

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 3 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591048

研究課題名（和文）白血病細胞における RCAN1 依存性の細胞機能脱制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）Clarification of RCAN1-mediated deregulation of cellular functions in leukemia cells

研究代表者

永井 正 (NAGAI TADASHI)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40237483

研究成果の概要(和文)：RCAN1 は calcineurin 阻害作用など重要な生体調節機能を有している。本研究では、RCAN1 が白血病細胞に異所性に発現していることを明らかにした。さらに、1) RCAN1 は低濃度血清下など望ましくない環境下での白血病細胞増殖に重要であること、2) calcineurin-NFAT 系が白血病細胞における RCAN1 の作用標的の一つであることを示した。また、RCAN1 と直接結合する複数の候補分子を同定した。

研究成果の概要(英文)：RCAN1 is involved in the regulation of cell functions including inhibition of calcineurin. In this study, we found that *RCAN1* is extraordinarily expressed in leukemia cells. Furthermore, we revealed that RCAN1 is important for cell growth, particularly under undesirable conditions of low serum concentration. In leukemia cells, calcineurin-NFAT signaling has been shown to be one of the targets of RCAN1. We also identified several molecules, which could directly bind with RCAN1.

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
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：RCAN1, 急性骨髄性白血病, HL60, calcineurin, NFAT

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病(AML)細胞では、増殖シグナルの恒常的活性化や転写調節機序の脱制御による遺伝子発現異常などが見出されている。分子病態の解明が進められるに従い、その知見を背景とした分子標的治療の開発も精力的に行われてきた。しかしながら、AMLにおける分子異常は多岐に及んでおり、現在までに解明された分子異常はその一部にすぎない。増殖亢進、分化障害の両面から分子異常をさらに解析し、有効な治療標的

子を見出すことが求められている。

RCAN1 は、従来より Ca^{2+} /Calmodulin 依存性セリン・スレオニン脱リン酸化酵素 calcineurin の活性阻害作用が知られている分子である。しかし、NF-AT や NF- κ B 転写因子活性の調節など、その多彩な機能が明らかにされてきた。特に、炎症、血管新生、心臓形成などとの関連やアルツハイマー病、Down 症候群における役割が注目されている。さらに、細胞増殖誘導作用にも研究の焦点が当てられており、RCAN1 が calcineurin 抑制を介さ

ない機序により細胞増殖を誘導するとの興味深い報告もみられた。しかしながら、RCAN1 の発現が Down 症候群における腫瘍発生率の低下に関与しているとの報告もあり、RCAN1 の細胞増殖および腫瘍発生・進展に対する影響は RCAN1 のアイソフォームの違いや細胞の種類によって異なるものと理解されている。一方、骨髄や脾臓など造血関連臓器における RCAN1 の発現レベルは極めて低く、血液細胞における RCAN1 の役割については、ほとんど解析がなされていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、さまざまな角度から白血病細胞の分子異常を解析し、その過程で新たな治療標的分子を同定することを目指した。そのため、細胞増殖に対する機能が注目されている RCAN1 に着目し、その白血病細胞における役割を明らかにすることを目的とした。さらに、RCAN1 依存性シグナルにおける治療標的分子の探索をも目指した。

3. 研究の方法

(1) 白血病細胞株および多発性骨髄腫細胞株における RCAN1 発現量の検討：

①ヒト急性骨髄性白血病(AML)由来細胞株(THP-1、HL60、U937)、ヒト急性リンパ性白血病細胞株(Jurkat, Raji)、ヒト慢性骨髄性白血病(CML)急性期由来細胞株(KCL22、K562、KU812)およびヒト多発性骨髄腫由来細胞株(RPMI8226、U266)から総 RNA を調製した。Superscript II reverse transcriptase で cDNA を合成した後に、Reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR)法により各細胞株における RCAN1 mRNA の発現を検討した。さらに、総蛋白を調製し、抗 RCAN1 抗体を用いた Western Blot 法で RCAN1 蛋白の発現についても確認した。

②AML 患者および CML 患者骨髄より単核球を分離し、総 RNA を調製する。RCAN1 mRNA の発現を RT-PCR 法および real-time PCR 法で検討した。real-time PCR 法については ABI PRISM 7700 system を用いて解析した。

(2) ヒト正常造血細胞における RCAN1 発現：ヒト正常骨髄単核細胞を FACSaria (Becton Dickinson)を用いた FACS により CD34、CD38、CD14、CD16、CD33 を発現マーカーとして分離した。各細胞分画における RCAN1 mRNA 発現を RT-PCR 法および real-time PCR

法により検討した。

(3) AML 細胞における RCAN1 発現抑制：pLL3.7 に 3 種類の RCAN1 shRNA をそれぞれ導入し、RCAN1 shRNA 発現ベクターを作成した。HL60 に RCAN1 shRNA 発現ベクターを導入し、RCAN1 の発現抑制を Western Blot 法で確認した。RCAN1 発現抑制細胞による細胞増殖、アポトーシスシグナリングの変化をを検討した。

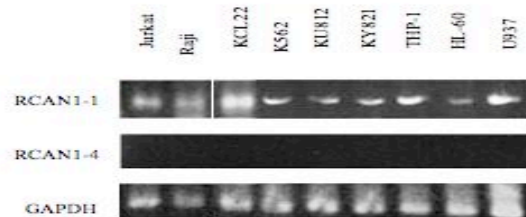
(4) RCAN1 抑制による Calcineurin-NFAT signaling への影響：RCAN1 shRNA により HL60 細胞における RCAN1 発現を抑制し、calcineurin 活性の変化を測定した。さらに、細胞質および核抽出液における NFAT4 蛋白量を Western Blot 法で検討した。また、RCAN1 発現抑制による変化が、calcineurin 阻害作用を有する cyclosporine A により解除されるか検討した。

(5) 多発性骨髄腫細胞における RCAN1 発現抑制：RPMI8226 および U266 に RCAN1 shRNA 発現ベクターを導入し、細胞の生存・増殖について検討した。

(6) Two-hybrid screening 法による RCAN1 結合分子の探索：RCAN1 cDNA を Bait とし、K562 細胞遺伝子ライブラリーを Prey として Yeast two-hybrid screening を行った。

4. 研究成果

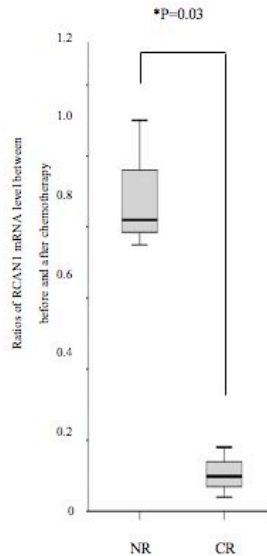
(1) 造血器腫瘍細胞株における RCAN1 の発現：検討した全ての細胞株で RCAN1 mRNA の発現が RT-PCR 法で確認された。発現していた RCAN1 のアイソフォームは、RCAN1-1 のみであった。



さらに、Western Blot 法により蛋白レベルでの発現も確認された。

(2) AML 患者および CML 患者骨髄における RCAN1 の発現：

6 例の新規 AML 患者骨髄における RCAN1 mRNA 発現量を検討したところ、完全寛解達成時に著明に低下していた。一方、非寛解例では高値のまま推移した。



CML では、慢性期と比較して移行期および急性期症例の骨髄で RCAN1 発現が増加していた。

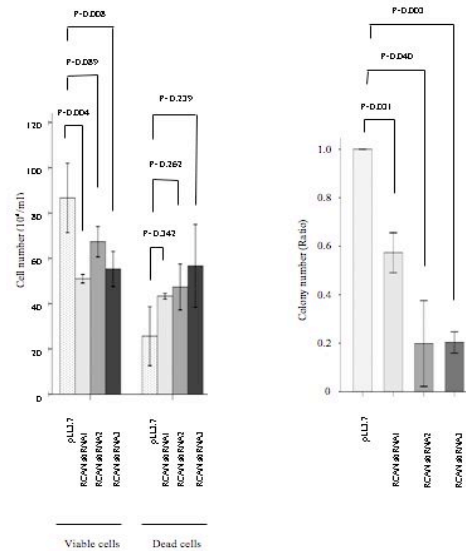
(3) 正常造血細胞における RCAN1 発現：

正常骨髄より単離した単核細胞を FACS により CD34+CD38-、CD34+CD38+、CD33+CD14-CD16-、CD33+CD14+ および CD33+CD16+ の各分画に分け、RCAN1 の発現を RT-PCR および real-time PCR で検討したところ、全ての分画でほとんど発現を認めなかった。以上の結果より、RCAN1 は正常造血細胞では、幹細胞および前駆細胞レベルも含めて発現していないにも関わらず、急性白血病および CML 急性期では異所性に発現していると結論づけた。

(4) RCAN1 発現抑制および強制増強による影響：

RCAN1 shRNA により HL60 細胞における RCAN1 の発現を抑制した。しかしながら、RCAN1 発現抑制による細胞増殖への影響やアポトーシスの誘導は認められなかった。さらに、マウス IL-3 依存性非白血病骨髄性細胞株 32D に RCAN1 の発現ベクターを導入したところ、L-3 存在下、非存在下のいずれにおいても増殖への影響を認めなかった。従って、RCAN1 は白血病、非白血病のいずれの細胞

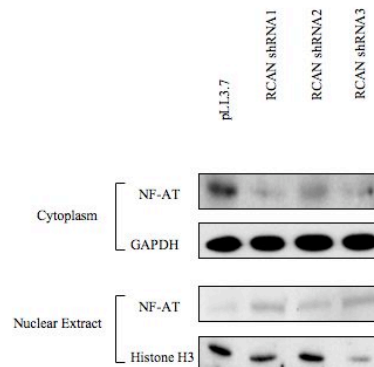
においても、その増殖に極めて重要であるとの結果が得られなかった。しかしながら、培地中の血清濃度を 1% に下げると、RCAN1 発現抑制により、a) 生存細胞数の低下および死細胞数の増加が有意となる、b) メチルセルロース半寒天培地を用いたコロニーアッセイで、RCAN1 発現抑制細胞でのコロニー形成能の低下を認める、c) cleaved caspases や cleaved PARP 量の増加を認め、アポトーシスの誘導が示唆される等の所見が得られた。



この結果は、低血清などの細胞生存に不利な環境において、RCAN1 は白血病細胞の生存に重要であることを示唆している。

(5) Calcineurin-NFAT signaling は白血病細胞における RCAN1 の作用標的である：

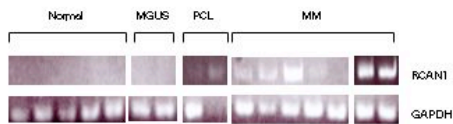
HL60 細胞に RCAN1 shRNA を導入したところ、a) calcineurin 活性値の有意な増加、b) 細胞質における NFAT4 蛋白質量の減少および c) 核抽出液における NFAT4 蛋白質量の増加を認めた。



従って、HL60 細胞において、RCAN1 は calcineurin 活性抑制を介して NFAT4 の核移行を阻害していると考えられた。しかしながら、calcineurin 活性阻害作用を有する cyclosporin A を加えても、RCAN1 発現抑制細胞における増殖抑制が回復されなかった。従って、RCAN1 による calcineurin 抑制は、RCAN1 の示す細胞増殖抑制効果と無関係である可能性が高い。

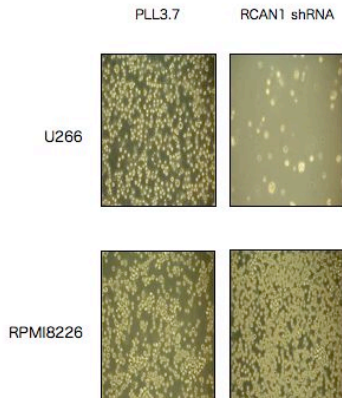
(6) 多発性骨髄腫細胞における RCAN1 の異所性発現:

ヒト多発性骨髄腫由来細胞株 RPMI8226 および U266 において、RT-PCR 法により RCAN1-1 アイソフォームの発現が確認された。さらに、骨髄細胞から形質細胞の表面マーカーである CD138 陽性分画を単離し、RCAN1 の発現を検討した。その結果、5 例の健常者および 2 例の良性単クローン性ガンマグロブリン血症患者全例で発現がみられなかった。一方、7 例中 6 例の多発性骨髄腫患者と 2 例の形質細胞白血病患者全例で RCAN1 の発現を認めた。この結果は、RCAN1 は多発性骨髄腫細胞においても異所性に発現していることを示している。



(7) RCAN1 発現抑制による多発性骨髄腫細胞の生存に対する影響:

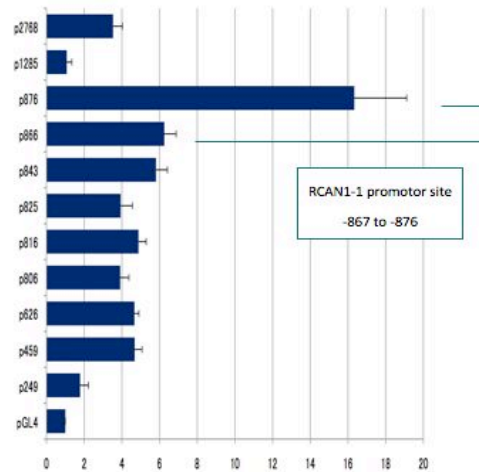
RPMI8226 細胞へ RCAN1 shRNA 発現ベクターを導入したところ、細胞増殖の変化は全く認めなかった。しかしながら、U266 細胞に導入したところ、細胞のほとんどが死滅した。PLL3.7 空ベクターの導入では、RPMI8226、U266 とともに細胞増殖への影響はなかった。



従って、多発性骨髄腫細胞においては、RCAN1 がその生存・増殖に極めて重要な役割を果たしている細胞が存在していることが明らかとなった。

(8) ヒト RCAN1 発現調節機序の解析:

-2768bp までのヒト RCAN1 遺伝子プロモーター領域を pGL4.17[luc2/Neo]ベクターに挿入し、さらに種々の deletion mutants を作成した。各ベクターを KCL22 細胞に導入し、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、-876 bp から -866 bp まで削ると著明なルシフェラーゼ活性の低下を認めた。従って、この領域に RCAN1 プロモーターの活性化に重要な配列が存在していると推測された。



次に、-876 bp ~ -866 bp の領域に連続的に変異を挿入した一連の変異体を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。しかしながら、いずれの変異体でもルシフェラーゼ活性は低下せず、特定の配列の同定は困難であった。一方、-459bp から -249bp への削除によってもルシフェラーゼ活性の低下を認めた。この領域には TGIF、HNF-4 および USF に対する結合配列が存在していることから、RCAN1 遺伝子発現に対するこれらの転写因子の関与が注目される。

(9) RCAN1 結合分子の同定

RCAN1 cDNA を Bait とし、K562 細胞遺伝子ライブラリーを Prey として Yeast two-hybrid screening を行った。その結果、下表に示す分子が同定された。

Gene	Description
HEMK1	HemK methyltransferase
HINT1	histidine triad nucleotide-binding protein
HINT2	histidine triad nucleotide-binding protein
PCBP1	poly(rC)-binding protein
PDLIM7	LIM domain-containing protein
PHGDH	phosphoglycerate dehydrogenase
RINT1	Rad50-interacting protein
ARA54	coactivator for androgen-dependent transcription
ZNF426	zinc finger protein

特に癌抑制分子として知られる HINT1, HINT2 および LINT1 に注目し、RCAN1 との結合を免疫沈降法で確認した。しかしながら、*in vitro translation* で産生した蛋白、pMX 発現ベクターを用いて細胞内で発現させた蛋白のいずれの場合も、RCAN1 との沈降は明らかではなかった。今後は、他の分子との結合を免疫沈降で確認する必要がある。

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 11 件)

- (1) Nagai, T., Ohmine, K., Fujiwara, S., Uesawa, M., Sakurai, C., and Ozawa, K.: Combination of tipifarnib and rapamycin synergistically inhibits the growth of leukemia cells and overcomes resistance to tipifarnib via alteration of cellular signaling pathways. *Leukemia Res.* 査読有 34: 1057-1063, 2010. DOI: 10.1016/j.leukres.
- (2) Nagai, T., Takeuchi, J., Usui, N. 他 17 名、1 番目: Imatinib for Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia: Results of a Prospective Study in Japan. *Int J Hematol.* 査読有 92: 111-117, 2010. DOI: 10.1007/s12185-010-0621-x.
- (3) Tatara, R., Nagai, T., Kobayashi, H., Hatano, K., Suzuki, T., Muroi, K., and Ozawa, K. AA amyloidosis associated with macroglobulinemia. (Letter) *Int J Hematol.* 査読有 92: 675-677, 2010. DOI: 10.1007/s12185-010-0700-z.
- (4) Sato, K., Ozaki, K., Matsuyama, T., Ohmine, K., Suzuki, T., Mori, M., Nagai, T., Muroi, K., and Ozawa, K.: Incidental carcinomas detected by PET/CT scans in patients with malignant lymphoma. *Int J Hematol.* 査読有 92: 647-650, 2010. DOI: 10.1007/s12185-010-0702-x.
- (5) Yoshida, K., Nagai, T., Ohmine, K., Uesawa, M., Sripayap, P., Ishida, Y., and Ozawa, K.: Vincristine potentiates the anti-proliferative effect of an aurora kinase inhibitor, VE-465, in myeloid leukemia cells. *Biochem. Pharmacol.* 査読有 82: 1884-1890, 2011. DOI: 10.1016/j.bcp.
- (6) Kikuchi, Y., Kume, A., Urabe, M., Mizukami, H., Suzuki, T., Ozaki, K., Nagai, T., and Ozawa, K.: Reciprocal upregulation of Notch signaling molecules in hematopoietic progenitor and mesenchymal stromal cells. *J Stem Cells Regenerative Med.* 査読有 7: 61-68, 2011. <http://www.pubstemcell.com/monthly/007020300010.htm>
- (7) Meguro, A., Nagai, T., Ozawa, K. 他 25 名 26 番目: Rituximab plus 70% cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone for Japanese patients with diffuse large B-cell lymphoma aged 70 years and older. *Leuk Lymphoma.* 査読有 53: 43-49, 2012. DOI: 10.3109/10428194.
- (8) Oka, S., Nagai, T., Hanafusa, T. 他 9 名、10 番目: Prediction of progression from refractory cytopenia with unilineage dysplasia by analysis of bone marrow blast cell composition. *J Clin. Exp. Hematop.* 査読有 52: 63-66, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.3960/jslrt.52.6>
- (9) Sato, K., Nagai, T., Izumi, T., Ohmine, K., Ozaki, K., Muroi, K., and Ozawa, K.: Rituximab-induced interstitial pneumonia due to CD8-positive T-cell infiltration. *Acta Haematologica.* 査読有 128: 107-109, 2012. DOI: 10.1159/000338259.
- (10) Kobayashi, H., Nagai, T., Muroi, K. 他 8 名、9 番目: Autologous hematopoietic recovery with aberrant antigen expression after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin. Exp. Hematop.* 査読有 52: 81-83, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.3960/jslrt.52.81>
- (11) Nagai, T., Suzuki, T., Komatsu, N., Hosokawa, K., Nakao, S., and Ozawa, K.: Alteration of chromosome 13 abnormalities after therapeutic hematopoiesis recovery in myelodysplastic syndrome. *Open J Hematol.*

査 読 有 3-7, 2012. DOI:
10.13055/ojhmt_3_1_7.121227

藤原 慎一郎(FUJIWARA SHIN-ICHIRO)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号：20438667

〔学会発表〕（計 8 件）

- (1) Fujiwara, S.: Extraordinary expression of RCAN1 – Crucial to leukemia progression. 第 72 回日本血液学会学術集会、2010
- (2) Fujiwara, S.: Crucial role of RCAN1 in leukemia progression. 第 69 回日本癌学会学術総会、2010
- (3) Uesawa, M.: Cloning of 5-azacitidine-resistant acute myeloid leukemia cell lines, THP-1/AR and HL60/AR. The 2nd JSH International Symposium, Nagasaki, 2011
- (4) Sripayap, P.: Cloning and characterization of 5-azacitidine-resistant human AML cell lines, THP-1/AR and HL60/A. 第 73 回日本血液学会学術集会、2011
- (5) Sripayap, P.: Histone deacetylase inhibitor romidepsin overcomes AZA-resistance in AZA-resistant cell lines. The 3rd JSH International Symposium, Kawagoe, Japan, 2012
- (6) Sripayap, P.: Overcoming resistance to 5-azacytidine in acute myeloid leukemia. The 54th Annual Meeting of American Society for Hematology, Atlanta, USA, 2012
- (7) Kobayashi, H.: Analysis of primary small intestinal lymphoma diagnosed with double-balloon endoscopy. 第 74 回日本血液学会学術集会、2012
- (8) Sripayap, P.: Histone deacetylase inhibitor romidepsin overcomes 5-azacytidine (AZA) resistance. 第 74 回日本血液学会学術集会、2012

6. 研究組織

(1)研究代表者

永井 正 (NAGAI TADASHI)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40237483

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者

大嶺 謙 (OHMINE KEN)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号：90316521