

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893264

研究課題名(和文) ATRAによる蛋白質アセチル化を介した白血病細胞分化誘導の分子基盤の解明

研究課題名(英文) The molecular mechanism that ATRA induces granulocytic differentiation in leukemic cells through the protein acetylation

研究代表者

角南 義孝 (SUNAMI, YOSHITAKA)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：50732864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：全トランスレチノイン酸(ATRA)は、急性前骨髄球性白血病(APL)細胞を分化誘導するが、その詳細な分子基盤はまだまだ明らかではない。ヒストンアセチル基転移酵素PCAFの過剰発現が、APL細胞株NB4細胞において好中球分化マーカーの発現を誘導したことから、PCAFがAPL細胞の分化誘導に必須であることが明らかとなった。またATRAは、白血病細胞を分化誘導する際にPCAF基質蛋白質をアセチル化し、さらにPCAFはATRA標的遺伝子の発現を制御した。以上の結果はATRAが、PCAFを介した基質蛋白質のアセチル化と下流遺伝子の発現制御によりAPL細胞を分化誘導していることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：All-trans retinoic acid (ATRA) induces granulocytic differentiation in acute promyelocytic leukemia (APL) cells, however, its detailed molecular mechanism remains unclear. Here, we showed that the overexpression of a histone acetyltransferase PCAF induced the expression of the granulocytic differentiation marker at the mRNA level, suggesting that PCAF is essential for APL cell differentiation. In addition, we found that ATRA acetylated the PCAF substrates while ATRA induced granulocytic differentiation in leukemic cells. Furthermore, PCAF regulated the downstream target gene expression of ATRA. These observations suggested that ATRA induced granulocytic differentiation in APL cells through the PCAF-induced protein acetylation and the PCAF-regulated downstream target gene expression.

研究分野：医師薬学

キーワード：PCAF 急性前骨髄球性白血病(APL) 全トランスレチノイン酸(ATRA) 分化誘導療法 ヒストンアセチル基転移酵素 蛋白質アセチル化

### 1. 研究開始当初の背景

急性前骨髄球性白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL) は急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia, AML) のひとつで、播種性血管内凝固症候群による出血により、以前は致死的な経過をたどることが多い疾患であった。しかし全トランスレチノイン酸 (all-trans retinoic acid, ATRA) による分化誘導療法の開発と臨床応用により、その治療成績は劇的に改善し、新たに APL と診断された患者の 5 年生存率は現在、80% を超えている (Huang ME, et al. Blood 1988; 72: 567-72; Asou N, et al. Blood 2007; 110: 59-66)。一方、臨床の場で ATRA が使用され始めてから、20 年近くが経過しているにも関わらず、ATRA の作用機序は不明な点が多く、特に ATRA が APL 細胞を分化誘導する際の詳細な分子メカニズムは、いまだ明らかとなっていない。そのため APL 以外の AML に対する応用はまだなされておらず、全ての AML に有効な分化誘導療法は、まだ確立されていない。

近年、大規模臨床試験の実施や遺伝子・染色体異常による適切な患者予後の層別化などにより AML の治療成績は向上してきているが、その治療は抗癌剤による化学療法が中心であり、特に予後良好の AML を除いて、抗癌剤治療のみで、完治を望むことは困難である。唯一、完治を目指す治療法は造血幹細胞移植であるが、治療強度が上がるため有害事象が多く、しばしば治療関連死も問題となる。またこれらの治療により AML が完治しても、移植後晩期合併症、二次性発がん、妊孕性の低下などにより生活の質 (Quality of Life, QOL) が著しく低下することがある。したがって有害事象が少なく、かつ完治を目指すことのできる分化誘導療法の開発は AML の治療において急務であるといえる。

我々はこれまでに、NAD 依存性ヒストン脱アセチル化酵素 SIRT2 の酵素活性阻害が APL 細胞株 NB4 細胞や AML 細胞株 HL-60 を好中球様細胞へ分化誘導することを明らかにした (Sunami Y, et al. PLOS ONE 2013; 8(2):e57633)。さらに、これを発展させ、ヒストンアセチル基転移酵素のひとつである PCAF の発現が、ATRA が白血病細胞株や APL 患者細胞を分化誘導することで亢進すること、PCAF の発現レベルが APL をはじめとする AML 細胞の分化レベルと相関することを発見した。また NB4 細胞や HL-60 細胞、そして APL 患者細胞において、PCAF の発現を低下させることで ATRA による分化誘導が阻害されることを見出し、ATRA による PCAF 発現誘導が、白血病細胞の分化誘導に必要であることを明らかにした。

以上を踏まえ、我々は SIRT2 や PCAF の基質蛋白質のアセチル化による機能制御が、APL のみならず全てのタイプの AML の分化誘導に強く関わっていることを予想し、ATRA が PCAF を介してアセチル化修飾する

基質蛋白質を同定し、その分化誘導における役割を明らかにすることを考えた。

### 2. 研究の目的

本研究は、ATRA が APL 細胞を分化誘導する際に、PCAF を介してアセチル化修飾する基質蛋白質を同定し、その役割を明らかにすることを目的としている。これにより、ATRA が蛋白質アセチル化を介して APL 細胞を分化誘導する分子メカニズムが明らかとなる。さらに本研究で同定されるアセチル化基質蛋白質を標的とする分化誘導療法を開発することで、APL のみならずすべてのタイプの AML に有効な新規分化誘導療法の開発につながることを期待される。

### 3. 研究の方法

本研究では、まず ATRA による APL 細胞の分化誘導に PCAF 発現亢進が必須であることを明らかにし、次に抗アセチル化リジン抗体を用いたアセチル化プロテオーム解析により ATRA が APL 細胞を分化誘導する際に、アセチル化する基質蛋白質を同定した。さらにこれまでに報告されている ATRA の標的遺伝子が、PCAF により制御されることを示し、ATRA が活性化している転写パスウェイに、PCAF が強く寄与していることを明らかにした。以下に具体的な方法を述べる。

エレクトロポレーションを用いて NB4 細胞内に PCAF を導入し、過剰発現させた。これらの細胞から経時的に RNA を抽出した後で、逆転写反応により cDNA を合成し、qPCR 法により好中球分化マーカーである CD11b 発現量の変化を評価した。

HL-60 細胞を ATRA 存在下で培養し、細胞を経時的に凍結保存した。ここから細胞抽出液を調製した後で、抗アセチル化リジン抗体でアセチル化蛋白質を精製、溶出後断片化し、質量分析器で解析を行った (アセチル化プロテオーム解析)。これにより、ATRA によりアセチル化される PCAF の基質蛋白質候補を同定し、さらに ATRA 処理後の PCAF の細胞内局在を検討することで PCAF 基質蛋白質候補の絞込みを行った。最後に、同定した基質蛋白質の、ATRA 処理後のアセチル化状態を、イムノプロット法を用いて評価した。

shRNA を用いて NB4 細胞内で PCAF をノックダウンし、セルソーターを用いて、ノックダウン細胞およびコントロール細胞を回収した後、ATRA 存在下で培養を行った。次に、これらの細胞から RNA を抽出し、逆転写反応による cDNA 合成後、既知の ATRA 標的遺伝子である CCL2 の発現を、qPCR 法を用いて評価した。

#### 4. 研究成果

##### 1) PCAF 発現亢進が APL 細胞の分化誘導に必須であることの証明

NB4 細胞内で PCAF を過剰発現したところ、好中球分化マーカーである CD11b の発現が mRNA レベルで亢進した (図 1)。これにより PCAF 発現の亢進が APL 細胞の分化誘導に必須であることを明らかにした。

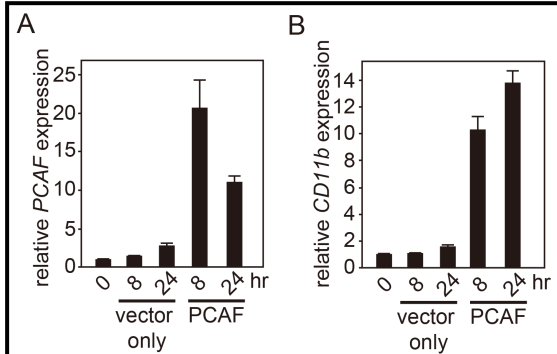


図 1 NB4 細胞内における PCAF 過剰発現後の好中球分化マーカー CD11b の発現 PCAF 発現を亢進させることで、CD11b の発現が mRNA レベルで亢進した。

##### 2) ATRA がアセチル化修飾をする基質蛋白質の同定

HL-60 細胞を ATRA 存在下で培養し、細胞を経時的に凍結保存し、これらを用いてアセチル化プロテオーム解析を行った。これにより ATRA によりアセチル化修飾を受ける、PCAF の基質蛋白質候補を複数、同定した。

次に PCAF の基質蛋白質候補の絞込みを行う目的で、ATRA 処理後の PCAF の細胞内局在を検討したところ、核分画でその発現が亢進していることを見出した (図 2)。以上から ATRA は PCAF を介して核蛋白質をアセチル化していることが示唆された。

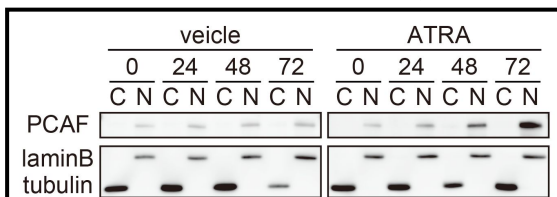


図 2 ATRA により発現が亢進する PCAF の細胞内局在

HL-60 細胞において、ATRA は核分画において、PCAF 発現を経時的に亢進させた。(C: 細胞質分画、N: 核分画)

次に、アセチル化プロテオーム解析で同定した PCAF 基質蛋白質候補のうち、核蛋白質で、かつこれまでに PCAF 基質として報告されているヒストン H3 を着目し、ATRA 処理後のアセチル化状態を評価した。ATRA 存在下で培養した HL-60 細胞から蛋白質を精製し、抗ヒストン H3 抗体で免疫沈降を行った後、抗アセチル化リジン抗体を用いてイムノプロットングを行った。この結果、ATRA

によりヒストン H3 のアセチル化状態が経時的に亢進することがわかった (図 3)。以上から ATRA は PCAF を介してヒストン H3 のアセチル化状態を亢進させ、白血病細胞を分化誘導している可能性が示唆された。

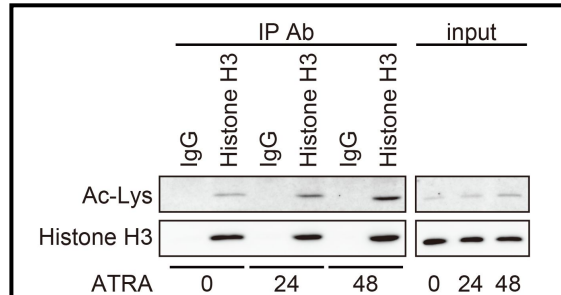


図 3 ATRA による PCAF を介したアセチル化蛋白質の同定。ATRA により、ヒストン H3 のアセチル化状態が経時的に亢進した。

##### 3) PCAF による ATRA 標的遺伝子の制御

これまでに ATRA 処理後の NB4 細胞と HL-60 細胞においてケモカインのひとつである CCL2 の発現が共通して亢進することが報告されている (Lee KH, et al. Biochem Biophys Res Commun 2002;296:1125-33)。そこで PCAF が ATRA 標的遺伝子である CCL2 の発現を制御するかを検討した。レンチウイルスベクターを用いて、NB4 細胞に PCAF に対する shRNA を発現させ、PCAF ノックダウン細胞とコントロール細胞を回収し、これらを ATRA 存在下で培養した。コントロール細胞に比べ、PCAF をノックダウン細胞においては、ATRA による PCAF 発現および CD11b 発現の誘導が阻害された (図 4A, B)。この時、ATRA 標的遺伝子である CCL2 の発現も PCAF ノックダウンにより抑制された (図 4C)。以上から、PCAF は ATRA 標的遺伝子である CCL2 の発現を制御しており、さらには PCAF が ATRA による転写活性化パスウェイにおいて下流の遺伝子発現を制御していることが明らかになった。

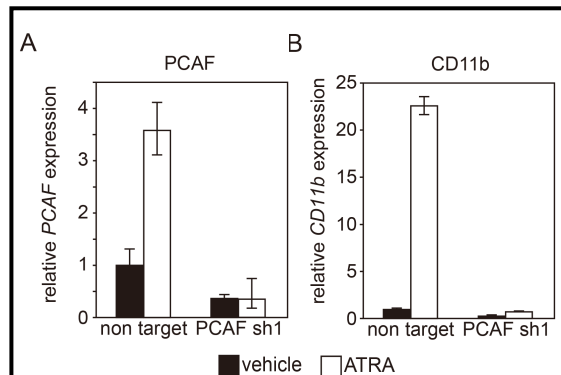


図 4 PCAF による ATRA 標的遺伝子の制御

PCAF をノックダウンした NB4 細胞では、ATRA による PCAF 発現誘導 (A) および好中球への分化誘導 (B) が阻害された。

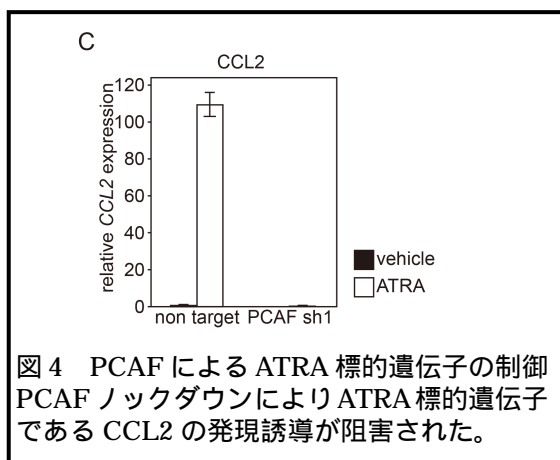


図4 PCAFによるATRA標的遺伝子の制御  
PCAFノックダウンによりATRA標的遺伝子  
であるCCL2の発現誘導が阻害された。

#### 4) 今後の展望

本研究では以下のことを明らかにした。

PCAF発現の亢進がAPL細胞の分化誘導に必須である。

ATRAが白血病細胞を分化誘導する際に、核内で、PCAF基質であるヒストンH3のアセチル化状態を亢進させる。

PCAFはATRA標的遺伝子であるCCL2の発現を制御しており、これはPCAFがATRAによる転写活性化パスウェイにおいて下流の遺伝子発現を制御していることを示唆している。

ATRAによる分化誘導に関わるPCAFのアセチル化基質蛋白質や、その下流のATRA標的遺伝子が、APLのみならずAMLの治療標的となる。したがって、これらのさらなる詳細な解析により、将来的には新たな分化誘導療法の開発につながると考えている。

#### 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 5件)

Morishita S, Takahashi K, Araki M, Hironaka Y, Sunami Y, Eda Hiro Y, Tsutsui M, Ohsaka A, Tsuneda S, and Komatsu N. Melting curve analysis after T allele enrichment (MelcaTle) as a highly sensitive and reliable method for detecting the JAK2V617F mutation. *PLoS ONE* **10**(3): e0122003 (2015) (査読あり)

Shirane S, Araki M, Morishita S, Eda Hiro Y, Takei H, Yoo Y, Choi M, Sunami Y, Hironaka Y, Noguchi M, Koike M, Sato E, Ohsaka A, and Komatsu N. Consequences of the JAK2V617F allele burden for the prediction of transformation into myelofibrosis from polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Int J Hematol* **101**(2): 148-53 (2014) (査読あり)

Shirane S, Araki M, Morishita S, Eda Hiro Y, Sunami Y, Hironaka Y, Noguchi M, Koike M, Ohsaka A, and Komatsu N. JAK2, CALR, and MPL mutation status in Japanese myeloproliferative neoplasms patients. *Haematologica* **100**(2): e46-8 (2014) (査読あり)

Takei H, Morishita S, Araki M, Eda Hiro Y, Sunami Y, Hironaka Y, Noda N, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Ohsaka A, and Komatsu N. Detection of MPLW515L/K mutations and determination of allele frequencies with a single-tube PCR assay. *PLoS ONE* **9**(8): e104958 (2014) (査読あり)

JAK2V617F mutation status and allele burden in classical Ph-negative myeloproliferative neoplasms in Japan. Eda Hiro Y, Morishita S, Takahashi K, Hironaka Y, Yahata Y, Sunami Y, Shirane S, Tsutsui M, Noguchi M, Koike M, Imai K, Noda N, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Ohsaka A, Araki M, and Komatsu N. *Int J Hematol* **99**(5): 625-34 (2014) (査読あり)

[学会発表](計 8件)

Sunami Y, Araki M, Pyanuch S, Shin K, Ito A, Hironaka Y, Ohsaka A, Yoshida M, Komatsu N. Isolation of all-trans retinoic acid-response element on PCAF promoter. 77<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Kanazawa, Japan, June 2015

Sunami Y, Araki M, Ito A, Hironaka Y, Ohsaka A, Yoshida M, Komatsu N. Involvement of histone acetyltransferases in development of acute promyelocytic leukemia and response to differentiation-inducing compound. 20<sup>th</sup> Congress of the European Hematology Association, Vienna, Austria, 2015

Sunami Y, Araki M, Ito A, Hironaka Y, Ohsaka A, Yoshida M, Komatsu N. Histone acetyltransferase PCAF is required for ATRA-induced granulocytic differentiation in acute promyelocytic leukemia cells. 56<sup>th</sup> Annual Meeting of the ASH, San Francisco, USA, 2014

Sunami Y, Araki M, Ito A, Hironaka Y, Ohsaka A, Yoshida M, Komatsu N. Histone acetyltransferase PCAF is required for ATRA-induced granulocytic differentiation in APL cells. 35<sup>th</sup> World Congress of the International Society of Hematology, Beijing, China, 2014

Sunami Y, Araki M, Ito A, Hironaka Y, Ohsaka A, Yoshida M, Komatsu N.

PCAF, a histone acetyltransferase, is required for ATRA-dependent granulocytic differentiation in APL cells. 5<sup>th</sup> Japanese Society of Hematology International Symposium, Hamamatsu, Japan, 2014

〔図書〕(計 1 件)

骨髄増殖性腫瘍の治療. 筒井深雪, 角南義孝, 小松 則夫. Bio Clinica, pp99-101 (2014), 北隆館.

〔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  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角南 義孝 (SUNAMI, Yoshitaka)  
順天堂大学・医学部・助教  
研究者番号: 50732864