

白血病の腫瘍生物学的分子機構解明と最適化分子標的治療法の開発

## 《研究概要》

白血病は増殖や細胞死の抑制に関与するクラス I 遺伝子、および腫瘍細胞の分化を調節するクラス II 遺伝子に変異が生じて発症すると考えられる。このため、白血病治療に際してはこれらの遺伝子異常を解析したうえで治療戦略を立てることが必須である。そこで今回の研究では白血病の病因、および治療に関係する遺伝子について統合的に解析した。①成人急性骨髄性白血病は予後不良で造血幹細胞移植以外に有効な治療法が確立していない。そこで、急性巨核芽球性白血病細胞と細胞外マトリックスとの相互作用を分化の観点から捉えることを試みた。巨核芽球性白血病は巨核球・赤芽球前駆細胞から発症すると考えられるが、インテグリンを介する刺激が遺伝子発現変化を誘導し巨核芽球への分化を促進し、逆に、インテグリン刺激が消失すると赤芽球へと形質転換することが示された。この形質転換には転写因子 FLI1, RUNX1, GFI1 が関与していた。②骨髄異形性症候群はしばしば急性白血病に移行するにも係わらずその分子病態は不明な点が多い難治性の疾患である。これまでは MDS に関する有用な実験系がなかったが、今回、変異型 AML1 遺伝子を用いて MDS の実験モデル系の作成に成功した。さらに、MDS から AML へと高頻度に移行する群では Evi1 の発現が高く、AML1 と Evi1 の協同で白血化が生じることが判明した。また、MDS/AML 患者 cDNA ライブラリーより AML への進展に関与する遺伝子を探索した結果、RasGRP4, FLT3-ITD を同定した。③白血病ではクラス II 遺伝子群が重要な働きを担っている。転写の調節にはヒストン・アセチル化の制御が重要であるが白血病に関するヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の研究は十分とはいえない。HDAC の正常造血細胞および白血病細胞における発現動態を検討すると、正常細胞では分化により発現が変動するが、白血病細胞では例外なく HDAC1 の強発現が見られ、この異常発現が白血病発症に関与していることが示唆された。HDAC1 の発現調節に白血病発症と関連している転写因子が複数関与していることが明らかになった。また、HDAC1 を遺伝学的に発現調節すると正常前駆細胞および成熟細胞の増殖・分化に影響が及ぶことが明らかとなった。④小児白血病においては副腎皮質ステロイド剤が重要な治療薬であるが、その白血病に対する抗腫瘍機構は十分には解析されていない。そこで、小児 Pre-B-ALL 患者のステロイド治療における遺伝子発現変化を検討すると、DNA 合成に関連する遺伝子群とともに、B 細胞受容体に関連した遺伝子発現が強く抑制されることが判明した。小児 pre-B-ALL の増殖・生存に関しては B 細胞受容体が重要な役割を担っていると考えられた。これらの研究成果は今後の白血病治療の標的分子を考える上で示唆に富む結果と考えられる。

共同研究者

北村 俊雄 東京大学医科学研究所

先端医療研究センター 教授

古川 雄祐 自治医科大学

分子病態治療研究センター 教授

山田 尚 東京慈恵会医科大学

DNA 医学研究所 教授

## 研究報告

巨核芽球性白血病の分化機構解明と miRNA の変動（担当：山田 順子）

### I 研究目的

巨核芽球性白血病は成人急性白血病の中では予後不良な疾患として知られている。しかし、ダウン症候群の巨核芽球性白血病とは異なり、その病態が十分に解明されているとはいえない。一般に巨核芽球性白血病は巨核芽球と赤芽球に共通な前駆細胞から発症すると考えられるが、白血化や分化のシフトに関する分子機構の詳細は不明である。

白血病細胞株 JAS-R は新規に樹立された巨核芽球性白血病由来の細胞株であり、巨核芽球性格と伴に赤芽球性格を持つ。BCR-ABL などの既知の染色体異常は認められず、巨核芽球性白血病の研究には有用な細胞株と考えられる。そこで、本研究では JAS-R を用いて、巨核芽球性白血病の白血化と巨核芽球と赤芽球の分化のシフトに関する分子機構を明らかにすることにした。

### II 研究計画および材料と方法

#### 1. JAS-R の巨核芽球性白血病細胞としての特徴。

巨核芽球性白血病由来の細胞株として、CMK および MEG-O1 をもちいた。また、赤芽球性格を持つ細胞株として K562 および KU812 を用いた。細胞性格は FACS による細胞表面抗原の解析、マイクロアレイによる遺伝子発現解析、および RT-PCR を用いた遺伝子発現パターンの比較検討を行った。

#### 2. JAS-R より巨核芽球性白血病細胞と赤芽球性白血病細胞の分離

JAS-R 細胞の接着性の相違による細胞形質変化を誘導し、上記 1 の方法に従って細胞性格を決定した。

#### 3. 細胞外マトリックスとの相互作用に伴う形質転換の誘導

赤芽球性格を有する分離細胞に細胞外マトリックス刺激を加えることで巨核芽球への形質転換が可能かを上記1の方法で検討する。

#### 4. 巨核芽球への分化誘導と遺伝子発現変化

赤芽球性格を有する分離細胞を分化誘導剤で処理し、その過程での遺伝子発現変化およびmiRNAの発現変化を検討した。

### III 研究成果

1) JAS-R を代表的な巨核芽球性白血病細胞株および赤芽球性白血病細胞株と比較検討を行った。マイクロアレイによる遺伝子発現解析の結果、MEG-O1 と CMK は近似のクラスターを形成し、K562 と KU812 もクラスターを形成したが JAS-R はそれらのいずれとも属さなかった。また、JAS-R は強く巨核芽球系に分化しているが、赤芽球様の形質も有することが判明した。興味あることに、JAS-R ではエリスロポエチンの産生が認められ、抗エリスロポエチン中和抗体を用いると、その増殖が部分的に抑制されることが判明した。

2) JAS-R は巨核芽球系と赤芽球系の両形質が認められることより、両系統の細胞に分離できるかどうかを検討した。JAS-R の付着性に注目して、浮遊している細胞(JAS-REN)と付着している細胞(JAS-RAD)に分離した。両細胞群を用いて、マイクロアレイによる発現解析を行うと JAS-RAD は巨核芽球性の性格を有し、JAS-REN は逆に赤芽球系の形質を示した。また、転写因子で検討すると、JAS-RAD では FLI1, RUNX1, GFI1 が高値であるが JAS-REN ではこれらの発現は抑制されていた。GATA1, Pu.1, NFE2, EKLf は両群で変化がなかった。興味あることに、これらの細胞群は同様の操作を繰り返すことによって浮遊細胞から付着細胞へ、付着細胞から浮遊細胞へと相互に形質の転換が起こることが判明した。どのような細胞外マトリックスに対して JAS-R 細胞が付着しやすいかを検討したところ JAS-R 細胞はフィブロネクチンに最も強く付着した。そこで、JAS-REN 細胞を GRDS ペプチドで刺激し形質変化を検討した。対照として、K562 細胞を巨核芽球へ分化誘導することが知られている TPA を用いた。刺激した JAS-REN 細胞を 48 時間後に FACS で解析すると RGDS 刺激ではほとんど変化ないが遺伝子発現変化では明らかに巨核芽球への変化が認められた。

miRNA の変動では巨核芽球への分化に伴って、miR31, miR7058(Ambion), miR8488(Ambion)が抑制されることが判明した。

これらのことは JAS-R 細胞においてはマトリックスたんぱく質との接着が刺激となり分化の方向にシフトが生じることをしめしている。

### IV 考察

腫瘍細胞の増殖には増殖環境が重要な働きをなすことが知られている。正常血液幹細胞においても骨髓微小環境は幹細胞性格の維持や分化の方向決定に重要な働きをしていることが知られている。しかし、白血病細胞においては微小環境に対する検討はほとんどなされてこなかった。今回の研究で、白血病細胞においてもマトリックスからの刺激が遺伝子発現変化につながり、細胞の形質転換につながることを判明した。巨核球と赤芽球の分化シフトに関し、FLI1, RUNX1, GFI1 の発現が巨核球分化には重要であることが推察されたが、赤芽球への分化から考えるとこれらの遺伝子の抑制が重要な引き金かもしれない。

興味あることに、JAS-RAD では Epo の産生が見られるが JAS-REN ではその発現がなく、細胞は Epo に部分的に依存して増殖をしている。また、JAS-RAD では MDR1 や CD34 の発現が亢進しており、今後は白血病幹細胞や薬物耐性に関してマトリックスたんぱく質との相互作用の観点からも研究する必要があると考える。

## V 研究成果の発表

- 1 Junko Horiguchi-Yamada, Satsuki Iwase, Takeshi Kawano and Hisashi Yamada. Pretreatment of interferon- $\alpha$  radiosensitizes Daudi cells with modulating gene expression and biomarkers. *Anticancer Res* 2005;25(4):2631-8.
- 2 Suzuki H, Arakawa Y, Ito M, Yamada H, Horiguchi-Yamada J. Cloning of a newly identified heart-specific troponin I isoform, which lacks troponin T binding portion, using the yeast two hybrid system. *Experimental & Clinical Cardiology* 11,4-7, 2006.
- 3 Sekikawa T, Iwase S, Saito S, Arakawa Y, Agawa M, Horiguchi-Yamada J, Yamada H. JAS-R, a new megakaryo-erythroid leukemic cell line that secretes erythropoietin. *Anticancer Res.* 2006;26(2A):843-50.
- 4 Yamada H, Arakawa Y, Saito S, Agawa M, Kano Y, Horiguchi-Yamada J. Depsipeptide-resistant KU812 cells show reversible P-glycoprotein expression, hyper-acetylated histones, and modulated gene expression profile. *Leuk Res.* 2006;30(6):723-34.
- 5 Sekikawa T, Takahara S, Suzuki H, Takeda N, Yamada H, Horiguchi-Yamada J. Diffuse large B-cell lymphoma arising independently to lymphoplasmacytic lymphoma: a case of two lymphomas. *Eur J Haematol.* 2007;78(3):264-9.
- 6 Hideaki Suzuki, Yasuhiro Arakawa, Masaki Ito, Shinobu Saito, Nobuakira Takeda, Hisashi Yamada, and Junko Horiguchi-Yamada. MLF1-interacting protein is mainly localized in nucleolus through N-terminal bipartite nuclear localization signal. *Anticancer Res.*2007;27:1423-1430.
- 7 Hisashi Yamada, Tetsuaki Sekikawa, Satsuki Iwase, Yasuhiro Arakawa, Hideaki Suzuki, Miyuki Agawa, Masaharu Akiyama, Nobuakira Takeda, and Junko Horiguchi-Yamada. Segregation of megakaryocytic or erythroid cells from a megakaryocytic leukemia cell line (JAS-R) by adhesion during culture. *Leukemia Res.* 2007; 31(11):1537-43.
- 8 Hisashi Yamada, Tetsuaki Sekikawa, Miyuki Agawa, Satsuki Iwase, Hideaki Suzuki and Junko Horiguchi-Yamada. Adhesion to Fibronectin Induces Megakaryocytic Differentiation of JAS-REN Cells. *Anticancer Res.*2008;28:261-266

白血病の病因に関与する新規遺伝子の探索 (担当: 北村 俊雄)

## I 研究目的

大腸がんをはじめとするさまざまな固形がんについては、細胞の癌化には複数のステッ

プが関与していることが知られている（多段階発がん）。一方、造血器腫瘍では Bcr-Abl、PML-RAR $\alpha$  など染色体転座による疾患特異的な融合遺伝子産物が、発症の原因であると考えられてきた。しかしながら最近になって、白血病も2つ以上の遺伝子変異が重なってはじめて発症することが徐々に認識されつつある。これらの遺伝子変異は細胞死抑制あるいは増殖誘導に関与するクラス1変異と細胞分化関連遺伝子のクラス2変異に分類される。最近、骨髄増殖性疾患（MPD）患者細胞の多くでクラス1変異に分類される JAK2 や JAK3 の活性化型変異が、また骨髄異形成症候群（MDS）の患者細胞 15-30%においてクラス2変異に分類される転写因子 AML1 の優性抑制型変異が報告され注目された。

MDS は難治性の血液疾患であり、しばしば白血病に進展する。MDS はその疾患の不均一性や動物モデルの欠如もあり、病態の解析が遅れていた。本研究の目的は最近同定された AML1 の優性抑制型転写因子を利用して、MDS モデルマウスを樹立し、MDS の病態解析、MDS 発症の分子メカニズム、白血病進展に関与するセカンドヒットの同定を目指すことである。

## II 研究計画、材料と方法

MDS 患者由来変異型 AML1 をレトロウイルスベクターによって骨髄細胞に導入し、照射した同系マウスに移植することによって MDS モデルマウスを樹立する。このマウスモデルを解析することによって MDS の発症機構と白血病への進展機構を調べる。また、MDS から白血病に進展した患者白血病細胞の cDNA ライブラリーを作成し、発現クローニングによって白血病への進展に関与するクラス1遺伝子変異の候補を同定する。さらに同定したクラス1変異候補遺伝子の vivo での白血病誘導能を調べるために、単独あるいは AML1 遺伝子変異と組み合わせて移植実験を行う。

## III 研究成果

### 1) 変異型 AML1 による MDS モデルマウス

変異型転写因子 AML1 をレトロウイルスベクターで導入した骨髄細胞を移植したマウスは MDS 様症候を呈し、一部のマウスは白血病に移行することを確認した。

DNA 結合ドメインに変異を有する変異体 AML1-D171N を発現した骨髄細胞を移植したマウスのうち、形態異常の強い末梢血白血球増多に肝脾腫を伴って白血病に進展する一群のマウスでは、レトロウイルスの挿入による Evi1 高発現が認められた。これらのマウスの白血病細胞は B220 陽性/Mac1 陽性という均一の特徴的な表現型を示した。Evi1 と AML1-D171N を同時に発現させた骨髄細胞を移植したマウスは全例一ヶ月以内に白血病発症を発症した。これらの結果は Evi1 と AML1-D171N が協同して白血病発症を誘導することを示唆している。別の変異体 AML1-S291fs を過剰発現させた骨髄細胞を移植したマウスは、骨髄は正形成から過形成であり末梢血は異形成を伴う白血球減少が認められるという典型的な MDS 症候を呈したが、白血病には進展しなかった。

### 2) MDS から白血病への進展に関与する遺伝子変異の同定の試み

マウス MDS モデルの結果は、クラス2遺伝子変異である変異型 AML1 の過剰発現が MDS 様症状を誘導すること、長い潜伏期間を経て白血病に進展することを示した。そこで白血病進展の原因となる遺伝子変異を、発現クローニング法によって患者白血病細胞から同定することを試みた。

MDS/AML を中心として 7 例から患者細胞由来 cDNA ライブラリーを作成し、MLL-Spt6 融合蛋白質（クラス 2 変異）で不死化した IL-3 依存性細胞株 HF6 に自律増殖能を賦与しうる遺伝子を捜した。3 症例から RasGRP4、1 症例から FLT3-ITD を同定した。RasGRP4 はオンコジーン Ras を活性化する分子として知られているが、同定した患者白血病由来 RasGRP4 に有意な変異あるいは SNP は認められなかった。

### 3) 発現クローニング法で同定した RasGRP4 を利用した BMT モデル

レトロウイルスベクターで RasGRP4 を発現させたマウス骨髄細胞を致死量照射したマウスに移植したところ、8 匹中 2 匹は T 細胞腫瘍、2 匹は AML、4 匹は T 細胞腫瘍と AML の両方を発症した。AML を発症したマウスは 2 ヶ月以内に死亡したのに対して、T 細胞腫瘍を発症したマウスは 8-9 ヶ月で死亡した。RasGRP4 は Ras を活性化するので、RasGRP4 の過剰発現はクラス 1 遺伝子変異であるといえる。そこで RasGRP4 過剰発現とクラス 2 遺伝子変異である変異型 AML1 が共同して白血病の発症を促進するか調べるために、RasGRP4 および AML1-S291fs を共に導入した骨髄細胞を移植した。興味深いことに、RasGRP4 による AML 発症は AML1-S291fs によって発症が早くなることはなかったが、T 細胞腫瘍の発症は有意に早くなった。

## IV 考察

レトロウイルスベクターで AML1 優性抑制型変異体を過剰発現した骨髄細胞を移植することによって MDS モデルマウスを樹立した。これらの MDS モデルマウスなかには白血病に進展する例が少なからず存在した。我々はウイルスベクターの挿入部位の同定を通じて Evi-1 が MDS の白血病への進展において重要な働きをすることを見いだした。また、in vitro において MLL 融合蛋白質（クラス 2 変異）により不死化した細胞株 HF6 はその増殖に IL-3 を要求する。HF6 の自律増殖性を誘導する遺伝子を白血病、MDS/AML および MPD 患者細胞由来 cDNA ライブラリーから捜すことにより、FLT3-ITD および RasGRP4 を同定した。これらの研究を通じて、白血病への進展に関与するさまざまなクラス 1 変異を同定することができれば、MDS/AML の病態解析、さらには治療に役立つと考えられる。

一方、同じ AML1 の変異でも変異の種類によって病型や AML への進展が異なることが明らかになった。今後、AML1 以外の遺伝子変異で MDS を発症する種々の MDS モデルマウスを作成することにより、MDS を分子レベルで分類し、それぞれの病型に対して適切な治療法を選択することが可能になるのではないかと考えている。

## V 研究成果の発表

1. Ono, R., Nakajima, H., Ozaki, K., Kumagai, H., Kawashima, T., Taki, T., Kitamura, T., Hayashi, Y., and Nosaka, T. (2005) Dimerization of MLL fusion proteins and FLT3 activation synergize to induce multiple lineage leukemogenesis. *J. Clin. Invest.* 115:919-929.
2. Ono, R., Ihara, M., Nakajima, H., Ozaki, K., Kataoka-Fujiwara, Y., Taki, T., Nagata, K., Inagaki, M., Yoshida, N., Kitamura, T., Hayashi, Y., Kinoshita, M., and Nosaka, T. (2005) Disruption of Sept6, a fusion partner gene of Mixed Lineage Leukemia (MLL), does not affect the ontogeny, leukemogenesis induced by

- MLL-SEPT6, or the phenotype induced by the loss of Sept4. *Mol. Cell. Biol.* 25: 10965-10978.
3. Nakajima, H., Shibata, F., Kumagai, H., Shimoda, K., and Kitamura, T. (2006) Tyk2 is dispensable for induction of myeloproliferative disease by mutant FLT3. *Int. J. Hematol.* 84:54-59.
  4. Kawashima, T., Bao, Y.C., Nomura, Y., Moon, Y., Tonozuka, Y., Minoshima, Y., Hatori, T., Kiyono, M., Nosaka, T., Nakajima, H., Williams, D.A., and Kitamura, T. (2006) Rac1 and a GTPase activating protein MgcRacGAP are required for nuclear translocation of STAT transcription factors. *J. Cell Biol.* 175: 937-946.
  5. Lu, Y., Kitaura, J., Oki, T., Komeno, Y., Ozaki, K., Kiyono, M., Kumagai, H., Nakajima, H., Aburatani, H. and Kitamura, T. (2007) Identification of TSC-22 as a potential tumor suppressor that is upregulated by Flt3-D835V but not Flt3-ITD. *Leukemia* 21:2246-2257.
  6. Watanabe-Okochi, N, Kitaura, J., Ono, R., Harada, H., Harada, Y., Nakajima, H., Nosaka, T., Inaba, T., and Kitamura, T. (2008) AML1 mutations induced MDS and MDS/AML in a mouse BMT model. *Blood* 111: 4297-4308.
  7. Kitamura, T., Oki, T., Watanabe-Okochi, N., Komeno, Y., Kato, N., Yuji, K., Ono, R., Nakajima, H., Tojo, A., Nosaka, T. and Kitaura, J. Identification of leukemia-related gene alterations: Molecular pathogenesis of leukemia, myeloproliferative disorders (MPD), and myelodysplastic syndromes (MDS). *Blood Cells, Molecules and Diseases* in press.
- 1) Kitamura, T. (2007年3月) Learning from model mice for myelodysplastic syndromes (MDS) and MDS/overt leukemia. 日米血液腫瘍セミナー、招待講演
  - 2) 小埜良一、北村俊雄、野阪哲哉 (演者) . (2007年3月) MLL融合蛋白による多段階発癌におけるRaf-MAPキナーゼ系活性化の重要性. 日本プロテインホスファターゼ研究会 第3回国内集会.
  - 3) 渡辺-大河内直子、北浦次郎、小埜良一、原田浩徳、原田結花、中島秀明、野阪哲哉、稲葉俊哉、北村俊雄. (2007年5月) AML1点変異はマウスBMTモデルにおいてMDS/AMLを発症させる. 第5回幹細胞シンポジウム、口演
  - 4) 小埜良一、熊谷英敏、中島秀明、殿塚行雄、菱谷愛、滝智彦、林泰秀、北村俊雄、野阪哲哉. (2007年10月) Hoxa9とRas-MAPキナーゼ系の協調作用がMLL融合蛋白による急性白血病の発症に重要である. 第66回日本癌学会学術総会、ポスター
  - 5) 北村俊雄、野阪哲哉 (2007年10月) 白血病およびMDSの分子病態: マウス骨髄移植モデルおよび発現クローニング法を利用した解析. 第66回日本癌学会学術総会、シンポジウム
  - 6) 渡辺 (大河内) 直子、沖俊彦、小埜良一、原田浩徳、湯地晃一郎、東條有伸、中島秀明、野阪哲哉、稲葉俊哉、北浦次郎、北村俊雄 (2007年10月) RasGRP4と変異型AML1はマウスBMTモデルにおいて協調的に働き、T細胞性白血病を誘発する. 第69回日本血液学会総会、口演

- 7) 小埜良一、熊谷英敏、中島秀明、殿塚行雄、菱谷愛、滝智彦、林泰秀、北村俊雄、野阪哲哉. (2007年10月) MLL融合蛋白はRas-MAPキナーゼ系の活性化と相乗的に協調して急性白血病を発症する. 第69回日本血液学会総会、口演

白血病の新たなる分子標的としてのヒストン脱アセチル化酵素 (担当: 古川 雄祐)

## I 研究目的

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) は、真核細胞の遺伝子発現の制御に重要な役割を果たす酵素である。最近、HDACに対する阻害剤 (HDACi) が開発され、造血器腫瘍に対する臨床応用が期待されている。HDACiは白血病細胞にアポトーシス、細胞分化を誘導するが、臨床治験の結果では血液毒性は比較的軽度で、正常造血幹細胞には影響を及ぼさないと考えられる。また、一部の急性白血病において、白血病融合遺伝子産物にHDACがリクルートされることが分化停止に関与しているとの報告がある。このような背景から我々は、HDACの量的もしくは時空的な発現異常が白血病の発症に関与するという仮説を立て、正常血球分化におけるHDACの役割と白血病発症への関与さらには治療標的としての妥当性の解明を目的として研究を行った。

## II 研究計画および材料と方法

### 1) 血液細胞におけるHDACの発現とその制御機構の解明

RT-PCR、ウエスタン法、免疫染色を用いて種々の正常血液細胞、白血病細胞 (細胞株、臨床検体) における各種HDACの発現をスクリーニングした。またHDAC1遺伝子のプロモーター領域を単離し、luciferase assayを用いて、転写制御機構を解析した。クロマチン免疫沈降法を用いて、血球分化に関与する転写因子の結合状態を確認した。

### 2) 造血幹細胞におけるHDACの機能と白血化への関与の解明

siRNAを用いて白血病細胞におけるHDAC1の発現を抑制し、分化形質に及ぼす影響について表面マーカーを指標に解析した。C57BL/6(Ly-5.1)マウスより造血前駆細胞 (c-Kit陽性細胞) を単離し、レトロウイルスを用いてHDAC1を強発現した後に、放射線照射したC57BL/6(Ly-5.2)マウスに移植し、HDAC1強発現の効果を *in vivo* で確認した。移植マウスより採取したHDAC1強発現造血前駆細胞を純化し、flow cytometryで形質を解析し、さらにDNAマイクロアレイを用いて遺伝子発現プロファイルを解析した。

## III 研究成果

### 1) 血液細胞におけるHDACの発現とその制御機構の解明

ヒト正常血液細胞におけるクラス I HDAC (HDAC1・2・3) の発現をスクリーニングすると、造血前駆細胞 (CD34<sup>+</sup>骨髄単核細胞) ではHDACの発現は低く、とくに蛋白レベルでは検出限度以下であった。一方、committed progenitor (Lin<sup>-</sup>/CD34<sup>-</sup>骨髄単核細胞) においては発現が認められたが、顆粒球・単球では再度発現が低下した。また急性白血病においては細胞株 (HL-60・U937・K562) ・臨床検体ともにHDACとくにHDAC1の強発現を認めた。正常造血前駆細胞では白血病細胞に比べてヒストンアセチル化が亢進していた。分化に伴う発現

変化を検索すると、顆粒球・単球系分化に伴ってHDACの発現は低下した。一方、巨核球・赤芽球系分化においては発現が維持された。HDAC1プロモーターはTATA lessで、GC box・CCAAT box・GATA配列・MZF-1結合配列を認めた。プロモーター活性はSp1とGATA-1によって活性化され、C/EBP $\alpha$ ・C/EBP $\beta$ によって抑制された。またGATA-1によるHDAC1転写活性化は、GATA-2とMZF-1によって抑制された。顆粒球・単球系分化に伴って、HDAC1プロモーターにおけるSp1とGATA-1の結合が低下し、GATA-2とC/EBP $\alpha$ の結合が見られた。一方、巨核球・赤芽球系分化においては、GATA-1の結合が著明に増加し、GATA-2とMZF-1の結合が消失した。

## 2) 造血幹細胞におけるHDACの機能と白血化への関与の解明

HL-60細胞においてsiRNAを用いてHDAC1の発現を抑制すると、未分化骨髄系マーカーであるCD33の発現が低下した。一方、K562細胞においては、HDAC1発現抑制に伴い、赤芽球系マーカーであるCD235aの発現が低下し、骨髄系マーカーであるCD11bの発現が増加した。C57BL/6(Ly-5.1)マウスより造血前駆細胞(c-Kit陽性細胞)を単離し、レトロウイルスを用いてHDAC1を強発現させた後に、C57BL/6(Ly-5.2)マウスに移植したところ、12週以降に有意の白血球減少が認められた。骨髄細胞の解析では、未分化造血幹細胞(KSL細胞)の増加・顆粒球系分化の抑制が見られた。移植細胞のマイクロアレイ解析では、HDAC1強発現によりc-MplやCreb5の発現増加、HoxB5やThy-1の発現低下が見られた。

## IV 考察

HDACはCD34陽性造血前駆細胞においては発現が抑制されており、これは分化の多様性の保持のためと考えられる。HDAC発現はcommitmentに伴って誘導されるが、顆粒球系分化においては再度抑制され、赤芽球・巨核球系分化においては維持される。すなわちHDACは正常な血球分化において、分化の方向付けに関与していると考えられる。造血前駆細胞におけるHDAC1の発現抑制はGATA-2、MZF-1によると考えられる。またHDAC1の発現は顆粒球系分化においてはC/EBP $\alpha$ 、C/EBP $\beta$ によって抑制されるが、赤芽球・巨核球系分化においてはGATA-1によって維持される。

白血病細胞においては例外なくHDAC1の強発現が見られ、造血前駆細胞におけるHDAC1の発現異常が白血病発症の原因になると考えられる。また、白血病におけるHDAC1の発現異常は、GATA-1、GATA-2、MZF-1、C/EBP等の機能異常によると推測される。例えばC/EBPの機能喪失性変異によって、本来発現が抑制されるべき顆粒球系前駆細胞でHDAC1が発現することが急性骨髄性白血病の発症に関与している可能性がある。また、ダウン症の小児に発症する急性巨赤芽球性白血病では、ほとんどの症例で後天的な変異が見つかっており、GATA-1のN末が欠損したGATA1sによるHDAC1の発現異常に関与している可能性が示唆される。移植実験の結果から、HDAC1の異常発現は顆粒球系分化を抑制すると考えられた。HDAC1は分化抑制すなわち白血化におけるclass II異常として働いていると思われ、増殖促進性遺伝子異常(class I異常)が加わらないと白血病の発症には至らないと考える。この点を検証するため、現在、HDAC1とclass Iに属する異常遺伝子であるFLT3-ITDを同時発現させての移植実験を行っている。

## V 研究成果の発表

1) Kobayashi, Y., Ohtsuki, M., Murakami, T., Kobayashi, T., Sutheesophon, K.,

- Kitayama, H., Kano, Y., Kusano, E., Nakagawa, H. and Furukawa, Y.: Histone Deacetylase Inhibitor FK228 Suppresses the Ras-MAP kinase Signaling Pathway by Up-regulating Rap1 and Induces Apoptosis in Malignant Melanoma. *Oncogene* 25: 512-524, 2006.
- 2) Sutheesophon, K., Kobayashi, Y., Takatoku, M., Ozawa, K., Kano, Y., Ishii, H. and Furukawa, Y.: Histone Deacetylase Inhibitor Depsipeptide (FK228) Induces Apoptosis in Leukemic Cells by Facilitating Mitochondrial Translocation of Bax, which Is Enhanced by Proteasome Inhibitor Bortezomib. *Acta Haematol.* 115: 78-90, 2006.
- 3) Kano, Y., Akutsu, M., Tsunoda, S., Izumi, T., Kobayashi, H., Inoue, K., Mori, K., Fujii, H., Mano, H., Odgerel, T. and Furukawa, Y.: Schedule-dependent Interactions between Pemetrexed and Cisplatin in Human Carcinoma Cell Lines *in vitro*. *Oncol. Res.* 16: 85-95, 2006.
- 4) Kano, Y., Akutsu, M., Tsunoda, S., Izumi, T., Kobayashi, H., Mano, H. and Furukawa, Y.: Cytotoxic Effects of Histone Deacetylase Inhibitor FK228 (Depsipeptide, Formally Named FR901228) in Combination with Conventional Anti-leukemia/lymphoma Agents against Human Leukemia/lymphoma Cell Lines. *Invest. New Drugs* 25: 31-40, 2007.
- 5) Furukawa, Y., Vu, H. A., Akutsu, M., Odgerel, T., Izumi, T., Tsunoda, S., Matsuo, Y., Kirito, K., Sato, Y., Mano, H. and Kano, Y.: Divergent Cytotoxic Effects of PKC412 in Combination with Conventional Antileukemic Agents in FLT3 Mutation-positive versus Negative Leukemia Cell Lines. *Leukemia* 21: 1005-1014, 2007.
- 6) Ishikawa, K., Ishii, H., Murakumo, Y., Mimori, K., Kobayashi, M., Yamamoto, K.-I., Mori, M., Nishino, H., Furukawa, Y. and Ichimura, K.: Rad9 Modulates the p21<sup>WAF1</sup> Pathway by Direct Association with p53. *BMC Mol. Biol.* 8: 37-46, 2007.
- 7) Kikuchi, J., Shimizu, R., Wada, T., Ando, H., Nakamura, M., Ozawa, K. and Furukawa, Y.: E2F-6 Suppresses Growth-associated Apoptosis of Human Hematopoietic Progenitor Cells by Counteracting Proapoptotic Activity of E2F-1. *Stem Cells* 25: 2439-2447, 2007.
- 8) Mori, M., Furukawa, Y., Takatoku, M., Nagai, T., Muroi, K. and Ozawa, K.: B-cell Lymphoma Showing Typical Features of Angioimmunoblastic T-cell Lymphoma. *JMU Journal* 30: 89-95, 2007.
- 9) Nonomura, C., Kikuchi, J., Kiyokawa, N., Ozaki, H., Mitsunaga, K., Ando, H., Kanamori, A., Kannagi, R., Fujimoto, J., Muroi, K., Furukawa, Y. and Nakamura, M.: CD43, but not P-selectin Glycoprotein Ligand-1, Functions as an E-Selectin Counter-Receptor in Human Pre-B-Cell Leukemia NALL-1. *Cancer Res.* 68: 790-799, 2008.
- 10) Odgerel, T., Kikuchi, J., Wada, T., Shimizu, R., Futaki, K., Kano, Y. and Furukawa, Y.: The FLT3 Inhibitor PKC412 Exerts Differential Cell Cycle Effects on Leukemic Cells Depending on the Presence of FLT3 Mutations. *Oncogene* 27: 3102-3110, 2008.
- 11) Murakami, T., Sato, A., Chun, N. A. L., Hara, M., Naito, Y., Kobayashi, Y., Kano,

- Y., Ohtsuki, M., Furukawa, Y. and Kobayashi, E.: Transcriptional Modulation Using HDACi Depsipeptide Promotes Immune Cell-Mediated Tumor Destruction of Murine B16 Melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 128: 1506-1516, 2008.
- 12) Katayama, H., Yamane, Y., Furukawa, Y., Kitagawa, S., Nakamura, Y. and Yoshino, K.: Activation of Focal Adhesion Kinase in Detached Human Epidermal Cancer Cells and Their Long-term Survival Might be Associated with Cell Surface Expression of Laminin-5. *Acta Derm. Venereol.* 88: 100-107, 2008
- 13) Inaba, T., Yagyu, H., Itabashi, N., Tazoe, F., Fujita, N., Nagashima, S., Okada, K., Okazaki, M., Furukawa, Y. and Ishibashi, S.: Cholesterol Reduction and Atherosclerosis Inhibition by Bezafibrate in Low-Density Lipoprotein Receptor Knockout Mice. *Hypertens. Res.* 31: 1001-1007, 2008.
- 14) Akutsu, M., Tsunoda, S., Izumi, T., Tanaka, M., Katano, S., Inoue, K., Igarashi, S., Hirabayashi, K., Furukawa, Y., Ohmine, K., Sato, K., Ozawa, K., Teramukai, S., Fukushima, M. and Kano, Y.: Long-term Results of Dose-intensive Chemotherapy with G-CSF Support (TCC-NHL-91) for Advanced Intermediate-grade Non-Hodgkin's Lymphoma: A Review of 59 Consecutive Cases Treated at a Single Institute. *Oncol. Res.*, in press.
- 15) Noborio-Hatano, K., Kikuchi, J., Takatoku, M., Shimizu, R., Wada, T., Ueda, M., Nobuyoshi, M., Oh, I., Sato, K., Suzuki, T., Ozaki, K., Mori, M., Nagai, T., Muroi, K., Kano, Y., Furukawa, Y. and Ozawa, K.: Bortezomib Overcomes Cell Adhesion-mediated Drug Resistance via Down-regulation of VLA-4 Expression in Multiple Myeloma. *Oncogene*, submitted.
- 16) Kobayashi, T., Furukawa, Y., Kikuchi, J., Ito, C., Miyata, Y., Muto, S., Tanaka A. and Kusano, E.: Transactivation of RON Receptor Tyrosine Kinase via PDGF Receptor □ during Steady-state Growth of Human Mesangial Cells. *J. Biol. Chem.*, submitted
- 17) Kano, Y., Akutsu, M., Tsunoda, S., Izumi, T., Tanaka, M., Yazawa, Y., Mori, K., Mano, H. and Furukawa, Y.: Cytotoxic Effects of Gemtuzumab Ozogamicin (Mylotarg) in Combination with Conventional Antileukemic Agents Analyzed by the Isobologram Method *in vitro*. *Br. J. Haematol.*, submitted.
- 18) Futaki, K., Furukawa, Y., Ohtsuki, M., Nakagawa, H. and Imokawa, G.: Histone Deacetylase Inhibitor FK228 Induces G1 Arrest and Apoptosis via Modulation of Multiple Targets of MITF in Malignant Melanoma. *J. Pathol.*, submitted.
- 19) Furukawa, Y. and Kikuchi, J.: Regulation of Cell Growth and Death of Hematopoietic Stem/Progenitor Cells by E2F-family Transcription Factors. *Control of Cellular Physiology by Transcription Factors E2F* (Yoshida, K. ed.), Research Signpost, 2008: in press.

分子標的治療薬の最適化治療法の開発 (担当: 山田 尚)

## I 研究目的

従来型の抗腫瘍薬は DNA 障害を惹起して腫瘍細胞の増殖を抑制する。これに対して、分子標的治療薬は正常細胞の癌化に結びつくシグナルを抑制して腫瘍細胞の増殖抑制や細胞死を誘導する。糖質コルチコイド（ステロイド）は核内受容体を介して作用する。白血病とりわけ小児白血病の治療薬としては重要な分子標的薬であるが、抗腫瘍性に関する分子基盤が十分に解析されたとはいえない。そこで、患者検体を用いて、実際の治療に際しステロイドが患者腫瘍細胞にどのような変化をもたらしているかを検討した。

## II 研究計画および材料と方法

未治療の小児 pre-B-ALL、二名の患者に東京小児がん研究グループのプロトコールに従ってステロイドを投与し、経時的に末梢血より腫瘍細胞を採取した。

強化療法前の患者正常 B 細胞をコントロールとして遺伝子発現変化をマイクロアレイを用いて検討した。

## III 研究成果

ステロイドの投与により、腫瘍細胞は急激に減少した。48 時間後に腫瘍細胞を末梢血より採取した。二名ともプロトコールにのっとり治療で寛解が得られた。強化療法前の患者正常 B 細胞を採取してコントロールとした結果、二名に共通して 2 倍以上に増加している 26 遺伝子が同定された。これらは B 細胞受容体、B 細胞の情報伝達系および DNA の合成に関連した遺伝子であった。

ステロイド投与後の遺伝子発現変化を見ると、上記の 26 遺伝子中 5 遺伝子 (pre-B lymphocyte gene1, and 3, immunoglobulin  $\lambda$ -like polypeptide, TdT and HB-EGF) の発現が共通して抑制されていた。

## IV 考察

ステロイドに対する反応性は予後に関連する因子のひとつといわれている。ステロイドは細胞周期の停止やアポトーシスの誘導に関与するがその詳細は不明な点が多い。今回の研究で注目すべき点は pre-BCR の形成に関連した遺伝子がステロイドにより抑制された点である。小児白血病において腫瘍化を起こしている細胞においては B 細胞受容体よりのシグナルに強く依存して増殖・生存していることが示唆され、これらを標的にした治療法の開発が必要と考えられる。

## V 研究成果の発表

1 Yokoi K, Akiyama M, Yanagisawa T, Yoshino M, Nakazaki H, Takahashi K, Takahashi-Fujisaki J, Kanetsuna Y, Yamada H, Oi S, Eto Y. RNA expression analysis of a congenital intracranial teratoma. *Pediatr Blood Cancer*. 2005;44(5):516-20.

2 Junko Horiguchi-Yamada, Satsuki Iwase, Takeshi Kawano and Hisashi Yamada. Pretreatment of interferon- $\alpha$  radiosensitizes Daudi cells with modulating gene expression and biomarkers. *Anticancer Res* 2005;25(4):2631-8.

3 Arakawa Y, Suzuki H, Saito S, Yamada H. Novel missense mutation of the DNA Topoisomerase I gene in SN-38-resistant DLD-1 cells. *Mol Cancer Ther*. 2006;5(3):502-8.

- 4 Sekikawa T, Iwase S, Saito S, Arakawa Y, Agawa M, Horiguchi-Yamada J, Yamada H. JAS-R, a new megakaryo-erythroid leukemic cell line that secretes erythropoietin. *Anticancer Res.* 2006;26(2A):843-50.
- 5 Akiyama M, Yamada O, Yanagisawa T, Fujisawa K, Eto Y, Yamada H. Analysis of telomerase activity and RNA expression in a patient with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid. *Pediatr Blood Cancer.* 2006;46(4):506-11.
- 6 Yamada H, Arakawa Y, Saito S, Agawa M, Kano Y, Horiguchi-Yamada J. Depsipeptide-resistant KU812 cells show reversible P-glycoprotein expression, hyper-acetylated histones, and modulated gene expression profile. *Leuk Res.* 2006;30(6):723-34.
- 7 Yokoi K, Akiyama M, Yanagisawa T, Takahashi-Fujigasaki J, Yokokawa Y, Mikami-Terao Y, Fukuoka K, Fujisawa K, Nakazaki H, Oi S, Eto Y, Yamada H. Sequential analysis of cadherin expression in a 4-year-old girl with intracranial ependymoma. *Childs Nerv Syst.* 2007;23(2):237-42.
- 8 Sekikawa T, Takahara S, Suzuki H, Takeda N, Yamada H, Horiguchi-Yamada J. Diffuse large B-cell lymphoma arising independently to lymphoplasmacytic lymphoma: a case of two lymphomas. *Eur J Haematol.* 2007;78(3):264-9.
- 9 Hideaki Suzuki, Yasuhiro Arakawa, Masaki Ito, Shinobu Saito, Nobuakira Takeda, Hisashi Yamada, and Junko Horiguchi-Yamada. MLF1-interacting protein is mainly localized in nucleolus through N-terminal bipartite nuclear localization signal. *Anticancer Res.* 2007; 27: 1423-1430.
- 10 Hisashi Yamada, Tetsuaki Sekikawa, Satsuki Iwase, Yasuhiro Arakawa, Hideaki Suzuki, Miyuki Agawa, Masaharu Akiyama, Nobuakira Takeda, and Junko Horiguchi-Yamada. Segregation of megakaryocytic or erythroid cells from a megakaryocytic leukemia cell line (JAS-R) by adhesion during culture. *Leukemia Res.* 2007; 31(11):1537-43.
- 11 Kobayashi K, Shiba A, Yamada H, Ishibashi Y, Nakayama R, Toriumi Y, Mitsumori N, Kashiwagi H, Yanaga K. Frequent splicing aberration of the base excision repair gene hMYH in human gastric cancer. *Anticancer Res.* 2008;28:215-222
- 12 Hisashi Yamada, Tetsuaki Sekikawa, Miyuki Agawa, Satsuki Iwase, Hideaki Suzuki and Junko Horiguchi-Yamada. Adhesion to Fibronectin Induces Megakaryocytic Differentiation of JAS-REN Cells. *Anticancer Res.* 2008;28:261-266
- 13 Mikami-Terao Y, Akiyama M, Yuza Y, Yanagisawa T, Yamada O, Yamada H. Antitumor activity of G-quadruplex-interacting agent TMPyP4 in K562 leukemic cells. *Cancer Lett,* 2008;261(2):226-34.
- 14 Masaharu Akiyama, Osamu Yamada, Miyuki Agawa, Yuki Yuza, Takaaki Yanagisawa, Yoshikatsu Eto, Hisashi Yamada. Effects of prednisolone on specifically expressed genes in pediatric acute B-lymphoblastic leukemia. *J Pediatric Hematology Oncology,* 2008; 30: 313-316.