

## 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 25 年 6 月 18 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22501053

研究課題名（和文）テロメラーゼを標的としたマイクロRNAによる白血病幹細胞薬剤耐性の克服

研究課題名（英文）Strategy for overcoming drug resistance of leukemic stem cells by using micro-RNA targeted for telomerase.

研究代表者

山田 修 (YAMADA OSAMU)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30167712

研究成果の概要（和文）：miRNA のマイクロアレイを行い、テロメラーゼに的を絞った機能解析を目的とした。その結果やメチレーション解析の結果等を基にして、癌幹細胞を標的とした新たな薬剤耐性克服の治療戦略を開発することを目指した。テロメラーゼ遺伝子(hTERT)、MDR1 遺伝子のプロモーターのメチル化は薬剤耐性獲得前後で特に変化は無く、STAT5 の活性化による hTERT, MDR1 の蛋白発現増強が起こっていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The object of our experiment is to know microRNA regulating telomerase expression. Together with the results of methylation analysis of drug resistant cells, we tried to develop therapeutic strategies for overcoming drug resistance of cancer stem cells. As a result, methylation level of both telomerase and MDR1 promoter lesion was stable during acquisition of drug resistance. Instead, increased expression of telomerase and MDR1 protein which was caused through the activation of transcription factor STAT5, was observed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：①テロメラーゼ ②マイクロRNA ③薬剤耐性④白血病幹細胞⑤MDR1⑥メチレーション⑦STAT5⑧分子標的治療

## 1. 研究開始当初の背景

miRNA は機能性低分子 RNA であり、転写後の配列特異的な RNA サイレncingにより標的遺伝子の翻訳を抑制する。最近癌幹細胞との関連性が miR-124, miR-137 などで明らか

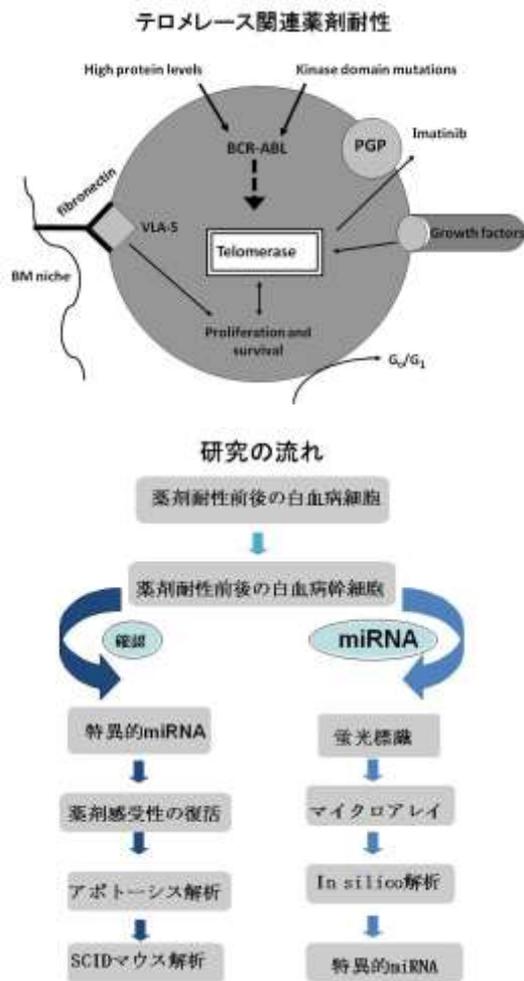
にされた。近年癌幹細胞の存在が多くの癌腫で証明されつつある (Cancer stem cells: implications for cancer treatment and prevention. Cancer J, 13:271, 2007)。この概念は 1997 年に Dick らにより、急性骨

髓性白血病において白血病幹細胞として最初に証明された(Nat Med3:730)。造血幹細胞は個体の一生にわたって存在するため、複数の遺伝子異常に遭遇する機会が多い。その異常が蓄積されて生じたのが白血病幹細胞と考えられる。自己複製能を維持した白血病幹細胞ではテロメラーゼ活性は高いと考えられるが、我々を含むこれまでの報告では白血病細胞のテロメラーゼ活性は必ずしも高くない。この原因として末梢血中に動員される白血病細胞には幹細胞の割合が少ないことがあげられる。「山田」は世界に先駆けてテロメア・テロメラーゼの研究を行い(Yamada, O et al. J. Clin. Invest. 95:1117, 1995)、臨床現場での白血病治療を通し、薬剤耐性克服に強いモチベーションを持っている。

## 2. 研究の目的

癌の化学療法において最大の問題点は、化学療法施行後に出現する獲得耐性の出現である。治療抵抗性の白血病細胞では、P 糖蛋白の他にテロメラーゼ活性の増強も見られる(Yamada O et al. Leukemia and Lymphoma 49:1168-1177, 2008)。すなわち、同一の腫瘍細胞において薬剤の取り込み低下や排出亢進以外にテロメラーゼも耐性機序に関与していることが示唆される。マイクロRNA(miRNA)はメッセンジャーRNAの翻訳制御に働き、細胞増殖、アポトーシスの調節に関わっている。薬剤耐性獲得前後の白血病幹細胞を用い、miRNAのマイクロアレイを行い、テロメラーゼに的を絞った機能解析を行う。この結果から癌幹細胞を標的とした新たな薬剤耐性克服の治療戦略を開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法



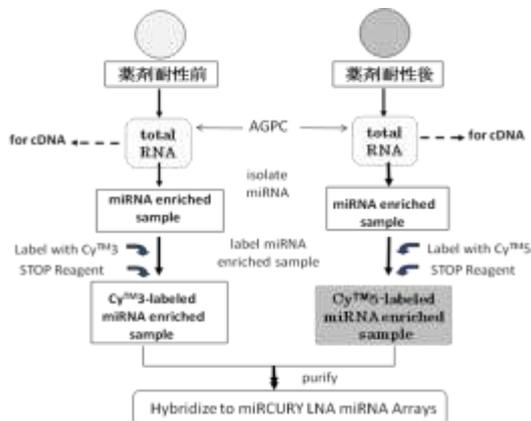
Nature 誌に miRNA の特定のクラスターが B 細胞リンパ腫の発症原因になることが示唆され(435:828, 2005)、癌研究の主要な焦点は今までの蛋白質をコード化する遺伝子だけでなく、今後は miRNA などの非コード化遺伝子の存在も考慮に入れる必要がある。miRNA の発現プロファイルは癌の分類診断だけでなく、治療法にも影響することは確実で、miRNA は small molecules with big function である。

①同一組織由来ないし、同一患者由来の薬剤耐性獲得前後の白血病細胞を使用する。アレイのバイアス減少と感度増強目的で成熟 miRNA の濃縮と 2 色蛍光ラベルを行い、LNA(locked nucleic acid)プローブを利用し

て作成したマイクロアレイを採用する。

②発現に違いが認められた miRNA について、標的遺伝子探しを行う。特異的な発現をする miRNA が明らかになっても miRNA の標的となる遺伝子を予想するのは困難ある。miRNA は約 22ヌクレオチドであるが、はじめの 8ヌクレオチドが標的 mRNA の 3' UTR の配列を認識すると考えられている。このような配列は数多くあり、その中から同じ細胞で発現していて miRNA が結合できる標的を割り出すことが必要である。miRNA の標的探しは、取れた miRNA のはじめの 8ヌクレオチドと完全に相補的な配列であること、近傍の配列が安定な 2重構造を組まずに接触可能であることを指標にして、データベースの全ての mRNA の 3' UTR を in silico で予測して、P糖タンパクやテロメレースを含んだ標的と考えられる遺伝子を決定する。

③多くの miRNA は標的遺伝子抑制的に機能していると考えられる。耐性細胞で発現が増大した miRNA は P糖タンパクやテロメレースの発現を抑制している mRNA を標的とする可能性が考えられる。一方感受性細胞で発現が増大した miRNA は P糖タンパクやテロメレースなどを含む mRNA を標的にすると考えられる。アレイで候補になった miRNA が P糖タンパクやテロメレースの mRNA の翻訳抑制に関わるか否かの機能解析を行う。



(1)細胞：液体窒素に保存してある各種タイプの白血病検体から、CD34 陽性、CD38 陰性細胞の白血病幹細胞を免疫ビーズ法で選択的に分離採取する。(2)抽出：AGPC 法で全 RNA を抽出後 2 分し、半分は cDNA アレイ用に保存し残りをスモール RNA 特異的抽出キット (Ambion 社 flashPAGE システム) で 40nts 以下の成熟 miRNA を抽出する。(3)ラベル：アンビオン社の mirVANAmiRNA labeling kit で非修飾のヌクレオチドとアミン修飾されたヌクレオチドの混合物を用い、サンプル中の miRNA の 3' 末端に 20~50 塩基のポリ A テールを伸ばしながらアミノアシル基を取り込ませる。アミン修飾された miRNA を精製後、GE 社の N-hydroxy succinimide (NHS) エステルの CyDye を用いて Cy3、Cy5 をカップリングさせる。または mirus biocorporation 社のランダム蛍光色素ラベルキットでもラベルを試みる。(4)マイクロアレイ：LNA (locked nucleic acid) プローブを利用して作成した Exiqon 社の miRCURY LNA miRNA Arrays を用いる。LNA はリボ核酸の 2' 位の酸素原子と 4' 位の炭素原子が架橋した 2つの環状構造を持つ核酸である。DNA オリゴを用いたマイクロアレイとは違い LNA は DNA/RNA に対する熱安定性が上昇し、高い結合親和性を持つため 1 塩基のミスマッチも検出可能である。またガラススライドが可能な全スキャナーに対応している。(5)データベース解析：候補となった miRNA のはじめの 8ヌクレオチドと完全に相補的な配列 (8 番目は GU ペアを認める) であること、近傍の配列が安定な 2重構造を組まずに接触可能であることを指標にして、テロメレースと P糖タンパク遺伝子に焦点を絞り、in silico で予測して標的遺伝子を決定する。

## (6)miRNA 機能解析

### ①ノックダウン実験での検討

Step 1 : 候補の miRNA からノックダウンプローブとコントロールプローブをデザイン。

Step 2 : in vitro で薬剤耐性細胞に遺伝子導入。

Step 3 : テロメラーゼ活性や, Western blot で hTERT タンパク, P 糖タンパクのレベルを確認。

またテロメラーゼや P 糖タンパクの 3' UTR の配列を pGL4 レポーターベクターに挿入したコンストラクトを作成後、候補となった内在性 miRNA に対するノックダウンプローブと遺伝子導入してレポータータンパクの増加をみる。また白血病芽球コロニー法でも確認する。

## ②過剰発現による検討

候補となったいくつかの miRNA について成熟型 miRNA の導入、miRNA 前駆体、miRNA 発現ベクター (pol II 系または pol III 系) による導入。テロメラーゼや P 糖タンパクの 3' UTR の配列を pGL4 ベクターに挿入したコンストラクトを作成し、候補となった miRNA とともに遺伝子導入し、ルシフェラーゼの発現が抑えられることで miRNA の特異性を確認。白血病芽球コロニー法での確認も併用する。

## 4. 研究成果

科学研究費の支援により、P 糖蛋白 (Pgp) が強発現している白血病細胞ではテロメラーゼ蛋白の発現増加も見られ、いずれも転写因子 STAT5 が関与していることを見出し報告した (Activation of STAT5 confers imatinib resistance on leukemic cells through the transcription of hTERT and MDR-1. Cellular Signalling, 23:1119-1127, 2011)。すなわち P 糖蛋白発現とテロメラーゼ蛋白発現の増強が STAT5 を介して薬剤耐性に関与する可能性が考えられる。miRNA のマイクロアレイを行い、テロメラーゼに的を絞った機能解析を目的としたが、その結果やメチレーション解析

の結果等を基にして、癌幹細胞を標的とした新たな薬剤耐性克服の治療戦略を開発することを目指している。予備実験として白血病幹細胞の性質を持った K562 細胞で薬剤耐性獲得前後の細胞を使用した。薬剤耐性獲得前後のプロモーター領域のメチレーションの違いをメチレーション特異的抗体でクロマチン免疫沈降後アレイ解析を行った。この結果、STAT5, HSP90 のプロモーターの低メチル化が顕著であった。これは我々が既に報告した STAT5, HSP90 蛋白の発現増強の結果を裏付けるものであった (Cellular Signalling, 23:1119-1127, 2011)。テロメラーゼ遺伝子 (hTERT)、MDR1 遺伝子のプロモーターのメチル化は薬剤耐性獲得前後で特に変化はないことから、STAT5 の活性化による hTERT, MDR1 の蛋白発現増強が起こっていることが示唆された。

骨髄線維症 (PMF) から慢性骨髄性白血病 (CML) に移行した症例を経験したため、実際の症例から免疫ビーズ法で CD34 陽性、CD38 陰性細胞の白血病幹細胞を濃縮し、AGPC 法で全 RNA を抽出後 2 分し、cDNA アレイ用と miRNA の解析を行った。CML 発症に伴い IL8, Bcl2, MMP9 の発現増強が認められ、miR664 の発現低下がみとめられた。関連事項を論文に報告した (Emergence of a BCR-ABL Translocation in a Patient with the JAK2V617F Mutation: Evidence for Secondary Acquisition of BCR-ABL in the JAK2V617F Clone. J.C.O. in press).

## 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 12 件)

① Yamada O, Mahfoudhi E, Plo I, Ozaki, K, Nakatake M, Akiyama M, Yamada H, Kawauchi K and Vainchenker W. Emergence of a Variant BCR-ABL Translocation, t(9;22;21), in a Patient with the JAK2V617F Mutation:

Evidence for Secondary Acquisition of BCR-ABL in the JAK2V617F Clone. Journal of Clinical Oncology. 2013 in press.

② Yamada O. and Kawauchi K. The role of JAK-STAT and related signals for telomerase activation in hematologic malignancies. JAK-STAT journal in press.

③ 勝見重昭、川内喜代隆、尾崎幸次、清水 悟、木村 利美、泉二登志子、山田 修. 急性骨髄性白血病の分子病態の解析. 癌と化学療法 2013 印刷中

④ Yamada O. Telomeres and telomerase in hematology (Review). The Journal of Tokyo Women's Medical University. 83, Extra 88-106, 2013.

⑤ Sugishita Y. Yamada O et al. Amplification of the human epidermal growth factor receptor 2 gene in differentiated thyroid cancer correlates with telomere shortening. International Journal of Oncology. 42: 1589-1596, 2013

⑥ Yamada O, Ozaki K, Akiyama M and Kawauchi K. JAK-STAT and JAK-PI3K-mTORC1 pathways regulate telomerase transcriptionally and post-translationally in ATL cells. Molecular Cancer Therapeutics 11:1112-21, 2012.

⑦ Yamada O, Ozaki K, Furukawa T, Machida M, Wang YH, Motoji T, et al. Activation of STAT5 confers imatinib resistance on leukemic cells through the transcription of TERT and MDR1. Cellular Signalling. 23:1119-27, 2011.

⑧ Akiyama M, Kawano T, Mikami-Terao Y, Agawa-Ohta M, Yamada O, Ida H, Yamada H. Erythropoietin activates telomerase through transcriptional and posttranscriptional regulation in human erythroleukemic JAS-REN-A cells. Leukemia Research. 35: 416-418, 2011.

⑨ 杉下佳之、神森眞、山田 修、鈴木茂一、山崎和子、福森龍也 ほか. Telomere 長解析と、Telomerase, HER2/neu の発現による甲状腺癌の補助診断. 内分泌外科 28:226-31, 2011.

⑩ Yamada O, Ozaki K, Nakatake N, Kakiuchi Y, Akiyama M, Mitsuishi T, et al. Akt and PKC are involved not only in upregulation

of telomerase activity but also in cell differentiation-related function via mTORC2 in leukemia cells. Histochem Cell Biol. 134:555-63, 2010.

⑪ Mitsuishi T, Tokunaga K, Iwabu Y, Sata T, Kaneko T, Ohara K, Yamada O. et al. Combined analysis of cell growth and apoptosis-regulating proteins in HPVs associated anogenital tumors. BMC Cancer 10:118-28, 2010.

⑫ 縣宗彦, 鮫島勇一, 小田哲朗, 近藤年昭, 石山みどり, 安並毅, 山田 修 ほか. 多発性骨髄腫に対する thalidomide 療法の効果に關与する因子と効果判定時期. 臨床血液. 51:189-95, 2010.

[学会発表] (計 8 件)

① 伊藤久敬, 山田 修, 吉良有二, 田中建志, 耳介鍼刺激の摂食関連サイトカインと体重への影響, 第 6 4 回日本東洋医学会学術総会. 2013. 5, 31, 鹿児島。

② Yamada Osamu, Ozaki Kohji, Nakatake Mayuka et al. Emergence of a BCR-ABL Translocation in a Patient with the JAK2V617F Mutation: Evidence for Secondary Acquisition of BCR-ABL in the JAK2V617F Clone. 第 7 4 回日本血液学会総会、2012. 10. 19, 京都

③ Imai Y, Ohta Eri, Wang Y, Ding Y, Yamada O et al. MLL is a novel target of anti-myeloma therapy and it is degraded by inhibitors of histone deacetylase (HDAC) and HSP90. 第 7 3 回日本血液学会総会、2011. 10. 15, 名古屋

④ Yamada Osamu, Ozaki Kohji, Kawauchi Kiyotaka et al. Measurement of telomere length using quantitative PCR in hematologic cells. 第 7 3 回日本血液学会総会、2011. 10. 15, 名古屋

⑤ Kawauchi Kiyotaka and Yamada Osamu. JAK-STAT and JAK-PI3K-mTORC1 pathways regulate telomerase transcriptionally and post-translationally in ATL cells. 第 7 3 回日本血液学会総会、2011. 10. 15, 名古屋

⑥ Shiseki Masayuki, Yamada Osamu et al. Measurement of telomere length using quantitative PCR in hematologic cells. 第 7 3 回日本血液学会総会、2011. 10. 15, 名古屋

⑦杉下 佳之, 神森 眞, 山田 修 外9名  
テロメア長解析と、テロメレース、HER2/neu  
の発現による甲状腺癌の補助診断.  
第23回日本内分泌外科学会総会 2011. 7. 7,  
東京

⑧勝見重昭、尾崎幸次、秋山政晴、川内喜代  
隆、泉二登志子、山田修、急性骨髄性白血病  
細胞の薬剤感受性とテロメレース、第72日  
本血液学会学術集会, 2010. 9. 14, 横浜

〔産業財産権〕

○出願状況 (計2件)

名称：テロメア配列増幅用プライマー  
発明者：山田 修  
権利者：東京女子医科大学  
種類：特許権  
番号：2011-226187、PCT/JP2012/075242  
出願年月日：2011年10月13日、2013年5  
月9日。  
国内外の別：国内および国際(PCT 国際出願)

○取得状況 (計1件)

名称：テロメア配列増幅用プライマー  
発明者：山田 修  
権利者：東京女子医科大学  
種類：特許権  
番号：登録番号未定  
取得年月日：特許査定中  
国内外の別：国内

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 修 (YAMADA OSAMU)  
東京女子医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：30167712