

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510277

研究課題名(和文)急性骨髄性白血病の増殖制御に関わる新規非コードRNAの機能の解明

研究課題名(英文)The function of the novel noncoding RNA related to the growth control of myeloid leukemia cells

研究代表者

平野 哲男(Hirano, Tetsuo)

広島大学・総合科学研究科・助教

研究者番号：50228805

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：長鎖非コードRNAの1つ、CCDC26は小児急性骨髄性白血病においてコピー数増加の頻度が最も高い遺伝子である。我々は、骨髄性白血病細胞内でCCDC26が活発に転写されている領域を同定し、CCDC26転写物が細胞核に集積していることを発見した。CCDC26をノックダウンすると、無血清条件下で白血病細胞の生存期間が延長された。CCDC26ノックダウン細胞ではがん遺伝子である受容体型チロシンキナーゼKITの発現が顕著に上昇しており、この遺伝子がKITを通して骨髄性白血病細胞の増殖を制御していることが示唆された。この成果はCCDC26が変異した骨髄性白血病への治療への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：A long noncoding RNA, CCDC26, which is reportedly the most common gene whose copy number is altered in pediatric acute myeloid leukemia cells. We identified some transcripts abundant in myeloid leukemia cells within the CCDC26 genetic locus, and the concentration of these transcripts in the nuclei of the cells. Knock down of CCDC26 resulted in the prolonged survival period of the cells in the culture medium without serum. The expression of KIT, a well known oncogene functioning as a receptor tyrosine kinase, was significantly enhanced in the CCDC26-knock down cells, suggesting that this gene controls proliferation of the myeloid leukemia cells through KIT expression. These result might give an impact to the therapy strategy for myeloid leukemia with mutated CCDC26 genes.

研究分野：分子生物学

キーワード：機能性非コードRNA 骨髄性白血病 増殖制御 血清飢餓 遺伝子ノックダウン shRNA 受容体型チロシンキナーゼ KIT

1. 研究開始当初の背景

本研究は、急性骨髄性白血病 (AML) との関わりが新たに示唆された、機能不明の遺伝子 *CCDC26* に関する研究として行った。*CCDC26* は小児期 AML の患者群をゲノム規模で網羅的に調査した中で、低度コピー数増幅の見られる遺伝子のトップにランクされる遺伝子である (Radke, 2009)。これまでの研究により、AML 由来の培養細胞が増殖停止、分化する際に発現が停止することがわかっている (Hirano, 2008)。*CCDC26* はがん細胞の増殖制御に関係していると思われるが、この遺伝子配列上にコードされる仮想上のオープンリーディングフレームは既知のタンパク質との相同性がいっさい見られず、従って、非コード RNA (noncoding RNA: ncRNA) として機能すると考えられるが、研究開始時には詳細はまったく不明だった。

AML 由来細胞 HL-60 ではがん遺伝子の *MYC* が遺伝子コピー数増幅し、染色体外に飛び出し、微小二重染色体 (double minute chromosome; dmin) の形で存在している。Dmin 上には *MYC* 以外の遺伝子も存在し、これらは活発に転写されている (Hirano, 2009; Hirano, 2011)。これらの遺伝子は細胞のがん化に関連があると考えられる。Dmin は 200 万塩基対程度の amplicon から構成されており、それは 8q24 染色体部位の約 460 万塩基対にわたる範囲からいくつかの領域が切り出されて結合した物であった。その配列にはがん遺伝子の *MYC* 以外に *CCDC26*, *TRIB1*, *LOC38967*, *NSMCE2* の少なくとも 5 つの遺伝子がコードされていた。またこの中で、*CCDC26* は遺伝子構造が途中で破壊され、不完全な形で増幅しており、異常な転写物が強発現していた。培養条件下で薬剤処理によって HL-60 を分化させると、これらすべての遺伝子発現が抑えられた (Hirano, 2008)。

CCDC26 は小児期 AML 以外にも、低レベル神経膠腫 (low grade glioma) との関連もゲノムワイドの SNP 解析によって示されており (Shete, 2009)、複数のがんに関与していることが強く示唆される。

CCDC26 遺伝子のエキソン部分は、マウスなどの他の生物種での保存性もなく、遺伝子配列上にコードされる仮想上のオープンリーディングフレームは既存のタンパク質との相同性が全く見られない。従って、*CCDC26* は、タンパク質として翻訳されず、非コード RNA (ncRNA) として機能すると強く示唆されるが、現時点で詳細は不明である。この遺伝子座には *CCDC26* のイントロンにおいて発現している ncRNA が別に存在しており、生物種間での高い保存性が見られる。また、一部の AML の患者においてはゲノム上で、*CCDC26* 遺伝子座の破壊がおこっている。これらのことからこの遺伝子座においてがん細胞の増殖にとって重要なのは *CCDC26* mRNA ではなく、この部分にコードされた ncRNA である可能性もある。

2. 研究の目的

本研究は、*CCDC26* 遺伝子座からの転写物の全容を明らかにし、その機能を解析することを目的とした。そのため約 35 万塩基対にわたる *CCDC26* 遺伝子座からの転写物の全容を明らかにし、この遺伝子の機能を解析することを行った。

3. 研究の方法

CCDC26 遺伝子座から転写される転写物の網羅的な解析 *CCDC26* 遺伝子座全域において発現している RNA を公開されている骨髄性白血病細胞株 K562 の転写物、ヒストン修飾地図に関するデータベースを解析した。これらの転写物の細胞核局在を調べた。この情報に基づき、目的の機能を持つ転写物をノックダウンすることによって、RNA 干渉法 (RNAi) を用いて調べた。細胞増殖と分化形質に影響があるか、細胞の増殖能が変化するかを調べた。Gene チップを用いた DNA マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルの解析を行い、ノックダウン細胞と非ノックダウン細胞 (対照細胞) の間で遺伝子発現の変化を網羅的に調べた。発現の変化はリアルタイム PCR によっても確認した。

4. 研究成果

(1) 転写物、ヒストン修飾地図に関する公開されているデータベースを解析し、*CCDC26* 遺伝子領域において骨髄性白血病細胞内で活発に転写されている領域を同定した。これには、*CCDC26* 遺伝子自体以外にイントロン領域 2 箇所と *CCDC26* 遺伝子の上流に隣接した遺伝子間領域が該当した。また、それらは 7 種類の急性白血病細胞株、1 種類の急性単球性白血病細胞株、4 種類の慢性骨髄性白血病細胞およびリンパ腫由来の培養細胞株で活発に転写されており、また、すべての骨髄性白血病患者由来の骨髄細胞で、程度の差はあれ、発現していた。さらに *CCDC26* 遺伝子と随伴転写物は細胞核に局在していた。これらの結果から、*CCDC26* 遺伝子領域からの転写は骨髄系細胞に限定されるという制御を受けており、これらの分化細胞において一定の機能を持つことが示唆された。ノーザンプロットの結果、これらの転写物のひとつは全長が 10 キロ塩基対長以上にわたっていることがわかった。転写産物が通常の mRNA より長いことは、機能性非コード RNA のひとつの特徴であり、転写物の配列からは 100 アミノ酸以上のタンパク質がコードされないことを含め、この遺伝子座からの転写産物が機能性 RNA であることを支持する。

(2) ヒトとマウスとのシクエンシー比較、および局所的なホモロジー解析の結果、*CCDC26* 遺伝子のマウスホモロジーと考えられる遺伝子座を同定した。この領域はマウスだけでなく、イヌ、ウマ、ウシなど他の哺乳動物に

においても保存されていた。マウス白血病細胞株におけるこの転写物の存在を調べた結果、ヒト白血病細胞と同様、骨髄系細胞にのみ発現が見られ、リンパ系細胞やマクロファージ由来の細胞株においては発現していなかった。正常組織における発現では、骨髄、胸腺で発現しており、また、予想外なことに、精巢で非常に強い発現が見られた。これらのことは *CCDC26* マウス相同遺伝子の存在と、その新たな機能を示唆している。

(3)慢性骨髄性白血病細胞株 K562 において強く発現している *CCDC26* 遺伝子の siRNA によるノックダウンをショートヘアピン RNA ベクター (STRATAGENE 社が販売しているベクター GeneEraser を白血病細胞用に改変して作成した) を用いて行った。その結果、*CCDC26* 遺伝子の発現が 2%以下に恒常的に抑制されたクローンが 4 株単離できた。*CCDC26* 遺伝子のノックダウンに伴い、その遺伝子のイントロン内で活発に転写されている転写物、および、周辺遺伝子が転写抑制を受けたことが観察され、通常の RNAi による遺伝子転写後抑制 (PTGS)ではなく、RNAi による遺伝子抑制 (TGS)が起こったことが示された。このような現象の背景には *CCDC26* 遺伝子座全体を制御する転写調節機構が存在する可能性もあり、興味深い。また、*CCDC26* 遺伝子ノックダウン株において、*CCDC26* 遺伝子の下流遺伝子座に存在する *MYC* および *PVT1* の発現には変化が見られなかった。

(4)上記のノックダウン株 4 株は全てにおいて、K562 親株および対照細胞と比較して、高濃度血清条件下での増殖速度に顕著な低下が観察された。ところが、0.5%以下の低濃度血清条件下でこれらのクローンを培養すると、高濃度血清条件下とは逆に、すべての *CCDC26* ノックダウン株が対照細胞よりも早く増殖し、対照細胞が死滅する 7 日間培養後も多くが生き残っていた。また、無血清条件下では、すべての細胞は増殖しなくなるが、すべての *CCDC26* ノックダウン細胞株で、対照細胞と比較して生き残り細胞が有意に増えていた。したがって、*CCDC26* ノックダウン細胞は血清反応性の低下と同時に、低血清ストレスに対する抵抗性が増強していると考えられる。

(5) Gene チップを用いた DNA マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルの解析の結果、がん遺伝子の *KIT* の 5-12 倍の亢進をはじめ、いくつかの遺伝子の共通する発現変化が見られた。*KIT* は多くの急性骨髄性白血病で機能亢進変異が見られる受容体型チロシンキナーゼのがん遺伝子であり、大変興味深い。また、白血病でよく変異が見られる他の遺伝子 (*TET2*, *IDH1*, *IDH2*, *DNMT3A*, *ASXL1*, *EZH-2*, *MLL*, *RUNX*, *CBFB*, *TCF3*) については発現量の変化は見られなかった。以上の結果より、これまでまったく機能が不明であった非コード性 RNA 遺伝子 *CCDC26* が *KIT* 遺伝子を通じ、骨髄性白血病の増殖を制御している

可能性が示された。

(6) *KIT* のチロシンキナーゼ活性の特異的阻害剤である ISCK03 で *CCDC26* ノックダウン株を処理したところ、すべての株において、低濃度血清条件下での生き残り期間の延長が解消された。このことから、*CCDC26* 遺伝子に変異をもつ小児骨髄性白血病に対し、*KIT* 阻害剤が有効である可能性がある。特に化学療法後における小児骨髄性白血病再発に *KIT* が関与しているとの報告 (Chavez-Gonzalez, 2014) があることから、*CCDC26* 変異陽性小児白血病について、治療戦略と予後管理に *KIT* 阻害剤を利用できるかもしれない。

<引用文献>

Chavez-Gonzalez A., Dorantes-Acosta E., Moreno-Lorenzana D., Alvarado-Moreno A., Arriaga-Pizano L., Mayani H. (2014) Expression of CD90, CD96, CD117, and CD123 on different hematopoietic cell populations from pediatric patients with acute myeloid leukemia. *Archives of medical research* **45**:343-350.

Hirano, T., Ike, F., Murata, T., Obata, Y., Utiyama, H., Yokoyama, K. K. (2008) Genes encoded within 8q24 on the amplicon of a large extrachromosomal element are selectively repressed during the terminal differentiation of HL-60 cells. *Mutation Res* **640**: 97-106.

Hirano, T., Yokoyama K. K. (2009) Role of Extrachromosomal Elements in HL-60 Human Leukemia Cells, in *The Human Genome: Features, Variations and Genetic Disorders*, A. Matsumoto and M. Nakano (Editor), pp.91-100, Nova Science Publishers Inc., Hauppauge New York.

Hirano, T. (2011) Role of *CCDC26*, A Novel Non-Coding RNA, In *Human Acute Myeloid Leukemia: Advances in Genetics Research. Volume 5*, K. V. Urbano (Editor), pp.131-140, Nova Science Publishers Inc., Hauppauge New York .

Radtke, I, Mullighan, CG, Ishii M, Su X, Cheng J, Ma J, et al. (2009) Genomic analysis reveals few genetic alterations in pediatric acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **106**: 12944-9.

Shete, S, Hosking, FJ, Robertson, LB, Dobbins, SE, Sanson, M, Malmer, B, et al.(2009) Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma. *Nature Genet*. **41**: 899-904.

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 2 件)

1. Hirano, T., Yoshikawa, R., Harada, H., Harada, Y., Ishida, A., Yamazaki, T. (2015) Long noncoding RNA, *CCDC26*, controls myeloid leukemia cell growth through regulation of *KIT* expression. *Mol Cancer*. 14: 90

doi:10.1186/s12943-015-0364-7

(査読有り)

2. Ishida, A., Tsumura K., Oue M., Takenaka Y., Shigeri Y., Goshima N., Ishihara Y., Hirano T., Baba H., Sueyoshi N., Kameshita I., Yamazaki T. (2013) An active C-terminally truncated form of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase phosphatase-N (CaMKP-N/PPM1E). *Biomed Res Int* 2013: 134813.

doi: 10.1155/2013/134813

(査読有り)

[学会発表](計 2 件)

1. 平野哲男, 吉川量子, 原田浩徳, 原田結花, 石田敦彦, 山崎岳「非コード RNA *CCDC26* が c-kit の転写調節を介して骨髄性白血病細胞の増殖を制御している」2015 年 11 月 27 日第 37 会日本分子生物学会年会, 演題番号【3P-0274】, 横浜

2. 吉川量子, 原田浩徳, 原田結花, 石田敦彦, 山崎岳, 平野哲男「急性骨髄性白血病に関係する *CCDC26* のマウスホモログ同定と発現解析」2015 年 11 月 27 日第 37 会日本分子生物学会年会, 演題番号【3P-0273】, 横浜

[図書](計 1 件)

1. Hirano, T. (2013) Is *CCDC26* a Novel Cancer-Associated Long-Chain Non-Coding RNA?, Siregar Y editor. *Oncogene and Cancer-From Bench to Clinic*. Edited by Rijeka, Croatia: INTECH. p. 415-434.

doi: 10.5772/54966

[産業財産権]

出願状況(計 0 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 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.alphagalileo.org/ViewItem.aspx?ItemId=153273&CultureCode=en>

http://www.hiroshima-u.ac.jp/news/show/id/23063/dir_id/0

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/thirano/Hiranoslab/Top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野 哲男 (HIRANO, Tetsuo)

広島大学・総合科学研究科・助教

研究者番号：50228805

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

原田 浩徳 (HARADA, Hironori)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10314775

原田 結花 (HARADA, Yuka)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：50379848

石田 敦彦 (Ishida, Atsuhiko)

広島大学・総合科学研究科・教授

研究者番号：90212886