

がん細胞可塑性の分子基盤の解明

所属機関 東京慈恵会医科大学医学部

研究代表者 河野 毅

## 《研究の概要》

### I 巨核芽球性白血病の系統転換 (研究者 河野 毅)

白血病の発症および治療抵抗性には Genetic および Epigenetic な変化が重要な役割を担っている。急性骨髄性白血病の中でも巨核芽球性白血病の予後は極めて悪い。しかし、赤芽球性白血病の予後は通常の骨髄性白血病と同等と考えられている。この両者は共通の前駆細胞から発生し、どのような相違が両者の差を生じるのかについて十分な検討はなされていない。

我々は、急性巨核芽球性白血病の患者から白血病細胞株を樹立することに成功した。この細胞株 (JAS-R) は増殖形態により、巨核芽球系の JAS-RAD と赤芽球系の JAS-REN に分離することが可能であった。そこで、本細胞株を用いて巨核芽球性白血病と赤芽球性白血病の系統転換について、その分子機構、および増殖環境との係わりについて検討を加えた。

巨核芽球系の分化決定には転写因子 FLI1 の発現が重要な働きをしていたが、この FLI1 の発現は接着刺激によって増強された。FLI1 はその標的遺伝子としてインテグリン遺伝子の発現を増強し、インテグリンを介した接着刺激は FLI1 の発現を増強する正の相互作用が成立していた。

慢性骨髄性白血病では巨核芽球性および赤芽球性の急性転化が見られることがある。赤芽球性の白血病細胞株では FLI1 の isoform1 の発現が見られず、これらの細胞に FLI1 isoform1 を強制発現すると巨核芽球性の分化傾向が見られ、更に、MAPK 系を刺激すると明らかな巨核芽球への系統転換が見られた。

### II ジェネティック変異に伴う耐性機構の研究—Topoisomerase-I 変異による薬剤耐性— (研究分担者 荒川泰弘)

我々は今までに camptothecin に対する耐性大腸がん細胞株 (DLDSNR6) を作成した。この細胞は Topoisomerase-I の一つのアレルに欠失があり、他のアレルには新たな変異が確認されている。この耐性株に継続的に camptothecin の濃度を増加すると、更に耐性を獲得した複数の株を得ることができた。この新たな耐性株の Topoisomerase-I 変異を検討すると新たに 2 か所の変異が導入されていた。それぞれの変異が Topoisomerase-I の機能をどのように変化し、さらに indolocarbazole 誘導体の J-107088 (Topoisomerase-I 阻害薬) に対する反応に影響しているかを検討した。新規の変異を有する Topoisomerase-I の DNA 切断活性は親株の 8 分の 1 であり、J-107088 に対しても耐性を有していた。

河野毅	東京慈恵会医科大学医学部 分子遺伝学研究部講師	研究の総括と白血病の系統転換
荒川泰弘	東京慈恵会医科大学医学部 腫瘍・血液内科助教	がん細胞の薬剤耐性

## 研究報告 1：巨核芽球性白血病の系統転換における FLI1 の関与

### I 研究目的

白血病の治療における寛解率の向上は目を見張るものがある。90%に及ぶ完全寛解率にも拘らず、治癒率は決して満足のいくものではない。再発では化学療法に対する抵抗性が誘導され、十分な治療効果を得ることが難しくなる。また、治療抵抗性および再発の白血病に対して造血幹細胞を併用した大量化学療法が用いられているが、移植に伴う様々な副反応や再発が完全に克服されているわけではない。

巨核芽球性白血病は成人急性白血病の中でも予後不良である。興味あることに、赤芽球性白血病の予後は他の白血病と同等と考えられる。両者は共通の巨核芽球赤芽球前駆細胞から分化・増殖する。この巨核芽球赤芽球前駆細胞からの系統転換の分子機構を明らかにできれば予後不良とされる巨核芽球性白血病の治療成績の向上につながると期待できる。

### II 研究計画及び材料と方法

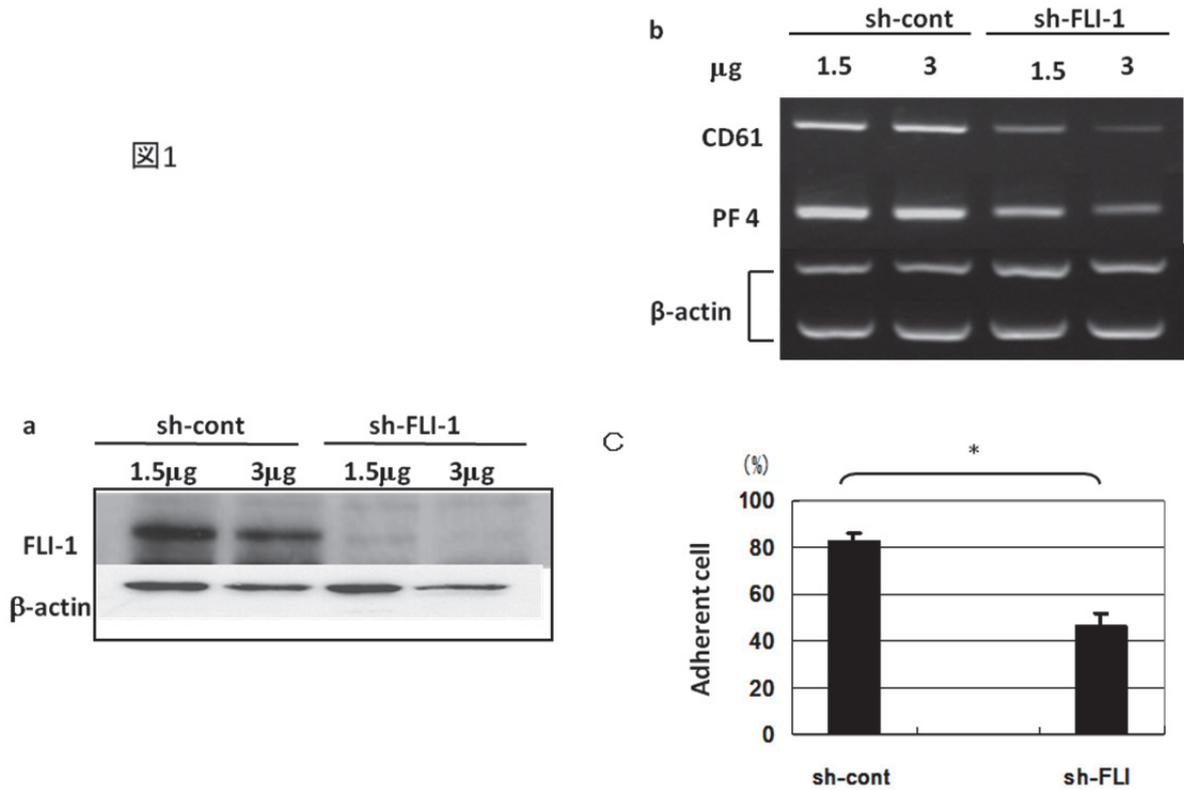
急性巨核芽球性白血病細胞株 JAS-R は成人患者の末梢血芽球から樹立した細胞で、培養中には巨核芽球性(JAS-RAD)と赤芽球性(JAS-REN)の性質の異なる二種類の細胞が存在している (Yamada H, et al. Segregation of megakaryocytic or erythroid cells from a megakaryocytic leukemia cell line (JAS-R) by adhesion during culture. *Leukemia Res.* 2007 ; 31(11):1537-43.)。両者の最も大きな相違は、JAS-RAD はインテグリンを介した接着性を示すが JAS-REN は接着性を示さない点である。両者の遺伝子発現を比較検討した結果では転写因子 FLI が JAS-RAD において高発現していることが知られている。そこで、①FLI1 プロモーター領域の機能解析をルシフェラーゼ・リポーター遺伝子アッセイとして行う。このプロモーター領域が細胞の接着の有無によりどのように影響され、更に巨核球への分化に関連しているかを shRNA を用いた遺伝子ノックダウンで明らかにする。②FLI1 の発現が見られない赤芽球性の慢性骨髄性白血病細胞株 K562 および KU812 を用い、レンチウイルスベクターを用いて FLI1 isoform1 を各細胞に発現させる。この発現に伴う巨核芽球性の変化を検討する。

### III 研究成果

#### 1 JAS-R 細胞を用いた接着刺激と FLI1 の発現調節

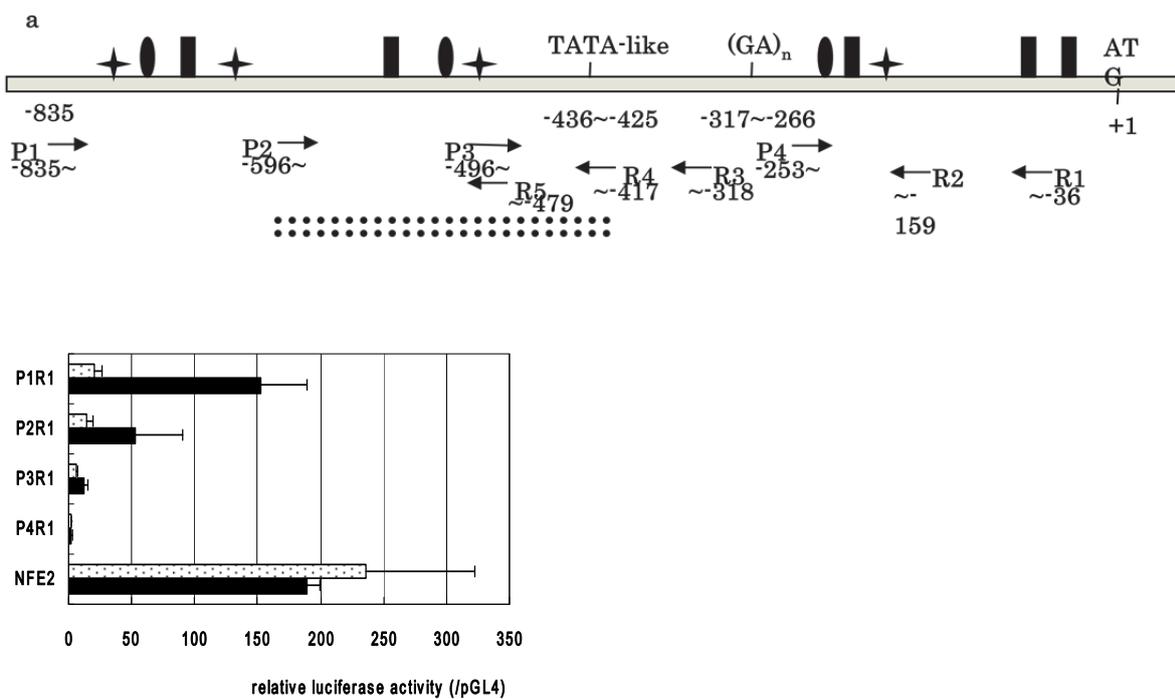
赤芽球系の JAS-REN と巨核芽球系の JAS-RAD との間で遺伝子発現変化を検討すると最も大きな変化を示す転写因子の一つが FLI1 であった。そこで、FLI1 を shRNA でノックダウンすると巨核芽球系のマーカーである CD61 および PF4 の発現は抑制され、同時に接着性も失われた(図 1：JAS-RAD への shRNA の投与)。

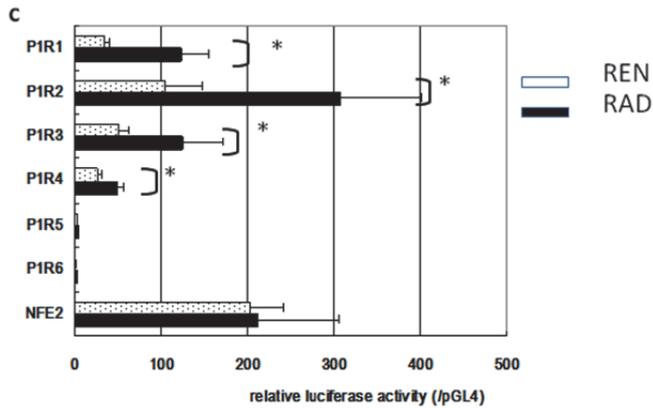
図1



そこで、FLI1 の発現調節機構を検討するために、FLI1 の上流プロモーター領域をクローニングし、ルシフェラーゼ・リポーター遺伝子をマーカーとしてプロモーター領域の解析を行った。その結果、翻訳の開始点から上流に-417 から-596 の領域に強い転写活性を示す領域が同定された(図 2)。

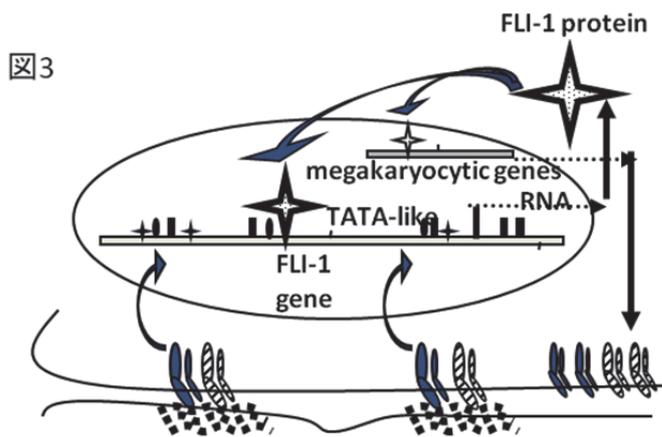
図2 FLI1のプロモーター領域とルシフェラーゼ活性





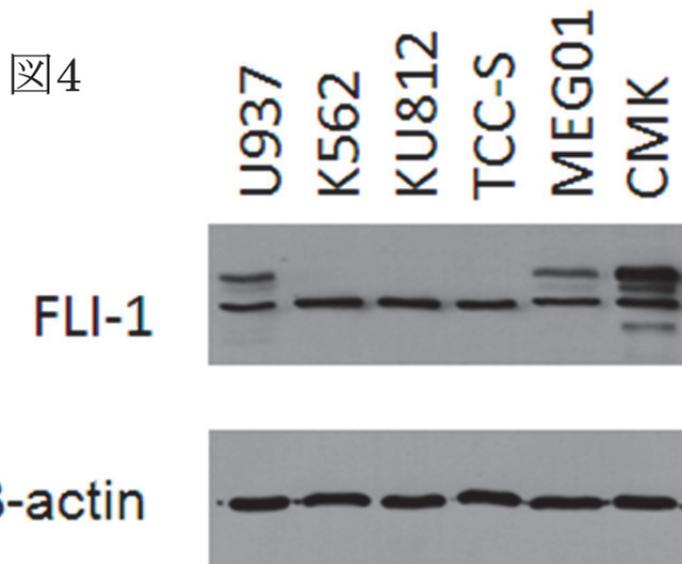
面白いことにこの領域を用いたプロモーター解析では、接着を阻止するような条件ではその活性が急激に弱まるのが判明した。さらにこの領域には複数の転写因子の結合モチーフが存在するが、GATA 及び ETS の結合部位を他の塩基に置換したプロモーターではその活性が抑制されることがわった。

これらのことから、巨核芽球への系統分化に重要な働きを担っている FLI1 の発現調節は FLI1 が自身を誘導し、更に、接着刺激がその過程を増強することが判明した(図 3)。

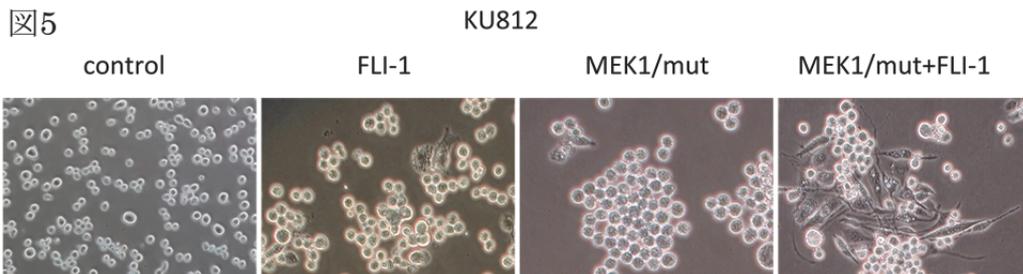


## 2. FLI1 isoform1 の役割

しばしば、慢性骨髄性白血病の急性転化では赤芽球性や巨核芽球性の芽球が出現することが知られている。そこで、慢性骨髄性白血病細胞株における FLI1 の発現を検討した。K562 および KU812 は共に赤芽球性の表現型を示す細胞株であるが、これらの細胞における FLI1 の発現を検討した。すると両細胞に FLI1 isoform1 の発現が見られない事が判明した(図 4)。



そこで FLI1 isoform1 を K562 および KU812 細胞にレンチウイルスベクターを用いて導入し、細胞形質の変化を検討した。FLI1 isoform1 の導入により両細胞ともに巨核芽球への分化傾向が見られたが十分なものではなかった。そこで、第二の因子として MAPK 系のシグナルを活性化するため変異型 MEK を導入することで試みた。両細胞とも著しく接着が増すとともに巨核芽球系のマーカーの増強が観察され、細胞は変異型 MEK 導入後、約 2 週間でアポトーシスに陥り死滅した (図 5)。



#### IV 考察

白血病は造血幹細胞および前駆細胞が持つ本来の増殖および分化に対するプログラムがクラス I およびクラス II の遺伝子変異により暴走した結果である。最近では、エピジェネティックな変化が上記の遺伝子に加わり、白血病の分子病理に関与していることが知られている。エピジェネティックな変化は本来、可逆的な変化であり、環境条件等により変化が可能と考えられる。赤芽球と巨核芽球は共通の前駆細胞をもつが、それぞれに由来する白血病の治療反応性は両者において大きく異なる。今回、我々が明らかにした接着と巨核芽球系への系統転換では、接着を抑制することで赤芽球系の優位な状況を作り出すことが可能であった。JAS-RAD は JAS-REN に比べてアントラサイクリン系薬剤に対する感受性が低いので、増殖環境を修飾することで治療効果の向上が期待できることが示された。

巨核芽球への系統転換には FLI1 isoform1 が関与し、更に白血病の分化誘導を考える上では MAPK 活性化が必要なことが示された。一般に、悪性腫瘍の治療に関しては MAPK 系は抑制の対象である。しかし、巨核芽球性白血病に関しては MAPK 系の刺激は分化に繋

がる可能性がある。JAS-R 細胞におけるシグナル伝達に関連した詳細を明らかにすることができれば、巨核芽球性白血病の新たな治療の開発に踏み出せるものと考ええる。

## V 研究成果の発表

1 Junko Horiguchi-Yamada, Takeshi Kawano, Satsuki Iwase, Shinobu Takahara, Hideaki Suzuki, Hisashi Yamada. Adhesion and integrin signal promote megakaryocytic differentiation of human acute megakaryo-erythroid JAS-R cells through FLI-1 auto-augmentation. In preparation

2 Takeshi Kawano, Masaharu Akiyama, Satsuki Iwase, Miyuki Agawa-Ohta, Ritsuko Nakayama, Mika Chiba, Naoki Agata and Hisashi Yamada. FLI-1 isoform1 expression and ERK activation induce Megakaryocytic differentiation of CML cells. In preparation.

3 Takeshi Kawano, Masaharu Akiyama, Satsuki Iwase, Miyuki Agawa-Ohta, Ritsuko Nakayama, Mika Chiba and Hisashi Yamada. Megakaryocytic morphological change regulated by ERK activation and beta-actin depolymerization in JAS-RAD and JAS-REN cell. In preparation.

## 研究報告 2 : カンプトテシン耐性大腸がん培養細胞株におけるトポイソメラーゼ I 遺伝子変異

### I 研究目的

固形腫瘍では造血器腫瘍で見られる様な効果を期待できる抗腫瘍薬は存在していない。そのような中で DNA topoisomerase I (TopoI) 阻害薬は固形がん治療における重要な抗腫瘍薬である。とりわけ消化管がんに対する期待が高い。しかし、TopoI に対する耐性機構は十分に研究されているとはいえない。TopoI に対する薬剤耐性を考えるときには、①腫瘍細胞内の薬剤濃度、②TopoI 自体の変異による機能的な問題、③DNA 損傷に対する修復機序、について考える必要がある。そこで今回、我々は TopoI 阻害薬に対する耐性機序を明らかにするため、強い耐性を示す細胞を作成し、その分子機序の解明を試みた。

### II 研究計画及び材料と方法

#### ①大腸がん培養細胞株 DLD1 と Camptothecin 耐性株の作成

大腸がん由来の DLD1 細胞はミスマッチ・リペアー遺伝子 MSH6 に変位を有する細胞である。我々は、今までに camptothecin に対する耐性大腸がん細胞株 (DLDSNR6) を作成した (Arakawa Y, et al., Novel missense mutation of the DNA topoisomerase I gene in SN-38-resistant DLD-1 cells. Mol Cancer Ther. 2006;5(3):502-8.)。この細胞においては TopoI の一つのアレルに欠失があり、他のアレルには新たな変異の導入が確認されている。この耐性株に継続的に Camptothecin の濃度を増加すると、更に耐性を獲得した複数の株を得ることができた。

#### ②耐性の測定と細胞周期の検討

薬剤耐性の測定は MTS アッセイによって行った。また、細胞周期は FACS によって解析

した。

### ③TopoI 遺伝子変異の解析

各耐性クローン化細胞から DNA を抽出し、塩基配列を決定して変異を同定した。

### ④変異 TopoI の機能解析

それぞれの変異が TopoI の機能にどのように関連するか、各耐性細胞株から精製した核蛋白質を用いて DNA relaxation assay で検討した。また、indolocarbazole 誘導体の J-107088 に対する耐性と ABC-transporter との関連も qRT-PCR および FACS を用いて検討した。

## III 研究成果

### 1 Topoisomerase I 阻害薬と Topoisomerase I 変異との関連

大腸がん由来の DLD-1 は MSH6 に変異を有し、塩基置換を起こしやすい細胞株である。この DLD-1 を用いて新たな TopoI 変異の導入と耐性の関連を研究した。初期耐性株 (DLDSNR6) の camptothecin に対する耐性度を 2 $\mu$ M から徐々に高め、約 3 カ月をかけて 10 $\mu$ M のきわめて高濃度の耐性クローンが得られた。このクローンは最終的に 30 $\mu$ M camptothecin にも耐性であった。これら新規に作成した耐性株細胞の TopoI 変異を検討すると従来から指摘されていた変異に加えて新たな変異が加わっていた。今までに得られた変異は DLDSNR6 では G365S、DLDSNRA23F では G365S と G717R、DNDSNRD16F では G365S、G717R、および Q421R であった。

### 2 Topoisomerase I 変異と機能の関連 (図 6)

これらの 365 番目、421 番目、717 番目のアミノ酸変異と耐性の関連を検討した。はじめに各耐性株における Topoisomerase I および Topoisomerase II の蛋白量をウエスタン・ブロットで検討すると、高度耐性株では TopoI の発現の軽度低下が見られたが際立った減少ではなかった。しかし、TopoII においては DLDSNRA23F および DNDSNRD16F で強い発現の増強が観察された。

各耐性株から抽出した核タンパク質を用いて DNA relaxation assay を行うと、DLDSNRA23F および DNDSNRD16F 両耐性株における TopoI の活性は親株の八分の一に低下していた。

### 3 各耐性株に対する MTS 解析 (図 7)

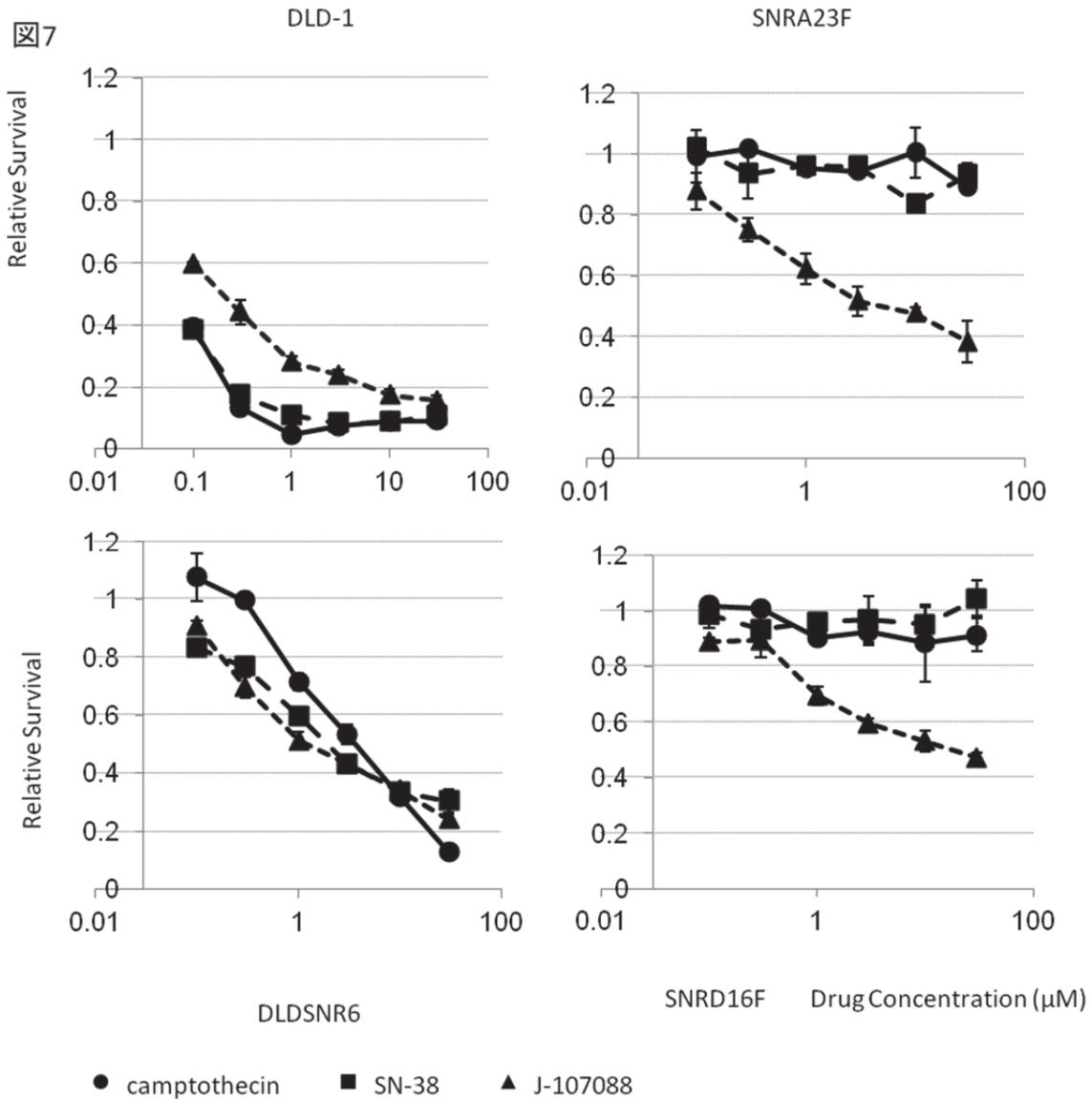
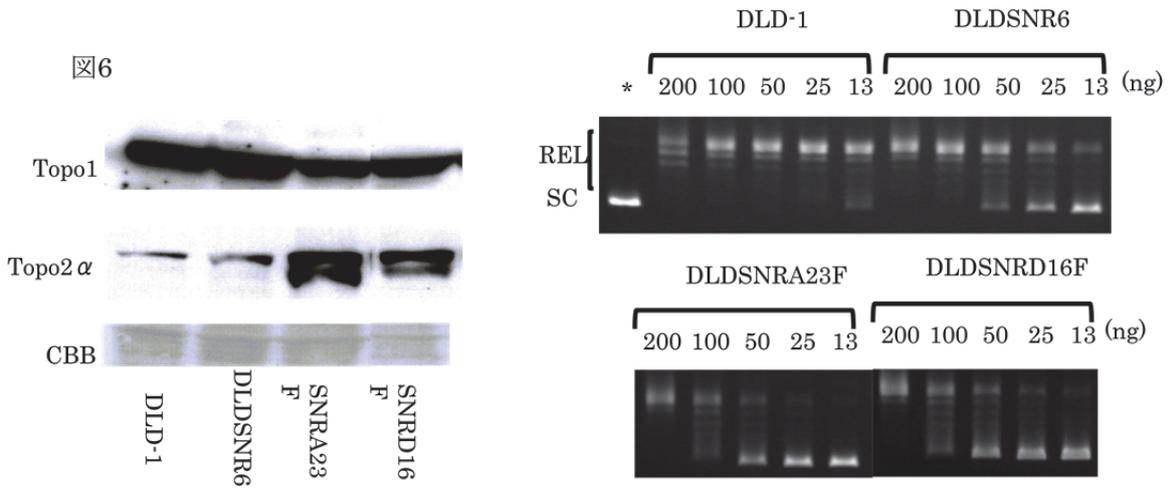
Camptothecin および J-107088 に対する耐性を検討した。DLDSNRA23F および DNDSNRD16F では DLDSNR6 に比べて高い濃度での耐性を示した。また同様に、J-107088 に対してもある程度の耐性を示した。

### 4 耐性株における薬剤排出機構

これらの耐性株における薬剤排出機構が耐性に関与している可能性を検討した。12 種類の ABC-Transporters について、その発現を qRT-PCR によって検討すると ABCB1(MDR1) と ABCG2(BCRP) の発現の上昇が観察された。

これらの新規に作成した耐性株が indolocarbazole 誘導体の J-107088 にどのように影響されているかを細胞周期の変化から検討した。5 $\mu$ M の J-107088 処理では DNDSNRD16F は何ら変化を示さなかったが DLDSNRA23 は 48 時間の処理で S-G2/M に集積する結果が得られた。これらの条件で、MDR1 の抑制剤 Verapamil および BCRP の阻害剤である Ko143 を併用した。Verapamil ではなんら変化が観察されなかったが、Ko143 を併用すると

DNDSNRD16FでもJ-107088によるS-G2/M期への集中が観察された。しかし、この場合でもG1期は残存しておりDNDSNRD16Fの高度な耐性が示された。



#### IV 考察

使用した大腸がん由来の細胞は DNA 修復酵素に損傷のある細胞株である。また、TopoI の一つのアレルに欠失があり、このため容易に変異が導入されたものと考えられる。DNA-Topo1-Drug によって作成される DNA 切断は細胞にとって危険な状況であり、このような状況の持続は許されない。このため、DLD1 には様々な変異が導入され細胞死から逃れる細胞が作り出されたと考えられる。

各耐性株の TopoI の機能的低下は TopoII の増加によって代償されているものと考えられる。このように TopoII に依存した細胞の TopoII 阻害薬に対する感受性がどのように変化しているのか更なる検討が必要である。

本耐性株細胞は indolocarbazole 誘導体の J-107088 に対しても耐性を示した。この耐性の克服には BCRP の阻害薬である Ko143 がある程度に効果がある事が判明した。今後、薬剤耐性の観点からも ABC-transporter の抑制について考える必要があるものと考えられた。

#### V 研究成果の発表

4 Yasuhiro Arakawa, koji Ozaki, Yutaka Okawa, Hisashi Yamada. Three missense mutations of DNA topoisomerase I in highly camptothecin-resistant colon cancer cell sublines. *Oncology Reports*, in press.