

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460685

研究課題名(和文) PU.1抑制性標的遺伝子メタロチオネインの抗がん剤効果予測マーカーとしての役割

研究課題名(英文) Role of PU.1 suppressive target gene, metallothionein, as a forecasting biomarker for anticancer agents

研究代表者

高橋 伸一郎 (TAKAHASHI, Shinichiro)

東北医科薬科大学・医学部・教授

研究者番号：40375069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らはこれまでに、骨髄球系造血に必須な転写因子PU.1が直接、抑制的に制御する標的遺伝子として、多機能タンパク質メタロチオネイン(MT)を同定した。研究代表者らは、全トランス型レチノイン酸(ATRA)を急性前骨髄球性白血病(NB4)細胞に添加し、好中球へと分化誘導を試みると、MTの過剰発現下においては、NB4細胞の分化が強力に阻害されることを発見した。また代表的な抗がん剤であるシタラピン(Ara-C)を添加したところ、予想通り、MT過剰発現NB4細胞は、コントロール細胞に比して、50%有効濃度が1.5~2.0倍程度上昇し、ある程度の薬剤耐性を有していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We previously identified a multifunctional factor, metallothionein (MT), as a myeloid master transcription factor PU.1 suppressive target gene. We previously revealed that MT strongly suppresses all-trans retinoid acid induced acute promyelocytic leukemia (NB4) cells differentiation. In this study, we revealed that MT not only inhibits myeloid cell differentiation, but also bears activity for drug resistance, especially for cytarabine (Ara-C). We revealed that the MT over-expressed NB4 cells bears 1.5 to 2.0 times higher ED50 doses of Ara-C compared to their controls.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：メタロチオネイン 抗がん剤 効果予測マーカー

### 1. 研究開始当初の背景

高齢者の造血器腫瘍に対して、低用量の抗がん剤 (cytosine arabinoside [Ara-C]、5-aza-2'-deoxycytidine [5-azadC]、camptothecin 等) 治療が用いられている。このような投与法は、異常に停止している造血器腫瘍の細胞分化障害を修復し、細胞分化を引き起こすことが治療に結びついていると考えられている (Cheson, Leuk. Res., 1998 他)。しかし、これら治療効果を予測するのに有用なマーカーは確立されていない。PU.1 は、骨髄球、単球及び赤芽球の分化決定に重要な、造血系転写因子である。申請者のこれ迄の研究 (基盤研究 C;23590687,造血器腫瘍におけるエピジェネティック薬剤効果検査マーカーの確立) により、DNA メチル化酵素阻害剤である 5-azadC が、慢性骨髄性白血病 K562 細胞株をヘモグロビン産生細胞へと分化させ、その分化誘導効果と PU.1 発現量が、密接に関連していることを明らかにしている (Aoyama, Takahashi et al., B.B.R.C. 2012)。すなわち、PU.1 の発現量と、分化誘導剤の効果に関連する可能性が見出された。PU.1 の発現低下が、造血細胞の分化・増殖異常を引き起こし、急性骨髄性白血病 (AML) を始めとする多くの造血器腫瘍病態に係っている (Rosenbauer et al., Nat. Genet., 2004 他) ことから、PU.1 の下流標的の同定は造血器腫瘍病態解明に極めて重要である。申請者は、これ迄独自に、MT の複数のアイソフォームが、PU.1 により直接抑制的に制御されていることを見出している (Imoto, Takahashi et al., J.B.C. 2010) (Suzuki, Takahashi et al., B.B.R.C. 2013)。また、実際、AML 患者検体において、統計学的に極めて有意に、PU.1 発現と MT 発現が負に相関していることを発見した (Imoto, Takahashi et al., J.B.C. 2010) (図 1)。すなわち、PU.1 の発現低下と共に、MT の過剰発現が AML 病態に係ることを見出した。MT は、微量金属の生体内代謝に関わる低分子蛋白質で、固形腫瘍で発現の増加を認め、抗がん剤耐性、細胞増殖等に関与することが報告されているが、造血系細胞における機能は殆ど解析されていない (Takahashi, J. Hematol. Oncol. [Review], 2012)。そのような中で、我々はこれ迄に、MT 過剰発現が、骨髄球系細胞分化の強力な阻害因子として機能していることを発見した。

### 2. 研究の目的

本研究では、分化を引き起こす低用量抗がん剤の効果と、PU.1 及び MT 発現量との関連を検討する。すなわち、白血病細胞株を用いて、既に作成済みの PU.1 及び MT 発現プラスミド、あるいは PU.1 及び MT siRNA 発現プラスミドを導入し、新たな PU.1 及び MT 発現改変細胞株を樹立し、低用量抗がん剤と PU.1 発現量との効果関連を検討する。可能であれば、白

血病患者より検体を採取し、MT 遺伝子発現と抗がん剤効果との関連を検討する。本研究を推進することで、特に高齢者に用いられている造血器腫瘍の治療法である、低用量抗がん剤治療に対する、効果予測・判定に有用な検査マーカーとして、PU.1 及び MT の発現が応用されることが期待できる。

さらに本研究は、MT の分化障害・細胞周期制御異常分子機序を明らかにすることで、その機序に立脚した、MT 高発現白血病に対する特異的治療法開発の端緒とすることを目指した。

### 3. 研究の方法

【1】各種 PU.1 及び MT 発現改変白血病細胞株や、入手可能であれば白血病臨床検体に対して、低用量抗がん剤を投与し、これら薬剤の効果について解析を行う。

【2】MT が造血器腫瘍において、細胞増殖、抗がん剤耐性、分化障害にどのような機序で係っているのか、そのメカニズムを明らかにする。

【3】MT 過剰発現に対して特異的な効果を持つと考えられる、細胞周期特異的抗がん剤、亜ヒ酸等を各種 MT 発現改変白血病細胞株に投与し、MT のこれら薬物に対する効果予測マーカーとしての役割について検討する。

### 4. 研究成果

これまでに、MT の抗がん剤効果における役割を検討するため、造血器腫瘍の治療で代表的な抗がん剤であるシタラビン (Ara-C) を添加したところ、予想通り、MT 過剰発現 NB4 細胞は、コントロール細胞と比して 50%有効濃度が 1.5~2.0 倍上昇し、ある程度の薬剤耐性を有していることが判明した (図 1)。そこで、それ以外の抗がん剤、5-FU (図 2)、シス

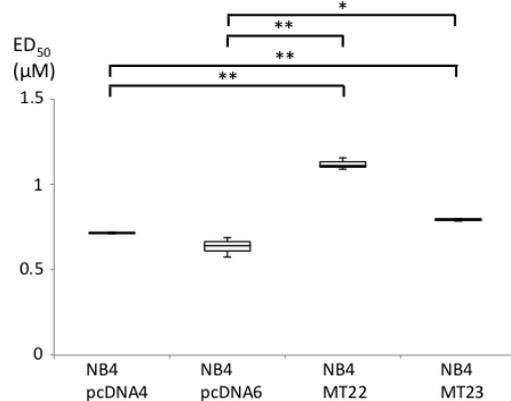


図1. NB4MT過剰発現細胞 (MT22、MT23) に対するAra-Cの効果

プラチン (図 3) メソトレキセート (図 4) を添加して検討を行ったところ、いずれの抗がん剤も 50%有効濃度に有意な差は認められなかった。急性前骨髄球性白血病の治療薬に

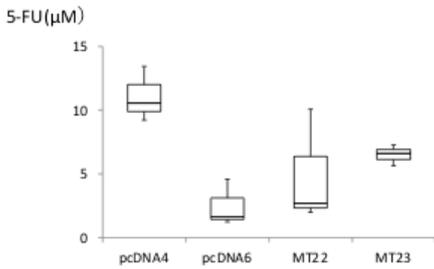


図2. NB4MT過剰発現細胞 (NB4MT22、MT23) およびコントロール細胞 (pcDNA4、pcDNA6) に対する5-FUの効果

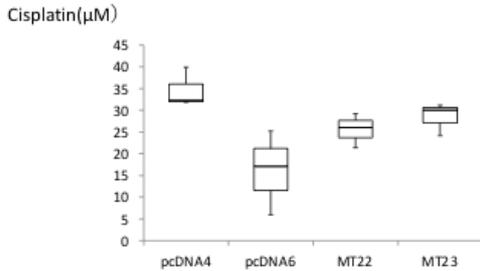


図3. NB4MT過剰発現細胞 (NB4MT22、MT23) およびコントロール細胞 (pcDNA4、pcDNA6) に対するシスプラチンの効果

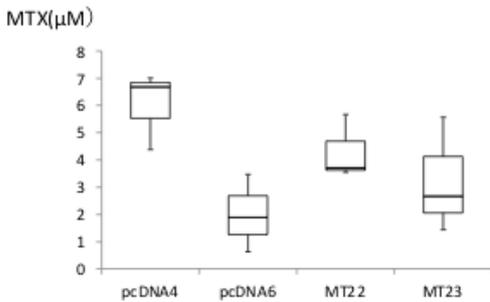


図4. NB4MT過剰発現細胞 (NB4MT22、MT23) およびコントロール細胞 (pcDNA4、pcDNA6) に対するメソトレキセート(MTX)の効果

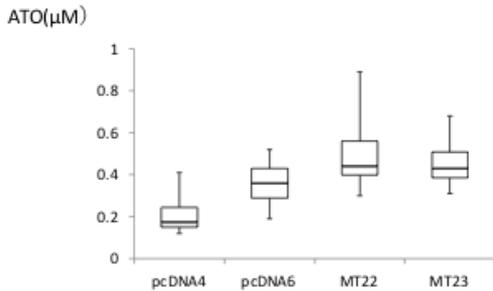


図5. NB4MT過剰発現細胞 (NB4MT22、MT23) およびコントロール細胞 (pcDNA4、pcDNA6) に対する亜ヒ酸(ATO)の効果

用いられる亜ヒ酸の検討も行なったが、これにおいても MT 過剰発現 NB4 細胞において若干の 50%有効濃度の上昇傾向が認められたが、統計学的に有意な差ではなかった (図 5)。

(3)なお、平成 26,27 年度は、前所属先である北里大学で行われた。医学部倫理委員会 (B 倫理 10-92、G 倫理 10-17) の承認のもと、当

初血液内科との共同研究を行い、AML 検体を収集する予定であったが、外来制限等の影響のためか、新規検体を得られなかった。平成 28 年度以降は現所属先である東北医科薬科大学で倫理申請を行い、臨床検体収集に向けて準備を行なったが、血液内科稼動前で AML 検体の入手が不可能であった。これらは本課題申請時 (平成 25 年度) には予想できなかったことであった。

また、Ara-C で認められた耐性に関してその分子メカニズムを明らかにすることを試みた。その結果、DNA 損傷修復に関わる ATM の

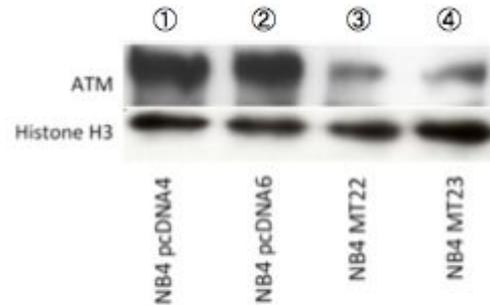


図6. ATM蛋白質発現量の検討

発現異常によることが明らかになった (図 6)。すなわち、MT により Ara-C 耐性メカニズムには、MT による ATM の発現異常が関与している可能性が、本研究により明らかになった。今後、これらのデータをまとめて論文発表の可能性を検討している。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者には下線) (\*Corresponding author)

【雑誌論文】(計 7 件)

【総説】

1. 高橋伸一郎\*

PU.1 標的遺伝子の同定による新たな骨髓球系細胞分化機構の解明、生化学、第 88 巻 2 号、p233-236, 2016.

2. Takahashi S\*

Positive and negative regulators of metallothionein gene (review), *Molecular Medicine Reports*, 12(1), p795-799, 2015.

【原著】

1. Houessinon A, François C, Sauzay C, Louandre C, Mongelard G, Godin C, Bodeau S, Takahashi S, Saidak Z, Gutierrez L,

Régimbeau JM, Barget N, Barbare JC, Ganne N, Chauffert B, Coriat R, Galmiche A. Metallothionein-1 as a biomarker of altered redox metabolism in hepatocellular carcinoma cells exposed to sorafenib. *Mol Cancer*. 15(1):38. doi: 10.1186/s12943-016-0526-2, 2016

2. Takahashi S\* and Shirahama K, Internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations in *FLT3* alter the response to daunorubicin in Ba/F3 cells, *Biomedical Reports*, 4(1), p83-86, 2016.

3. Hirako N, Nakano H and Takahashi S\*, A PU.1 suppressive target gene, metallothionein 1G, inhibits retinoic acid-induced NB4 cell differentiation, *PLOS ONE*, 9(7), e103282, 2014. (Global Medical Discovery 社の Key Scientific Article に選定される)

4. Nagashima R, Kawakami F, Takahashi S, Obata F and Kubo M, Allo-antigen stimulated CD8+ T cells Suppress NF- B and Ets-1 DNA Binding Activity, and Inhibit Phosphorylated NF- B p65 Nuclear Localization in CD4+ T cells, *Viral Immunology*, 27(6), p305-315, 2014.

5. Nakano H, Yanagita A and Takahashi S\*, The differentiation effect of low dose cytosine arabinoside is disturbed in PU.1-knockdown K562 cells, *Biomedical Reports*, 2(4), 564-568, 2014.

〔学会発表〕(計 11 件)

【招待講演】

1. 高橋伸一郎  
急性骨髄性白血病と遺伝子異常 (特別講演)  
第 7 回日本検査血液学会東北支部学術集会、盛岡、2017 年 5 月 27 日

2. 高橋伸一郎  
急性骨髄性白血病と遺伝子異常 ~ 遺伝子異常から分かる病態と未来 (教育講演)

第 49 回みやぎ医学検査学会、仙台、2017 年 7 月 15 日

【一般講演-国内】

1. 高橋伸一郎  
メタロチオネイン 1-G の過剰発現は全トランス型レチノイン酸による急性前骨髄球性白血病細胞分化を阻害する、日本検査血液学会、仙台、2014.7.20

2. 平子奈緒美、中野博子、高橋伸一郎  
急性前骨髄性白血病(NB4)細胞におけるメタロチオネイン 1G 過剰発現の細胞分化・ストレス反応への影響、日本分子生物学会 (横浜) 2014.11.26

3. 高橋伸一郎  
メタロチオネイン 1G 発現の顆粒球分化効率予測因子としての可能性、日本輸血・細胞治療学会 (東京) 2015.5.28

4. Takahashi S, Waki H, Nakano H,  
Downregulation of SIRP  $\alpha$ 1 results in the aberrant cell growth in low serum culture  
日本血液学会 (金沢) 2015.10.18

5. 高橋伸一郎  
好中球分化効率予測マーカーとしてのメタロチオネイン 1G の可能性、日本臨床検査医学会、岐阜、2015.11 月 21 日

6. 高橋伸一郎  
Signal regulatory protein (SIRP) $\alpha$ 1 発現抑制 K562 細胞は低血清培養で異常増殖を示す、日本輸血・細胞治療学会 (京都) 2016.4.29

7. 高淵優太郎、泉義彦、張替秀郎、高橋伸一郎、PU.1 標的遺伝子メタロチオネインの単球系分化における機能の解明、第 7 回日本検査血液学会東北支部学術集会 (盛岡) 2017.5.27

8. 高橋伸一郎、泉義彦 (シンポジウム II)  
東北医科薬科大学病院検査部の研究紹介、第 49 回日本臨床検査医学会東北支部総会、第 28 回日本臨床化学会東北支部総会 (秋田) 2017.7.29

9. Saito S, Yokoyama H, Meguro K, Hitomi H, Ohba Y, Izumi Y, Takahashi S Rapid diagnosis and prompt treatment of mixed phenotype acute leukemia after identifying a histogram abnormality of an automatic blood cell analyzer, (Received Poster Award), Cherry Blossom Symposium 2018, 2018.4.20

〔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.tohoku-mpu.ac.jp/medicine/about/kensa/>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者  
高橋 伸一郎 (TAKAHASHI, Shinichiro)  
東北医科薬科大学・医学部・教授  
研究者番号：40375069

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし