

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501344

研究課題名(和文)新規がん分子マーカーとしてのテロメア機能性RNAの解析

研究課題名(英文)Telomere repeat-containing RNA (TERRA), a possible molecular marker of leukemia

研究代表者

大屋敷 純子(Ohyashiki, Junko)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：20191950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、機能性RNAの一つとしてテロメア鎖を鋳型としたテロメア配列を有するRNA(Telomere repeat-containing RNA; TERRA)の存在が明らかになった。本研究ではTERRAの検出系を確立し、骨髄系腫瘍の治療薬として注目されている5-azacytidine(AZA)とTERRAの関係について解析した。その結果、AZA耐性細胞株のみならず、AZA抵抗性の患者骨髄細胞においてもTERRAの発現上昇を認め、TERRAの解析系はAZA耐性分子機構の解明のみならず、患者骨髄細胞を用いたAZA抵抗性の予測にも有用と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Telomere repeat-containing RNAs (TERRAs), which are RNAs that originate from telomeric DNA transcription, can associate with the telomeric chromatin, where they are proposed to function as negative regulators of telomere length. In the current study, we established a RNA-FISH method for TERRA, and investigated the possible association between TERRA and 5-azacytidine (AZA), which is currently approved for the treatment of myeloid neoplasms. We found a constitutive up-regulation of TERRA in 2 AZA-resistant cell lines as well as bone marrow cells obtained from 3 AZA-resistant patients. These findings indicate that the RNA-FISH method for TERRA is useful not only to better understand molecular mechanism of AZA resistant but also to estimate AZA-resistant patients in clinical practice.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：テロメアRNA 5-アザシチジン 骨髄異形成症候群

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、機能的 RNA の一つとしてテロメア C 鎖を鋳型としたテロメア配列を有する RNA(Telomere repeat-containing RNA; TERRA)の存在が明らかになった。TERRA はテロメアヘテロクロマチン構造の変化、テロメラーゼの制御などと関係していることが知られているが、その詳細は不明である。

(2) 一方、エピジェネティクス薬の代表である脱メチル化剤・5-azacytidine(AZA)は欧米ではすでに認可され、骨髄不全症候群の治療薬として期待されており、日本でも平成 23 年度から臨床応用されている。また HDAC 阻害剤も欧米では AZA との併用薬として注目されているが、これらの薬剤によるテロメアヘテロクロマチン構造の制御機構について実際の腫瘍細胞での証明はなされていない。TERRA は新規がん分子マーカーとしての有用性と同時にエピジェネティック分子標的薬の効果予測マーカーとしての可能性も期待される。

2. 研究の目的

本研究ではがん細胞における TERRA 定量系を確立し、新規分子マーカーとしての有用性を検証すると同時に、クロマチン構造の変化をもたらすエピジェネティック分子標的薬の効果予測診断への応用を検討する。

3. 研究の方法

(1) RNA-FISH による TERRA の局在証明: ヒト白血病細胞株(K562, U937, HL60)を用いて、RNA-FISH を行う。プローブは TERRA の配列(UUAGGG)に相補的な(TAACCC)7 の 5 末を Cy3 で標識したものを日本遺伝子研究所に外注して用いる。

(2) *in vitro* でのエピジェネティック分子標的薬 AZA による TERRA の解析:ヒト白血病細胞株(K562, U937, HL-60)、および新たに樹立した AZA 体制株 (R-U937, R-HL60)におけるメチル化度の検討とともに、TERRA の変化およびテロメア、テロメラーゼの動態を解析する。

(3)患者細胞での解析:テロメア短縮とゲノム不安定性と特徴とする骨髄不全症患者細胞を中心に造血器腫瘍細胞を用いて、TERRA とテロメア動態の側面から複雑型染色体異常との関係、脱メチル化剤による影響について解析し、TERRA の臨床的意義について総括する。

患者試料の採取と提供は研究協力者の血液内科スタッフが担当する。なお、本研究の実施に際しては平成 20 年 7 月 14 日に学内での倫理委員会の承認を得ている (IRB 承認番号 978 :造血器腫瘍を対象とする薬剤感受性試験)

4. 研究成果

(1) RNA-FISH による TERRA の局在と AZA による発現の誘導: 最初に白血病細胞株 U937およびヒト骨髄細胞を用いて TERRA の発現を RNA-FISH 法で解析した。当初の予想に反して、ヒト骨髄細胞では TERRA の foci は検出されず、また U937 においても細胞当たり 1~2 個のシグナルしか検出できなかった。そこで、U937 に AZA を添加し、経時的に観察したところ、72 時間後に多数のシグナルを認めた。このシグナルは RNase 処理により消失し、またテロメア結合蛋白 TRF2 と co-localize することより、テロメア DNA に結合した non-specific なシグナルではなく、TERRA 由来のシグナルと判断した。また、AZA 添加によるこの TERRA の変動に注目し、以下の検討を行った。

(2) 白血病細胞株におけるメチル化様式

本研究で用いた細胞株はその IC50 dose より AZA 感受性株 (U937, HL60)、AZA 低感受性株 (K562)、AZA 抵抗性株 (R-U937, R-HL60) に分類された。本研究と関連して特許を取得したメチル化度決定方法 (一分子蛍光分析によるメチル化度の決定方法: 特許第 5492696 号) を用いてメチル化度を測定したところ、AZA 低感受性ならびに抵抗性株ではゲノム全体の著しい低メチル化を認めた。また、メチレーションアレイによる解析ではこれらの細胞株ではプロモーター領域の脱メチル化というよりはむしろ gene body の脱メチル化であることが明らかになり、ゲノム不安定性との関係が示唆された。

(3) 白血病細胞株における TERRA の変化

U937 における TERRA のシグナルの変化を図 1 に示す。AZA 未添加時には TERRA はほとんど認められない。AZA 添加後 24 時間後では変化はないが、AZA 添加後 72 時間後に TERRA シグナルの増加を認める。一方、AZA 耐性株である R-U937 では AZA 添加の有無にかかわらず、恒常的に TERRA の発現上昇を認める。HL60、R-HL60 においても同様の変化を認めた。

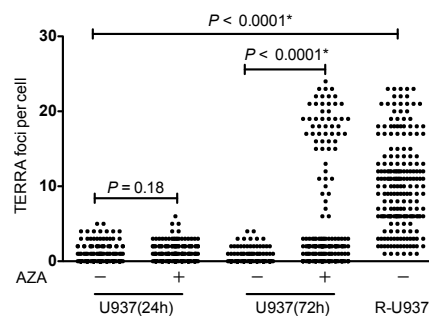


図1 U937 および R-U937 における TERRA の変化

一方、K562 細胞では AZA 添加の有無にかかわらず TERRA の発現は低かった。

(4) テロメア

これらの TERRA の変化がテロメア・テロメラーゼの制御とどう関係しているかを明らかにするために、AZA 添加によるテロメア短縮の誘導の有無を検討した。サザンブロット法による平均テロメア長の解析の結果、U937、HL60 の平均テロメア長はそれぞれ 12.5 Kb、10.3 Kb で、72 時間の AZA 存在下では U937、HL60 共にテロメアの短縮は誘導されなかった。一方、R-U937 のテロメア長は 7.3 Kb で親株と比べて有意に短縮していたのに対して、R-HL60 のテロメア長は親株と変わらず、テロメア短縮は認められなかった。なお、K562 の平均テロメア長は 5Kb と AZA 添加前より短縮しており、AZA 添加前後による変化は認められなかった。なお、これらの変化は 3D テロメア解析でも検証された。

(5) テロメラーゼ活性

次に AZA 添加によるテロメラーゼ活性について解析した(図2)。AZA 非添加時のテロメラーゼ活性レベルは細胞株によって様々であるが、U937、HL60、K562 共に AZA 添加により有意に活性が低下していた。しかしながら、TERRA の増加を認めない K562 でも活性低下を認めたことより、テロメラーゼ活性の制御は必ずしも TERRA のみで制御されているわけではないと考えられた。

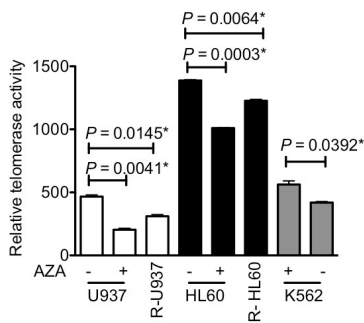


図2 テロメラーゼ活性の変化

(6) AZA 耐性獲得と ATM/BRCA1 経路

これらの一連の結果は、TERRA の発現上昇が必ずしもテロメラーゼの阻害によるテロメア短縮に結びついていないことを示している。そこで AZA 耐性細胞株における TERRA の恒常的活性化に注目し、AZA 耐性株を用いて研究を進めた。その結果、AZA 耐性細胞株の共通した特徴は①ゲノム全体の著しい低メチル化、②古典的ピリミジン経路の障害、③ATM/BRCA1 の恒常的活性化であることが明らかになった(Imanishi S, et al., Biochem Pharmacol. 2014 89(3): 361-369.)。ATM/BRCA1 経路の関与より DNA 損傷・修復シグナルの異常が AZA 耐性獲得において重要な役割を担っていると考えられ、TERRA の変動は DNA 損傷・修復系と連動していることが示唆された。

(7) 患者細胞における TERRA の発現

最終年度は患者細胞における解析を中心に研究を展開した。健常人骨髄が得られなかったため、対照として骨髄浸潤のないリンパ腫患者4名より得た骨髄を用いた。これらの骨髄細胞では TERRA シグナルはほとんど検出できなかった。また、未治療の骨髄異形成症候群(MDS)患者7例では数個の TERRA シグナルを検出したのみであった(図3)。

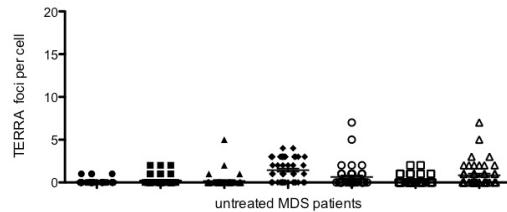


図3 未治療 MDS 患者骨髄における TERRA の発現

一方、AZA 治療後の患者5例について検討したところ、AZA 反応例の2例(図4左)に比べて AZA 抵抗性を示した3例(図4右)では有意に TERRA シグナルが増加していた。

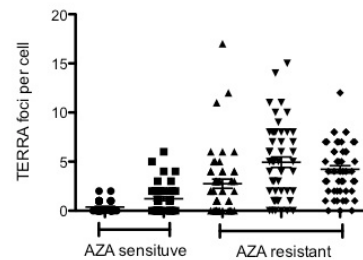


図4 AZA 治療例における TERRA の変化

以上、症例数は少ないが、臨床試料での解析結果は AZA 耐性細胞株における結果と整合性があり、本研究により確立された TERRA の解析系は AZA 耐性分子機構の解明のみならず、患者骨髄細胞を用いた AZA 抵抗性の予測にも有用と考えられた。

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 4 件)

- ① Umezumi T, Tadokoro H, Azuma K, Yoshizawa S, Ohayashiki K, Ohayashiki JH. Exosomal miR-135b shed from hypoxic multiple myeloma cells enhances angiogenesis by targeting factor-inhibiting HIF-1. Blood. 2014 124(25): 3748-3757. 査読有り
- ② Ohayashiki JH, Ohtsuki K, Mizoguchi I, Yoshimoto T, Katagiri S, Umezumi T, Ohayashiki K. Downregulated

microRNA-148b in circulating PBMCs in chronic myeloid leukemia patients with undetectable minimal residual disease: a possible biomarker to discontinue imatinib safely. Drug Des Devel Ther. 2014 8:1151-1159. 査読有り

③ Imanishi S, Umez T, Ohtsuki K, Kobayashi C, Ohyashiki K, Ohyashiki JH. Constitutive activation of the ATM/BRCA1 pathway prevents DNA damage-induced apoptosis in 5-azacytidine-resistant cell lines. Biochem Pharmacol. 2014 89(3): 361-369. 査読有り

④ Tadokoro H, Umez T, Ohyashiki K, Hirano T, Ohyashiki JH. Exosomes derived from hypoxic leukemia cells enhance tube formation in endothelial cells. J Biol Chem. 2013 288(48): 34343-34351. 査読有り

[学会発表] (計 6 件)

① Azuma K, Umez T, Imanishi S, Kobayashi C, Asano M, Katagiri S, Akahane D, Ohyashiki K, Ohyashiki JH. Telomere repeat-containing RNA (TERRA), a possible epigenetic biomarker of DNA damage phenotype in 5-azacytidine resistant leukemia cells. The 6th JSH International Symposium 2015 (Karuizawa, Japan, May 22, 2015)

② Asano M, Ohyashiki JH, Imanishi S, Kobayashi C, Yamamoto Y, Osuga M, Takahashi R, Umez T, Ohyashiki K: The Global DNA methylation as a predictor of 5-azacytidine in clinical responses. 第 73 回日本癌学会学術総会 (2014 年 9 月 25 日～27 日, 横浜)

③ Imanishi S, Umez T, Ohtsuki K, Kobayashi C, Ohyashiki K, Ohyashiki JH. Towards comprehensive understanding of the mechanism underlying resistance to 5-azacytidine. The 5th JSH International Symposium 2014 (Hamamatsu, Japan, May 24, 2014)

④ Asano M, Imanishi S, Umez T, Ohyashiki JH, Ohyashiki K: Clinical and experimental assessment of 5-azacytidine resistance in patients with MDS. 第 75 回日本血液学会学術総会 (2013 年 10 月 11 日～13 日、札幌)

⑤ Ohyashiki JH, Umez T, Kobayashi C, Imanishi S, Asano M, Ohyashiki K : A possible association between 5-azacytidine sensitivity and epigenetic modulation of telomere in human leukemia cells. 12th

International Symposium on MDS syndrome (Berlin, Germany, May8-11, 2013).

⑥ 大屋敷純子、梅津知宏、小林千晶、大屋敷一馬 DNA demethylation and up-regulation of telomere repeat-containing RNAs (TERRAs) in human leukemia cells 第 71 回日本癌学会学術総会 (2012 年 9 月 19-21 日、札幌)

[図書] (計 1 件)

① 大屋敷純子 他、篠原出版新社、入門腫瘍内科学、「細胞死；テロメア・テロメラーゼ」、2015、p39-41

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 1 件)

名称 : 一分子蛍光分析法による DNA メチル化度の決定方法

発明者 : 大屋敷純子、梅津 知宏

権利者 : 大屋敷一馬

種類 : 特許

番号 : 特許第 5 4 9 2 6 9 6 号

出願年月日 : 平成 2 2 年 7 月 2 6 日

取得年月日 : 平成 2 6 年 3 月 7 日

国内外の別 : 国内

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

大屋敷 純子 (OHYASHIKI, Junko)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 2 0 1 9 1 9 5 0

(2)連携研究者 :

梅津 知宏 (UMEZU, Tomohiro)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 4 0 3 8 5 5 4 7