

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590640

研究課題名（和文） マイクロRNA解析による抗癌剤耐性白血病の分子機構の解明：検査診断への応用

研究課題名（英文） Elucidation of molecular mechanisms of drug-resistant leukemia through micro RNA analysis: applications to laboratory diagnostics

研究代表者 宮地 勇人 (MIYACHI HAYATO)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：20174196

研究成果の概要（和文）：

抗癌剤耐性機構には多数の遺伝子発現異常が関与している。マイクロRNAは非翻訳領域の小サイズのRNAで遺伝子発現・転写を負に制御する。本研究では、白血病の抗癌剤耐性におけるマイクロRNAの発現異常の意義を明らかとし、耐性診断に応用することを目的とした。急性白血病の予後不良因子である*FLT3-ITD*を導入した白血病細胞では、ara-C耐性が明らかとなり、その機構として細胞膜輸送を担うENT1発現低下と薬物細胞内取り込み低下が明らかとなった。本細胞においてDNAマイクロアレイによりマイクロRNAの発現変化プロファイルが明らかとなった。本実験系は、抗癌剤耐性の診断のため良いモデルになると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Expression of numerous genes is altered in drug-resistant tumor cells. MicroRNA is known as a regulating factor in the gene expression. The aim of this study was to clarify roles of micro RNA expression in drug-resistant leukemia cells, and its possible application in the diagnosis of resistance. When leukemia cells were transfected with *FLT3-ITD*, a major poor risk factor, specific resistance to ara-C was found. Altered pattern of micro RNA was demonstrated when analyzed by DNA microarray. This experimental system can be used as a model for diagnosis of drug resistance.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界領域・病態検査学

キーワード：白血病、抗癌剤、耐性、マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

白血病の抗癌剤治療において、個々の患者で治療反応性および副作用発現の程度は異なる。しかしながら、今日、白血病の薬剤治療は、一定の治療プロトコールにしたがい一

律に行われている。これは、癌の患者ごとに異なる治療反応性を知る適切な検査診断法がないためである。癌の患者ごとに最適な治療効果を引き出し、副作用を最小限に抑えるには、腫瘍における治療抵抗性すなわち耐性

の状態を知り、最も効果の高い薬剤を選択する必要がある。本研究者は、各種の抗癌剤に耐性の株化培養白血病細胞を樹立し、分子薬理学的手法を用いて耐性の分子機構を解析し、白血病細胞で耐性遺伝子の変異成立に抗癌剤の化学構造の関与を明らかにしてきた。すなわち、葉酸拮抗剤誘導体の耐性において、脂溶性キナゾリンによる多剤耐性遺伝子 (*MDR1*) 発現やジドロ葉酸還元酵素 (*DHFR*) 遺伝子コドン 31 の点突然変異、メソトレキサート耐性による *DHFR* 遺伝子発現増加や還元型葉酸キャリア (RFC) 遺伝子発現増加と点突然変異、チミジル酸合成酵素 (TS) 阻害剤で TS 遺伝子の発現増加などである。さらに本研究者は、耐性の機構が薬剤と細胞との相互関係にて成立することから、細胞側因子に焦点をあて、耐性遺伝子変異の成立の分子機構としてマイクロサテライト反復配列解析にて遺伝子不安定性の関与を明らかにした。遺伝子不安定性の背景として、DNA修復酵素、細胞周期関連の遺伝子の異常が示唆され、耐性の機構には多数の遺伝子発現異常が複雑に関与している。本研究者は、多数の遺伝子発現を同時平行的に解析できるDNAマイクロアレイ (DNAチップ) を用いて、薬剤耐性株化培養白血病細胞における遺伝子プロファイル解析を行い、新規の耐性遺伝子として、遺伝子不安定性をもたらすDNA修復酵素など遺伝子発現異常を明らかにし、また遺伝子発現異常の意義を明らかにしている (Matsushita H., Miyachi H. J. Exp. Med. 203: 821, 2006; Efferth T, Miyachi H, Cancer Genom Proteomics. 4:81, 2007; Matsushita H, Miyachi H, Oncogene 27: 6749, 2008)。

マイクロ RNA (micro RNA: miRNA) は、非翻訳領域の特定の塩基配列からなる小サイズ (21-23 塩基) の RNA で、遺伝子発現・転写を負に制御する。現在 600 個以上が知られている。近年、マイクロ RNA 発現は、遺伝子発現異常を通して、個体の発生、老化に加え、悪性腫瘍の発生に大きく関与していることが報告されつつある。さらに、その発現パターンが白血病細胞の染色体異常によって異なることが明らかとされた (Jongen-Lavrencic, et al. Blood 111; 5078, 2008)。前述のごとく、本研究者は耐性の機構には多数の遺伝子発現異常が複雑に関与していることを明らかとしている。これら遺伝子発現異常においてマイクロ RNA 発現は重要な役割を担うことが推定される。しかしながら、白血病の悪性度や治療抵抗性において、マイクロ RNA 発現の調節因子として意義は解明されておらず、その耐性遺伝子制御における意義および耐性化または難治性白血病の検査診断、治療選択への応用について早急に明らかにすべき課題である。

2. 研究の目的

本研究では、耐性遺伝子の発現異常に調節因子としてマイクロ RNA の発現異常の意義を明らかとし、これら非翻訳領域から転写される RNA 情報と今までの一連の研究にて明らかにしてきた耐性遺伝子の発現 (翻訳領域の RNA 情報) からなる真のトランスクリプトーム解析に基づく耐性診断の検出標的としての評価を行い、遺伝子発現解析による抗癌剤選択のための薬剤耐性の遺伝子検査の開発を試みることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *FLT3-ITD* 導入株化培養骨髄性白血病細胞の分子機構の解明

急性骨髄性白血病の抗癌剤治療の抵抗性の分子機構を解明するため、予後不良因子として知られる *FLT3-ITD* 導入株化培養骨髄性白血病細胞を用いて急性骨髄性白血病の抗癌剤治療の抵抗性の分子機構の解明を行った。①まず、株化培養骨髄性白血病細胞 K562 およびマウス株化骨髄性細胞 HF-6 に *FLT3-ITD* を導入し、MTT アッセイにて抗癌剤感受性を評価した。

②この株化培養耐性白血病細胞をモデルとして用いて、耐性機構における分子機構を調べた。

(2) *FLT3-ITD* 導入株化培養骨髄性白血病細胞におけるマイクロ RNA 発現

AML 患者細胞が有する 2 種類の FLT3 変異遺伝子 (FLT-ITD-1、-2) を TA クローニングにてレトロウイルスベクターを作製し、株化培養骨髄性白血病細胞 K562、HL60 に導入した。これら細胞における遺伝子発現の制御機構を知るため、miRNA 発現を調べた。マイクロ RNA の発現は、耐性細胞から抽出した RNA を用いて、既製のマイクロアレイ (Human Genome U133 Plus 2.0 GeneChips, Affymetrix 社) でスクリーニングおよびリアルタイム PCR:reverse-transcription PCR (RT-PCR) で定量測定を行った。

4. 研究成果

(1) *FLT3-ITD* 導入骨髄性細胞における抗癌剤耐性

①細胞株化培養ヒト骨髄性白血病 K562 細胞およびマウス株化骨髄性細胞 HF-6 に *FLT3-ITD* を導入し、MTT アッセイにて抗癌剤感受性を評価した結果、治療の key drug である arac-C に耐性を示すことが明らかとなった。

②その耐性の分子機構として、ara-C の細胞膜輸送を担う equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) 発現が遺伝子発現レベルで低下していることがリアルタイム PCR 法で明らかとなった。また、ウエスタンブロット解析で ENT1 の蛋白発現低下が確認された。

③Ara-C 細胞内取り込み実験にて、ENT1 減少による ara-C の細胞内取り込み低下が Arc-C 耐性の分子機構となることが示唆された。

④FLT-3 阻害剤の前投与にて、ara-C 耐性、ENT 発現低下が解除された。

⑤さらに、ENT 発現低下に介在する転写因子として、hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (HIF1A) に着目し、luciferase assay を用いた ENT1 promoter 活性誘導 (抑制) でその調節が明らかとなった。

以上、白血病細胞の増殖因子として FLT3-ITD 陽性の骨髄性白血病における治療抵抗性の分子機構として、細胞薬理学的な機構を介して、治療の key drug の ara-C に耐性化することが明らかとなった。

(2) FLT3-ITD 導入株化培養骨髄性白血病細胞におけるマイクロ RNA 発現

①株化培養骨髄性白血病細胞 K562、HL60 において、AML 患者細胞が有する 2 種類の FLT3 変異遺伝子 (FLT-ITD-1、-2) を導入した。導入した FLT3-ITD の発現は RT-PCR および Western blot にて確認した。

②マイクロアレイ法とリアルタイム PCR を用いて miRNA 発現を調べた結果、hsa-miR-20b の発現が亢進し、hsa-miR-155, hsa-miR-1093, hsa-miR-1249, hsa-miR-1281, hsa-miR1290, hsa-miR-1973 の発現が低下していた。Hsa-miR-20b は STAT3 と HIF1 α を標的とすること、hsa-miR-155 発現が FLT3-ITD 陽性の急性骨髄性白血病細胞で変化すると既報の知見から、これら miRNA 発現が ara-C 耐性の分子機構に重要な調節因子として機能している可能性がある。

以上の研究成果から、白血病細胞における抗癌剤の分子機構として、白血病発症に関わる自然耐性機構が特定薬剤耐性の分子機構と密接に関係していること、これらの関連分子の発現異常に miRNA 発現変化が関与することが明らかとなった。本研究成果は、白血病発症に関わる自然耐性機構における特定薬剤耐性の分子機構として初めての知見であり、本研究の知見と実験システムは、白血病の耐性細胞の分子診断と耐性克服の方法の開発に有用なモデルとなると考えられた。

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 10 件)

1. Yamamoto M, Hori T, Hatakeyama N, Igarashi K, Iesato K, Nakanishi K, Noguchi H, Miyachi H, Ito M, Tsutsumi H, Suzuki N. Successful Treatment of Childhood Hypocellular Acute Myeloid Leukemia. J Pediatr Hematol Oncol., 査読有, 2012 印刷中

2. Matsushita H, Nakamura N, Tanaka Y,

Ohgiya D, Tanaka Y, Damdinsuren A, Asai S, Yabe M, Kawada H, Ogawa Y, Ando K, Miyachi H. Clinical and pathological features of B-cell non-Hodgkin lymphomas lacking the surface expression of immunoglobulin light chain. Clin Chem Lab Med, 査読有, 2012 印刷中

3. Asai S, Okami K, Nakamura N, Shiraishi S, Yamashita T, Anar D, Matsushita H, Miyachi H. The sonographic appearance of the submandibular glands in patients with IgG4-related disease. J Ultrasound Med., 査読有, 31; 489-493, 2012

4. Hori T, Suzuki N, Hatakeyama N, Yamamoto M, Inazawa N, Miyachi H, Taki T, Tsutsumi H. Infantile acute promyelocytic leukemia without an RAR α rearrangement. Pediatrics International, 査読有, 53; 1070-1073, 2011

5. Matsushita H, Gondo K, Tanaka Y, Miyachi H. Triage of lymphoid malignancies in the peripheral blood using the Extended Immunofluorescent Application of the CELL-DYN Sapphire automated hematology analyzer. Clin Chem Lab Med., 査読有, 49; 933-935, 2011

6. Muguruma Y, Matsushita H, Yahata T, Shizu Y, Tanaka Y, Miyachi H, Ogawa Y, Kawada H, Ito M, Ando K. Establishment of a xenograft model of human myelodysplastic syndromes. Haematologica., 査読有, 96; 543-551, 2011

7. Asai S, Okami, K, Nakamura, N, Ogawa Y, Ohta Y, Ogase Y, Jin G, Matsushita, H, Miyachi H. The tortoiseshell pattern in one or both sides of the submandibular glands in mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma is related to chromosomal aberrations and the disease extent. J Ultrasound Med., 査読有, 29; 111-115, 2010

8. Matsushita, H, Yamamoto M, Tsuboi K, Masukawa A, Arakawa S, Asai S, Ogawa Y, Ando K, Miyachi H. A novel aberrant form of e13a2 BCR-ABL1 transcript in chronic myelogenous leukemia undetectable with the standardized real-time quantitative polymerase chain reaction from the Europe Against Cancer Program. Clin Chem Lab Med., 査読有, 47; 885-887, 2009

9. Jin G, Matsushita H, Asai S, Tsukamoto H, Ono R, Nosaka T, Yahata T, Takahashi S, Miyachi H. FLT3-ITD induces ara-C resistance in myeloid leukemic cells through the repression of the ENT1 expression. Biochem Biophys Res Comm., 査読有, 390; 1001-1006, 2009

10. Matsushita H, Masukawa A, Arakawa S,

Ogawa Y, Asai S, Yabe M, Ando K, Miyachi H. Persistence of derivative chromosome 22 after achieving a major molecular response in chronic myeloid leukemia with a cryptic BCR-ABL1 fusion gene. Intern J Hematol., 査読有, 90; 623-626, 2009

〔学会発表〕 (計 3 件)

1. Miyachi H. Global Standardization and quality services of molecular-genetic testing. 2011 ASCP Annual Meeting/WASPaLM XXVI World Congress, 2011.10.20. (Las Vegas, USA)

2. Yamamoto M, Igarashi K, Hatakeyama N, Suzuki N, Tsutsumi H, Noguchi H, Nakanishi K, Ito M, Miyachi H, Oda T. Various chromosomal aberrations arising after RIC-CBT in childhood hypocellular AML. The 73rd annual meeting of the Japanese Society of Hematology. 2011.10.15, 名古屋国際会議場 (名古屋)

3. Matsushita H, Yahata T, Nakamura Y, Sheng Y, Muguruma Y, Matsuzawa H, Uno T, Takanashi T, Satou T, Tanaka M, Hayashi H, Miyachi H, Ando K. CD34+/CD38+ cells from human cord blood initiate APL by induction of PML-RARA. The 73rd annual meeting of the Japanese Society of Hematology. 2011.10.16, 名古屋国際会議場 (名古屋)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮地 勇人(MIYACHI HAYATO)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：20174196