写共役因子 SRC-1 の添加によって、わずかながら増強した(図 4)。以上から RAR および RXR と MLL-5 の相互作用に SRC-1 も関与し、さらに新規レチノイドによる細胞分化も同様の機構が存在する可能性が示唆された。

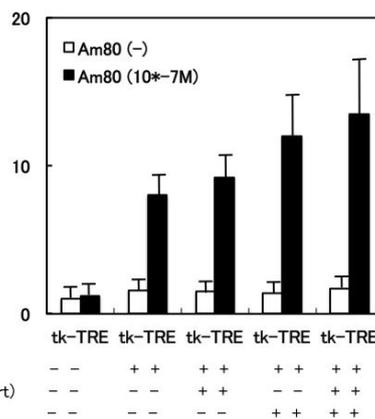


図4 転写活性実験: PML/RARとMLL5 (short)&SRC

細胞分化におけるエピジェネティクス機構については、まだ不明な点が多い。特に細胞分化作用を有するレチノイン酸でもまたあまり解明されていない。以前の報告により、MLL5(short form)が関与することが報告されたが、今回我々の検討でも、RAR および RAR の特異的なリガンドでもある Am80 においても MLL5(short form)と RAR/RXR と相互作用し、転写活性を増強させる可能性が示唆された。また、Am80 は、PML/RAR すなわち、Am80 においても ATRA と同様なエピジェネティクス機構が存在することが考えられる。今回の検討では、ヒストンたんぱく質との関連を解明できなかったまた、変異型が、今後のさらなる検討課題である。

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 10 件)

1) Takitani K, Inoue K, Koh M, Miyazaki H, Inoue A, Kishi K, Tamai H.

Altered retinol status and expression of retinol-related proteins in streptozotocin-induced type 1 diabetic model rats. 査読有

J Clin Biochem Nutr. 2015;56(3):195-200.

doi: 10.3164/jcfn.14-113.

2) Takitani K, Inoue K, Koh M, Miyazaki H, Kishi K, Inoue A, Tamai H.

α -Tocopherol status and altered expression of α -tocopherol-related proteins in

streptozotocin-induced type 1 diabetes in rat models. 査読有

J Nutr Sci Vitaminol. 2014;60(6): 380-6.

doi: 10.3177/jnsv.60.380.

3) Miyazaki H, Takitani K, Koh M, Inoue A, Kishi K, Tamai H.

Retinol status and expression of retinol-related proteins in methionine-choline deficient rats.

査読有

J Nutr Sci Vitaminol. 2014;60(2):78-85.

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jnsv/60/2/60_78/_pdf

4) Inoue A, Kawakami C, Takitani K, Tamai H.

Azacitidine in the treatment of pediatric therapy-related myelodysplastic syndrome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

査読有

J Pediatr Hematol Oncol. 2014;36(5):e322-4.

doi: 10.1097/MPH.0000000000000042.

5) Kawakami C, Kono Y, Inoue A, Takitani K, Ikemoto T, Tamai H.

Severe bone marrow failure associated with human parvovirus B19 infection in a case with no underlying disorder. 査読有

Int J Hematol. 2012;96(6):820-1.

doi: 10.1007/s12185-012-1214-7.

6) Kawakami C, Inoue A, Takitani K, Tsuji M, Wakai K, Tamai H.

Imatinib mesylate treatment for platelet-derived growth factor receptor alfa-positive choroid plexus carcinoma. 査読有

Clin Pract. 2012;2(2):e49.

doi: 10.4081/cp.2012.e49.

7) Inoue A, Kawakami C, Takitani K, Tamai H.

Sustained molecular remission after arsenic trioxide and gemtuzumab ozogamicin in a pediatric patient with relapsed acute promyelocytic leukemia. 査読有

Pediatr Hematol Oncol. 2012;29(2):170-2.

doi: 10.3109/08880018.2011.622834.

8) Inoue A, Kawakami C, Takitani K, Ikemoto T, Tamai H.

Acute monoblastic leukemia that switched lineage at relapse to acute lymphoblastic leukemia: a case report. 査読有

J Pediatr Hematol Oncol. 2012;34(6):e258-60.

doi: 10.1097/MPH.0b013e318233219d.

9) 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ATO/GOの使用経験 査読有

日本小児臨床薬理学会雑誌24巻1号

Page78-81,2012

10) Inoue A, Takitani K, Koh M, Kawakami C, Kuno T, Tamai H.

Induction of apoptosis by γ -tocotrienol in human cancer cell lines and leukemic blasts from patients: dependency on Bid, cytochrome c, and caspase pathway. 査読有

Nutr Cancer. 2011;63(5):763-70.

doi: 10.1080/01635581.2011.563030.

〔学会発表〕(計 12件)

1) 鈴木 亮、井上彰子

18 trisomy に合併した肝芽腫の治療経験

第28回近畿小児科学会 (2015年3月1日
グランフロント大阪;大阪府大阪市)

2) 鈴木 亮、井上彰子

強度変調放射線療法を含む集学的治療を行った小児上咽頭癌の1例

第56回日本小児血液学会・第30回日本小児がん学会 (2014年11月29日 岡山コンベンションセンター;岡山県岡山市)

3) 鈴木 亮、井上彰子

先天性角化不全症の1例

第27回近畿小児科学会 (2014年3月9日
奈良県文化会館;奈良県奈良市)

4) 井上彰子

小児骨髄異形成症候群における Azacitidine 使用経験

第12回京滋血液腫瘍懇話会 (2014年3月28日
京都センチュリーホテル;京都府京都)

市)

5) 井上彰子
脊髄 pilocytic astrocytoma の再発例
第 65 回小児がんカンファレンス (2014 年 2 月 22 日 帝人ビル; 大阪府大阪市)

6) 榊田 翠、井上彰子
小児ホジキンリンパ腫 4 例の検討
第 26 回近畿小児科学会 (2013 年 3 月 24 日 大阪国際会議場; 大阪府大阪市)

7) 河野由佳子、井上彰子
パルボウイルス B19 感染時に白血球減少と血小板減少を呈した 1 例
第 25 回近畿小児科学会 (2012 年 3 月 11 日 キャンパスプラザ京都; 京都府京都市)

8) 茂原聖史、井上彰子
頭蓋内 germinoma の 2 例
第 25 回近畿小児科学会 (2012 年 3 月 11 日 キャンパスプラザ京都; 京都府京都市)

9) 井上彰子
造血幹細胞移植時のリコンビナントトロンボモジュリン使用経験-小児 3 症例-
第 34 回日本造血細胞移植学会 (2012 年 2 月 24 日 大阪国際会議場; 大阪府大阪市)

10) 井上彰子
造血幹細胞移植前後に Azacitidine を投与した治療関連骨髄異形成症候群
第 53 回日本小児血液学会・第 27 回日本小児がん学会 (2011 年 11 月 24 日 ベイシア文化ホール; 群馬県前橋市)

11) 高橋 浩之、井上彰子
小児急性前骨髄球性白血病に対する三酸化ヒ素による治療の実態調査
第 53 回日本小児血液学会・第 27 回日本小児がん学会 (2011 年 11 月 24 日 ベイシア文化ホール; 群馬県前橋市)

12) 望月慎史、井上彰子
小児再発難治性急性リンパ性白血病 (ALL) に対しボルテゾミブ併用化学療法を行った 5 例の後方視的検討
第 53 回日本小児血液学会・第 27 回日本小児

がん学会 (2011 年 11 月 24 日 ベイシア文化ホール; 群馬県前橋市)

〔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/classes/group/hematol.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・講師
研究者番号: 90330076

(2) 研究分担者
瀧谷公隆 (TAKITANI Kimitaka)
大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号: 80319540