

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860783

研究課題名(和文) 白血病遺伝子Evi1と協調するnoncoding RNAの同定

研究課題名(英文) Identification of noncoding RNAs cooperating with Evi1

研究代表者

荒井 俊也 (Arai, Shunya)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00579716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Evi1はエピゲノム関連因子の一つであり、long noncoding RNA (lncRNA)と結合して作用している可能性が考えられる。Evi1を高発現しているヒト白血病細胞株でEvi1とHOTAIRというlncRNAが結合することがわかった。また、Evi1過剰発現により不死化した細胞でCRNDEというlncRNAの発現が亢進していることがわかった。CRNDEのノックダウンによってEvi1不死化細胞の増殖能は変化しなかった。

研究成果の概要(英文)：Evi1 is one of epigenetic regulators, which is thought to work in cooperation with long noncoding RNA (lncRNA). I showed that Evi1 and a lncRNA, HOTAIR, have physical interaction in a leukemia cell line with high levels of Evi1 expression. I also revealed that a lncRNA, CRNDE, was overexpressed in immortalized hematopoietic cells with high levels of Evi1 expression. Those cells were phenotypically unchanged after knockdown of the expression of CRNDE.

研究分野：血液内科学

キーワード：白血病

1. 研究開始当初の背景

造血器腫瘍の成立にエピゲノムの異常が深く関わっていることが知られるようになってきた。腫瘍細胞は、その変容したゲノム・ヒストン修飾状態によって腫瘍を特徴づける遺伝子発現プロファイルを維持し、白血病においては異常に自己複製することのできる白血病幹細胞を生成していると言われている。いくつかの代表的な白血病キメラ遺伝子は自己複製のプログラムを働かせるためにクロマチン修飾の改変を介している。一部の造血器腫瘍に対して DNA メチル基転移酵素阻害剤やヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が有効であることも、エピゲノム修飾の重要性をものごとくする。

エピゲノムの異常は一般的に可逆的であり、薬剤によってコントロールできる可能性があることから、急性骨髄性白血病 (AML) の新しい分子標的療法の魅力的な治療標的と考えられてきている。しかし、これまでに臨床で用いられているエピゲノム関連治療薬は、その薬効標的の特異性が無く腫瘍細胞で重要なエピゲノム異常を特異的に修復するようなことが出来ないために、十分な効果をあげるまでには至っていない。腫瘍細胞に特異的なエピゲノム制御機構がまだ十分に解明されていないために、それを標的とする治療薬の実用化がなかなか進んでいない状況である。しかし最近では、腫瘍細胞特異的に重要なエピゲノム関連因子の探索も進んできている。例えば、アセチル化ヒストンに結合して転写伸長因子 P-TEFb をリクルートするアダプタータンパク質である BRD4 は、正常細胞と AML 細胞とで発現量に大きな差がないにも関わらず、AML 細胞特異的に、その幼若な幹細胞分画の維持などのために働いていることが明らかにされた。

われわれの研究室では以前から白血病転写因子 Evi1 を主要な研究対象としてさまざまな研究を行ってきた。そのなかから、Evi1 が正常造血幹細胞、造血器腫瘍細胞の幹細胞分画の維持や増殖に大変重要であることを明らかにしてきた。私は以前、Evi1 の存在する染色体 3q26 領域に特徴的な染色体転座を有する AML 以外であっても、Evi1 の転写活性化を起こす機構が存在することを明らかにした。これまでの知見を総合して、Evi1 の AML の治療標的としての有用性は間違いなくあると考えられるが、Evi1 は転写因子であるためその活性を直接制御する治療薬はまだ存在せず、それを実用化するには長い時間がかかると考えられる。一方、われわれの研究室では Evi1 の造腫瘍性にエピゲノム修飾因子、具体的には H3K9 メチル基転移酵素の SUZ39H1 や G9a、および H3K27 メチル基転移酵素 EZH2 およびそれを含むポリコーム抑制性複合体との協調が重要であることを明らかにした。従って、Evi1 自体を治療標的とするだけでなく、このようなエピゲノム修飾機能に焦点を当て、これを阻害する因子を探索する手法も有用であると考えられる。

近年ヒストン修飾の網羅的解析や、高速シーケンサーを用いた網羅的な発現解析 (RNA-sequence) の普及するのに伴い、高等

動物では大量のタンパク質をコードしていない noncoding RNA が転写されていることが分かってきた。ChIP-on-chip 解析の結果、タンパク質をコードする遺伝子領域としない領域にも発現している遺伝子領域と同じような H3K4 トリメチル化、H3K36 トリメチル化修飾を受けている部分が多数見つかると、発現アレイや RNA-sequence の解析によって、そのような領域が実際に転写されていることが確認された。これらの RNA はタンパク質をコードしていない点を除けば mRNA と同じ構造をしており、long noncoding RNA (lncRNA) と呼ばれる。このような lncRNA の昨日にはまだ未知の点が多いが、DNA 結合能を有するタンパク質と結合してそのゲノム領域へのアクセスを正ないし負に制御することは主要な機能を一つと考えられつつある。特に、ポリコーム関連タンパク質やヒストン脱アセチル化酵素複合体といったエピゲノム関連タンパク質と lncRNA が高頻度に結合することが最近の RNA 免疫沈降を用いた網羅的解析の結果明らかにされてきており、それらの DNA への結合に lncRNA が重要であるという報告も増えてきている。

われわれの注目している Evi1 はエピゲノム関連因子の一つであり、lncRNA と結合している可能性が考えられた。Evi1 が既知の lncRNA のいくつかと結合する可能性が高いと各種ツールで予測されたため、Evi1 を高発現しているヒト白血病細胞株の核分画を用いて RNA 免疫沈降を行った結果、Evi1 と HOTAIR という lncRNA が結合することがわかった。この結果から、Evi1 が HOTAIR のみならずさまざまな lncRNA との結合能を有して、そのいずれかが Evi1 が転写因子として標的遺伝子のプロモーターに結合するために重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、Evi1 高発現白血病細胞内で Evi1 と結合している lncRNA を明らかにすること、さらには Evi1 が白血病遺伝子として機能するのに必要な lncRNA を明らかにし、そのような lncRNA が Evi1 を転写標的のプロモーターにリクルートする機能を持っているという仮説を検証することを目的とした。lncRNA が Evi1 のどのような機能に重要であるか、明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Evi1 高発現ヒト白血病細胞株を用いた RNA 免疫沈降と RNA シークエンス

Evi1 高発現ヒト白血病細胞株 MOLM-1、HNT34 を用いて、核内タンパク質を抽出し、Evi1 抗体を用いた RNA 免疫沈降を行なった。具体的には、低張性バッファーと界面活性剤を用いて細胞膜を溶解し核成分を取り出したのち、溶解バッファーと混合して注射針に数回通して核を破碎した。Protein G を

固定した磁性ビーズに抗 Evi1 抗体あるいはコントロール抗体を吸着させ、これを核溶解液と混合してインキュベートして Evi1 タンパク質を含む複合体を精製した。そこから、フェノールとグアニジンイソチオシアネートを含む試薬を用いて RNA を抽出した。

RNA 免疫沈降から大規模シークエンスに至る実験系がうまく機能しなかったため、公開されているマイクロアレイデータより、正常細胞と造血器腫瘍細胞で発現量が 8 倍程度みられる noncoding RNA の候補をピックアップした。Evi1 高発現白血病細胞におけるこれらの noncoding RNA の発現量を調べ、マイクロアレイデータと同様の挙動を示し発現量が低くないものを中心に、この白血病細胞における Evi1 との結合を RNA 免疫沈降で解析した。

(2) lncRNA の Evi1 の oncogenic な機能に対する意義の検証

上記の解析で Evi1 に結合することが判った lncRNA に対して、shRNA 発現ベクターを 2 種類ずつ構築した。Evi1 の強制発現によって in vitro で骨髄の幼若造血細胞を不死化する実験系をわれわれは既に確立しているが、この細胞で lncRNA をノックダウンした場合の不死化細胞への影響を in vitro で観察した。Evi1 不死化細胞は半圆形培地で半永久的に培養可能であるが、その際のコロニー形成を著明に阻害するような RNAi の標的 lncRNA は、Evi1 の機能にとって特に重要と考えられる。また、in vivo においても Evi1 強制発現造血細胞の移植による白血病発症の実験系を確立しているが、in vitro で効果があると考えられた shRNA については in vivo においてもその効果を検証することを予定した。

私の研究室では Evi1 の他にもいくつかの白血病遺伝子 (MLL キメラ遺伝子, AML1-ETO, PML-RAR など) の強制発現によって造血細胞を不死化させる実験系を確立している。これらの遺伝子の導入によって出来た不死化細胞にもこれらの RNAi の導入による増殖抑制効果が見られるか否かを検証した。

4. 研究成果

Evi1 高発現ヒト白血病細胞株 MOLM-1, HNT34 を用いて、核内タンパク質を抽出し、Evi1 抗体を用いた RNA 免疫沈降を行った。Evi1 と lncRNA HOTAIR の結合を確認することができた。一方、既知の EZH2 と lncRNA の結合について、私の用いた細胞では確認することができなかった。一方、公開されているマイクロアレイデータ GSE51757 の解析により、造血器腫瘍細胞 (骨髄異形成症候群, MDS) で正常造血細胞と発現量が 8 倍程度異なっている lncRNA の候補をピックアップした。MDS

において発現が低下しているものとして、VNN3, URAHP, LINC00937, 同 00877, 同 00324, 同 01013, 同 01197, HCG27, ECELIP2 がピックアップされた。一方、MDS において発現が亢進しているものとして、MEG3, CRNDE, LINC00640 がピックアップされた。また、Evi1 をレトロウイルスでマウス造血細胞に導入して移植する Evi1 白血病モデル実験で得られたマウス白血病細胞の解析により、Evi1 白血病マウス骨髄中の幼若な lineage(-)/cKit(+) 分画において、上記の lncRNA のうちのいくつかは GSE51757 で見られたのと同様の発現変化を起こしていることを見出した。このような発現量変化の大きい lncRNA は腫瘍の分子病態に関与している可能性がより高いと考えられた。特にわれわれは、MDS での発現が特に亢進しており正常細胞との発現量の差が大きかった CRNDE に着目した。CRNDE は大腸がん細胞で発現が亢進していることが知られている lncRNA で、腫瘍細胞の代謝に影響し、好氣的解糖を促進することが知られている。そこで私はマウス CRNDE の siRNA を発現するレトロウイルスベクターを 2 種類作成し、マウス造血器腫瘍の in vitro モデルである Evi1 強制発現不死化細胞および MLL-ENL 強制発現不死化細胞にそれぞれレトロウイルスで導入し、CRNDE の発現をノックダウンした。2 種類のベクターはそれぞれ CRNDE の発現を約 30% に低減していることを確認した。この細胞を in vitro で培養し、対照のノックダウンベクターを導入した細胞との増殖性を比較した。その結果、有意な増殖能の差は認められなかった。また、他の白血病遺伝子によって不死化されたマウス白血病モデル細胞に対しても CRNDE のノックダウンを行ったが、結果はどのようなであり、in vitro の培養系において増殖抑制効果を示すことはできなかった。また、抗がん剤としてシタラピン、ボルテゾミブなどを添加した系において抗がん剤耐性度への影響を検証したが、特に変化は見られなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://u-tokyo-hemat.com/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

荒井 俊也 (ARAI SHUNYA)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00579716