

難治性白血病を基礎とした多段階発癌機構の解明
分担研究者 森下 和広 宮崎大学・医学部・教授

研究要旨

難治性急性骨髄性白血病(AML)の新規治療法の開発のため、網羅的遺伝子発現解析並びに統合的ゲノム解析を行い、白血病原因遺伝子の単離と分子標的遺伝子群の単離を行っている。とくに EVI1 高発現白血病は AML の10%を占め、かつ付随する monosomy 7 も原因不明な重要な難治性白血病である。今回この monosomy 7 の原因遺伝子をゲノム解析により単離し機能解析を行った。その結果 mono7 遺伝子産物は、CGRP 並びに、GM-CSFR 情報伝達系を負に制御する細胞内タンパク質である事が分かった。さらに EVI1 TG マウス由来幹細胞分画(HSC)に mono7 遺伝子 Knockdown(KD)させ、NOG マウス移植させると、それぞれの HSC を移植したマウスよりも寿命が遙かに短く白血病化した。このことから、EVI1 高発現と mono7 遺伝子 KD の組み合わせは難治性白血病の重要なステップである事がわかった。

A. 研究目的

難治性白血病はゲノム異常の蓄積が著しく、固形癌に近い複雑核型を示す。この難治性を凌駕する新規治療法の開発のためには、その原因となる遺伝子群を複数個同定する必要がある。我々は難治性急性骨髄性白血病に対する統合的ゲノム解析を行い、EVI1 高発現白血病に伴う 7 番染色体欠失に対して候補遺伝子群の単離を行なう。さらに、in vitro 並びに in vivo 実験により機能を解析し、白血病発症に及ぼす影響を明らかにし、その結果に基づいた疾患特異的診断治療法の開発につなげる。

B. 研究方法

染色体 3q26 並びに 7 番染色体異常を有する AML 患者検体 24 例、AML 細胞株 18 株を用いて SNP アレイ解析、網羅的遺伝子発現解析を行い、7 番染色体を中心としたゲノム解析、並びに遺伝子発現解析を行う。7 番染色体においてゲノム欠失領域から候補遺伝子として mono7 遺伝子を単離しており、その構造と情報伝達解析から GPCR 情報伝達系への関与を検討する。さらには、GM-CSF 情報伝達系への関与と細胞増殖能、造血幹細胞 (HSC) を用いて knockdown(KD)並びに過剰発現による replating assay、遺伝子発現解析、ならびに機能解析を行う。さらに EVI1 TG マウスの作製、mono7 遺伝子欠損マウスを作製し、その掛け合わせによる白血病発症機構の解明を行う。EVI1TG マウスの HSC に mono7 遺伝子 KD を導入し、NOG 免疫不全マウスへの移植実験により白血病化の検討を進める。

(倫理面への配慮)

患者検体の使用に関しては、宮崎大学医学部医の倫理審査会の承認(承認番号 606、540)をうけ、同意(インフォームドコンセント)の上で使用を行っている。実験動物に関しては宮崎大学動物実験委員会の承認(2009-520、2009-515-2)を受け使用を行っている。利益相反に関しては、宮崎大学利益相反委員会適切に処理されている。

C. 研究結果

3q26 染色体異常に伴う EVI1 転写因子の発現亢進に加えて、mosomy7 の合併率が高く、どちらの異常があっても 5 年生存率が 10%を下回る難治性白血病である。Mono7 遺伝子発現は、7 番染色体異常を有する白血病細胞株、ならびに患者検体において発現低下が見られ、さらにこの発現低下には haploinsufficiency と共に、プロモーターメチル化等のエピゲノム異常が伴うことが分かった。さらにこの mono7 遺伝子は GPCR 情報伝達系を負に制御することが構造上で考えられるため、EVI1 高発現白血病においてその候補レセプターを網羅的遺伝子発現解析により探索し、Calcitonin receptor like receptor (CRLR)を同定した。さらに、このリガンドが CGRP であることも判り、mono7 遺伝子 KD により、CGRP 刺激による cAMP の上昇、下流の CREB リン酸化亢進が細胞増殖能の活性化に繋がることが示唆された。さらに mono7 KD 実験により、GM-CSFR の細胞内タンパク質半減期が有意に延長し、GM-CSF 非依存的細胞増殖能を獲得した。In vivo 実験において EVI1 TG マウスを作製、同時に conditional mono7 遺伝子欠損マウスを作製した。EVI1TG マウス HSC に対して mono7 KD レンチウイルスを感染させ、NOG 免疫不全マウスに移植したところ、それぞれ別に移植したマウスよりも生存期間が有意に短縮し、白血病化したことから、EVI1 高発現と mono7 遺伝子発現低下の二つの組み合わせは相乗的に白血病発症に関わると考えられる。

D. 考察

EVI1 高発現に伴う monosomy7 のゲノム解析から候補がん抑制遺伝子候補として mono7 を同定した。これまでの結果から、EVI1 高発現により幹細胞維持、分化阻害などに影響するが、mono7 遺伝子異常は明らかに細胞増殖能の亢進が見られる。志賀立ってこの両者の異常の組み合わせは、所謂白血病発症の二段階説にマッチしており、確証を得るためにはさらなる検討が必要と考えられる。

E. 結論

EVII 難治性白血病に加わる monosomy7 の原因遺伝子探索とその機能解析を行った。EVII そのものの異常は白血病幹細胞維持に重要な役割を有し、細胞増殖には余り影響がないが、monosomy 7 が加わることで、細胞増殖に大きな役割を有することが判り、それが難治性を示す大きな原因となることが示唆された。今後この機構をさらに検討し、治療対策へと繋げる必要がある。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakahata S, Ichikawa T, Maneesaay P, Saito Y, Nagai K, Tamura T, Manachai N, Yamakawa N, Hamasaki M, Kitabayashi I, Arai Y, Kanai Y, Taki T, Abe T, Kiyonari H, Shimoda K, Ohshima K, Horii A, Shima H, Taniwaki M, Yamaguchi R, Morishita K.: Loss of NDRG2 expression activates PI3K-AKT signalling via PTEN phosphorylation in ATLL and other cancers *Nature Comm.* 2014 5:3393.
- 2) Kai H, Akamatsu E, Torii E, Ko-dama H, Yukizaki C, Akagi I, Ino H, Sakakibara Y, Suiko M, Yamamoto I, Okayama A, Morishita K, Kataoka H, Matsuno K.: Identification of a bioactive compound against adult T-cell leukemia from bitter melon seeds. *Plants* 2014 3:18-26.
- 3) Yamamura A, Miura K, Karasawa H, Morishita K, Abe K, Mizuguchi Y, Saiki Y, Fukushige S, Kaneko N, Sase T, Nagase H, Sunamura M, Motoi F, Egawa S, Shibata C, Unno M, Sasaki I, Horii A.: Suppressed expression of NDRG2 correlates with poor prognosis in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 441:102-7.
- 4) Ikebe E, Kawaguchi A, Tezuka K, Taguchi S, Hirose S, Matsumoto T, Mitsui T, Senba K, Nishizono A, Hori M, Hasegawa H, Yamada Y, Ueno T, Tanaka Y, Sawa H, Hall W, Minami Y, Jeang KT, Ogata M, Morishita K, Hasegawa H, Fujisawa J, Iha H.: Oral administration of an HSP90 inhibitor, 17-DMAG, intervenes tumor-cell infiltration into multiple organs and improves survival period for ATLL model mice. *Blood Cancer J.* 2013 3:e132.
- 5) Sugie S, Mukai S, Tsukino H, Toda Y, Yamauchi T, Nishikata I, Kuroda Y, Morishita K, Kamoto T.: Increased plasma caveolin-1 levels are associated with progression of prostate cancer among Japanese men. *Anticancer Res.* 2013 33:1893-7.
- 6) Yamasaki M, Mine Y, Nishimura M, Fujita S, Sakakibara Y, Suiko M, Morishita K, Nishiyama K.:

Genistein induces apoptotic cell death associated with inhibition of the NF- κ B pathway in adult T-cell leukemia cells. *Cell Biol Int.* 2013 37:742-7.

- 7) Saito Y, Kaneda K, Suekane A, Ichihara E, Nakahata S, Yamakawa N, Nagai K, Mizuno N, Kogawa K, Miura I, Itoh H, Morishita K.: Maintenance of the hematopoietic stem cell pool in bone marrow niches by EVII-regulated GPR56. *Leukemia.* 2013 27:1637-49.
2. 学会発表
 - 1) Kaneda K, Morishita K.: Integrin A6 as a special marker of refractory leukemia is important for maintaining of leukemia stem cells. The 11th Stem Cell Research Symposium. (第 11 回幹細胞シンポジウム) 文京区. 2013.5.17
 - 2) Nakahata S, Morishita K.: 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. CANADA (Montreal). 2013.6.26-30
 - 3) 市川朝永、中畑新吾、森下和広：がん抑制遺伝子 NDRG2 による HTLV-1/Tax 誘導性 NF κ B 活性抑制機構の解析. 第 34 回日本炎症・再生医学会. 京都. 2013.7.2
 - 4) 市川朝永、中畑新吾、藤井雅寛、伊波英克、森下和広：NDRG2 は PP2A リクルーターとして PTEN 及び NIK 活性調節に関わる. 第 6 回 HTLV-1 研究会・シンポジウム. 港区. 2013.8.25
 - 5) 中武彩子、小林行治、西片一朗、中畑新吾、岩永正子、相良康子、北中明、天野正宏、前田宏一、末岡榮三朗、瀬戸口充、岡山昭彦、宇都宮與、下田和哉、渡邊俊樹、森下和広：血中可溶性 CADM1/TSLC1 測定による ATL 診断法の開発. 第 6 回 HTLV-1 研究会・シンポジウム. 港区. 2013.8.25
 - 6) 西片一朗、市川朝永、中畑新吾、藤井雅寛、伊波英克、白神俊幸、田中勇悦、森下和広：ATL 細胞における CADM1 高発現は HTLV-1 Tax を含む NF- κ B 活性化に依存する. 第 6 回 HTLV-1 研究会・シンポジウム. 港区. 2013.8.24-25 (ポスター)
 - 7) 市川朝永、田村知丈、中畑新吾、迫田隅男、森下和広：がん抑制遺伝子 NDRG2 欠損マウスによる 4-NQO 誘導性口腔がん発症機構の解析. 第 86 回日本生化学会大会. 横浜. 2013.9.11
 - 8) 市川朝永、田村知丈、中畑新吾、迫田隅男、森下和広：がん抑制遺伝子 NDRG2 欠損マウスによる 4-NQO 誘導性口腔がん発症機構の解析. 第 86 回日本生化学会大会. 横浜. 2013.9.11 (ポスター)
 - 9) 兼田(中島)加珠子、井川香織、太田智美、岡本朝久、帖佐悦男、迫田隅男、森下和広：MEL/1PR DM16 による骨分化制御機構の解明. 第 86 回日本生化学会大会. 横浜. 2013.9.12 (ポスター)
 - 10) Nakahata S, Ichikawa T, Saito Y, Arai Y, Taki T, Taniwaki M, Morishita K : NDRG2 inactivation in cancer cells leads to activation of the P13 K/AKT pathway via sustained phosphorylation of PTEN. 72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 横浜. 2013.10.3 (ポスター)

- 中畑新吾、市川朝永、齋藤祐介、新井康仁、滝智彦、谷脇雅史、森下和広：癌細胞におけるDNRG2の不活性化はPTENの恒常的なリン酸化を促し、P13/AKT経路の活性化を引き起こす。第72回日本癌学会学術総会。横浜。2013.10.3 (ポスター)
- 11) Ichikawa T, Nakahata S, Tamura T, Sakoda S, Morishita K : Molecular mechanisms of 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO)-induced oral carcinogenesis in NDRG2-deficient mice. 72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 横浜 2013.10.5
市川朝永、中畑新吾、田村知丈、迫田隅男、森下和広：がん抑制遺伝子 NDRG2 欠損マウスにおける 4-NQO 誘導性口腔がん発症機構の解析。第 72 回日本癌学会学術総会。横浜。2013.10.5
- 12) Nagai K, Nakahata S, Ichikawa T, Meda K, Utsunomiya A, Kanai Y, Sueoka E, Morishita K : DNA methylation profiles of various types of ATLL associated with development of ATLL. 72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 横浜。2013.10.5 (ポスター)
長井健太郎、中畑新吾、市川朝永、前田宏一、宇都宮與、金井弥栄、末岡榮三朗、森下和広：ATLL の DNA メチル化は ATLL の発症に関連する。第 72 回日本癌学会学術総会。横浜。2013.10.5 (ポスター)
- 13) Kaneda K, Suekane A, Saito Y, Yamakawa N, Kurosawa J, Morishita K : Investigation of therapeutic efficacy of neutralizing antibody of integrin for AML. 72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 横浜。2013.10.5 (ポスター)
兼田(中島)加珠子、末金彰、齋藤祐介、山川哲生、黒澤仁、森下和広：AML に対するインテグリン中和抗体の治療効果に関する検討。第 72 回日本癌学会学術総会。横浜。2013.10.5 (ポスター)
- 14) Yamamoto H, Yokoyama K, Lu J, Oba S, Kawamura T, Yoshimi A, Morishita K, Kurokawa M, Koutani A : Identification of miRNA targeting Evi 1. 第 75 回日本血液学会学術集会。札幌。2013.10. (ポスター)
- 15) Kaneda K, Suekane A, Yamakawa N, Saito Y, Morishita K : Survival and drug resistance of LSCs Cell by integrin alpha 6 in EVI1^{high} AML. 第 75 回日本血液学会学術集会。札幌。2013.10. (ポスター)
- 16) Nakahata S, Ichikawa T, Saito Y, Arai Y, Taki T, Taniwaki M, Morishita K. : Down-regulation of NDRG2 induces activation of the P13K pathway through PTEN inactivation in ATL. 第 75 回日本血液学会学術集会。札幌。2013.10. (ポスター)
- 17) 兼田(中島)加珠子、末金彰、齋藤祐介、森下和広：GPR56 は白血病幹細胞の新規治療標的である。第 36 回日本分子生物学会年会。神戸。2013.12.3 (ポスター)
- 18) 兼田(中島)加珠子、井川加織、太田智美、黒木修司、関本朝久、帖佐悦男、迫田隅男、森下和広：骨軟骨分化制御における MEL1/PRDM16 の機能解析。第 36 回日本分子生物学会年会。神戸。2013.12.3 (ポスター)
- 19) 伊波英克、池辺詠美、川口晶、手塚健太、田口慎也、廣瀬仁志、西園晃、堀光雄、長谷川寛雄、山田恭暉、上野孝治、田中勇悦、澤洋文、Hall William W、南康文、Jeang Kuan-Teh、緒方正雄、森下和広、長谷川秀樹、藤澤順一：Oral administration of an HSP90 inhibitor, 17-DMAG, intervenes tumor-cell infiltration into multiple organs and improves survival period for ATL model mice. 第 36 回日本分子生物学会年会。神戸。2013.12.5 (ポスター)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし