

平成 30 年 9 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09652

研究課題名(和文) microRNAセンサーベクターを用いた白血病幹細胞の同定と新規治療法の開発

研究課題名(英文) identification for leukemic stem cells using microRNA sensor vector for developing new therapy

研究代表者

平松 英文 (Hiramatsu, Hidefumi)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：40362503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロRNA(miR)は、造血器腫瘍において治療反応性マーカーや治療標的として研究が進められているが、本研究では小児急性リンパ性白血病のmiR発現解析結果に基づき、miR-146aに着目し、細胞内でのmiR発現レベルを可視化出来るmiR sensing vector並びに、活性を抑制できるmiR knock down vectorを用いて種々の急性リンパ性白血病細胞株のmiR発現を解析した。発現はおしなべて高く、同一株内であってもその発現に多様性があることを見出した。また、miR-146aのノックダウンによってコロニー形成能を30-50%抑制しことから、その分子機構を解析している。

研究成果の概要(英文)：Recently microRNAs are investigated as a therapeutic marker or a target for hematologic malignancies. Based on the results of miR analysis of primary pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL), we picked up several target miRs including miR-146a and investigated its activities in various ALL cell lines using a miR sensing vector and a miR knock down vector. Mir-146a is generally upregulated and differentially expressed in most cell lines. Knocking down of this miR resulted in 30-50% reduction of colony formation. Underlying molecular mechanism is under investigation by RNA-seq.

研究分野：小児白血病

キーワード：microRNA 白血病

## 1. 研究開始当初の背景

microRNA (miR)は21-25塩基と非常に短い1本鎖RNAで、遺伝子の転写後の翻訳の調節、とくに翻訳の抑制に関与しており、一種類のmiRが数百種類のmRNAの翻訳調節に関わっていると考えられている。ヒトにおいては1,000以上のmiRが存在するとされ、個体発生から細胞の分化・増殖の調節、さらには発がんなど、幅広い生命現象に関連していることが報告されている。近年、慢性リンパ性白血病、多発性骨髄腫などの造血器腫瘍において治療反応性マーカーとしての有用性や、治療標的としての可能性が模索され、研究が行われるようになってきた。しかしながら白血病においては、その発現異常は報告されてきたものの、マーカーとしての診断的価値はもとより、治療標的としての有用性に関する研究はほとんどなく、とくに小児白血病におけるmiR研究は極めて限られており、その臨床的有用性に関しては手付かずの状態であった。また、技術的な側面としては、miRの発現測定には定量的PCRをはじめとする従来からの分子生物学的手法がよく用いられているが、miRは、RISC (RNA-induced silencing complex)とよばれる複合体上でmRNAの翻訳を阻害するため、細胞内におけるmiRの活性は必ずしもその分子数とは直線的な関係にはなく、活性を持つmiRを評価するのに良い系が存在しないという問題があった。我々は、Dr. Naldini研究室との共同研究で、細胞内のmiR活性をフローサイトメトリーを用いることでシングルセルレベルで可視化出来るlenti-virus vector systemを開発し、細胞内におけるmiR活性を生細胞で観察/分取することが可能となった。今回、小児白血病細胞を対象に、このmiR sensing lenti-virus vector技術を用い、白血病細胞における特定のmiRの生物学的意義につき研究することを計画した。

## 2. 研究の目的

急性白血病におけるmiRの発現やその生物学的意義に関しては不明な点が多いことから、特に小児急性リンパ性白血病を対象にmiR発現解析を行い、その発現異常を明らかにすることを目的とする。さらに標的miRの分子機構を明らかにすることで、新規の治療法開発へ向けた基礎的研究を行う。これらの研究を通じて、miRの発現制御による新規治療法開発へ向けた橋渡し研究を目指す。

## 3. 研究の方法

### 1) miR sensing lenti-virus vector の作成

イタリアのDr. Naldini研究室との共同研究で、miR発現を半定量的に可視化出来るlenti-virus vector systemを開発し、目的とするmiRに対するbackbone vectorを作成する。backbone vectorは細胞内ドメインを

欠損したNGFRとGFPの2つのレポーター遺伝子を持ち、GFPの下流にはmiR binding siteを配置している(図1)。このbackboneとaccessory plasmidsを293T細胞にco-transductionし、VSV-Gによるpseudotypingによってヒト細胞に感染可能なlenti-virusを作成する。同ウイルスを感染させた細胞は、レポーター遺伝子としてNGFRを細胞表面に、GFPを細胞内に発現するが、細胞内に活性をもつmiRが存在すれば、GFPの翻訳が転写後抑制を受けることから、miRに応じたGFPの輝度の低下が見られる。従って、フローサイトメトリーを用いることにより半定量的に細胞内のmiR活性を測定することができる。

### 2) miR sensing lenti-virus を用いた白血病細胞株におけるmiR活性の評価

さまざまな白血病細胞株におけるmiR活性を実際に検討するため、qPCRを用いたmiRの定量だけでなく、上述のmiR sensing lenti-virusを用いて、フローサイトメトリーによる候補miRの細胞内活性を評価する。高活性のmiRを確認できれば、後述のknock downの系を用いて、同miRが増殖やアポトーシス、マウスへの生着性などの細胞活性に及ぼす影響について検討を行う

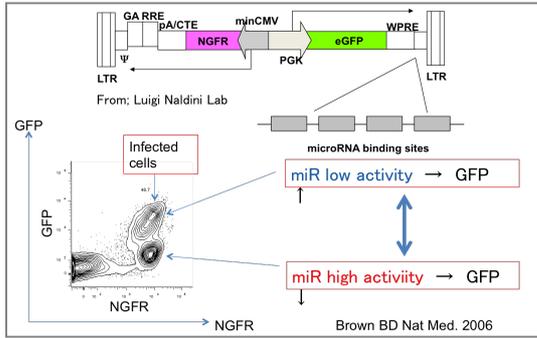
### 3) miR knocking down lenti-virus vector の作成とmiR Knock downの生物学的効果の検討

miR sensing lenti-virus vectorのコンストラクトを利用して、極めてプロモーター活性が高いSFFVを用いることで、GFPとmiR binding siteを高発現させることで細胞内のmiRを吸着させるいわゆるsponge vectorを作成し、細胞内miRをknock downできる実験系を構築する。本システムを利用することで、通常のsiRNAなどとは異なってknock downの効果が数週から数ヶ月以上に渡って持続することから、長期にわたる効果を観察することが可能となる。

## 4. 研究成果

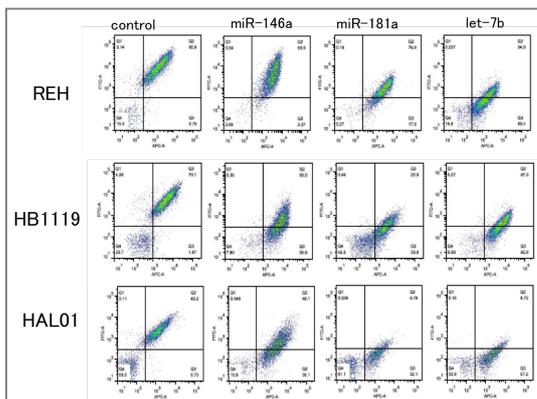
1) 小児急性リンパ性白血病のmicroRNAの発現プロファイル解析の結果に基づき(国立成育医療研究センター 清河 信敬先生, unpublished data)、同疾患で高発現が認められたmiRのうち、miR-146aを含む3つの候補miRをピックアップして、それぞれに対するmiR sensing lenti-virus vectorを作成した(図1)。本vectorが導入された細胞では、当該miRの存在下に、2つあるレポーター遺伝子のうち、GFPのみの翻訳が抑制され、GFPの輝度の低下度合いにより、細胞内miRを半定量的に測定することが可能となる。

図1 miR sensing lenti-virus vector



2) それぞれの backbone vector は RRE, REV, VSV-G ならびに高 titer を得るための p-Advantage といった accessory plasmids とともに 293T 細胞にカルシウム沈降法で co-transfection を行い、培養細胞上清から超遠心によりウイルス粒子を濃縮した。Hela 細胞による titration では  $10^8$  particles/ml オーダーの極めて高い titer のウイルス粒子を得ることができた。続いて、それぞれの miR-sensing lentivirus vector を用いて、11 種類の急性白血病細胞株を解析したところ、殆どの ALL 細胞株において GFP の輝度の低下が観察された。これは細胞内に当該 miR が高発現していることを示唆し、ALL 細胞株における、これらの miR の高活性が観察された(代表的な結果を図 2 に示す)。また、驚いたことに、細胞株であっても、miR 活性は均一ではなく、単細胞レベルで活性の幅があることが示された。これは、従来の qPCR 法では観察することはできない、本システムの優位点の一つである。

図2 miR sensing lenti-virus による解析例



miR-146a sensing lenti-virus を感染させた REH 細胞を例に示す(図 3)。GFP high (miR-146a low expression) と GFP low (miR-146a high expression) の細胞集団が、同定され、それぞれの細胞をソーティングして、別々に培養してみると、GFP レベルから推察される miR 発現レベルは一定しており、low expression と high expression の細胞

集団のお互いから他方が生成されることはなく、長期にわたってその発現レベルは維持されていた(図 4)。しかしながら、それぞれの細胞集団について、細胞増殖、細胞周期、アポトーシスについて検討を行ったが、有意差を認めることはできなかった。さらに、eptoposide, bortezomib, Ara-C などの抗がん剤に対する感受性について検討を行うとともに、免疫不全マウス (NOG mice) へ骨髄内移植を行って、生着性、遊走性の差異につき検討を行ったが、残念ながら薬剤感受性、マウスへの生着性のいずれにおいても有意な差を見出すことはできなかった(図 5)

図3 REH細胞における miR-146a 発現パターン

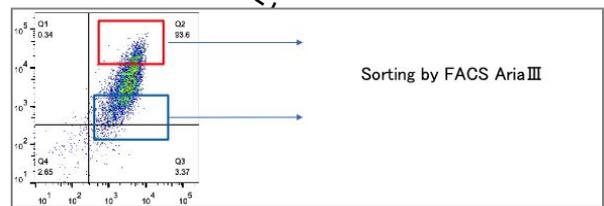


図4 保存された GFP high と low の集団

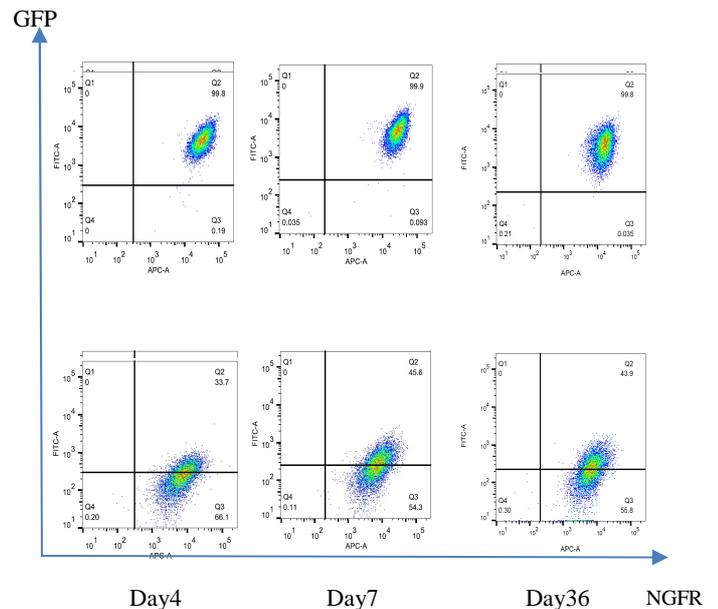
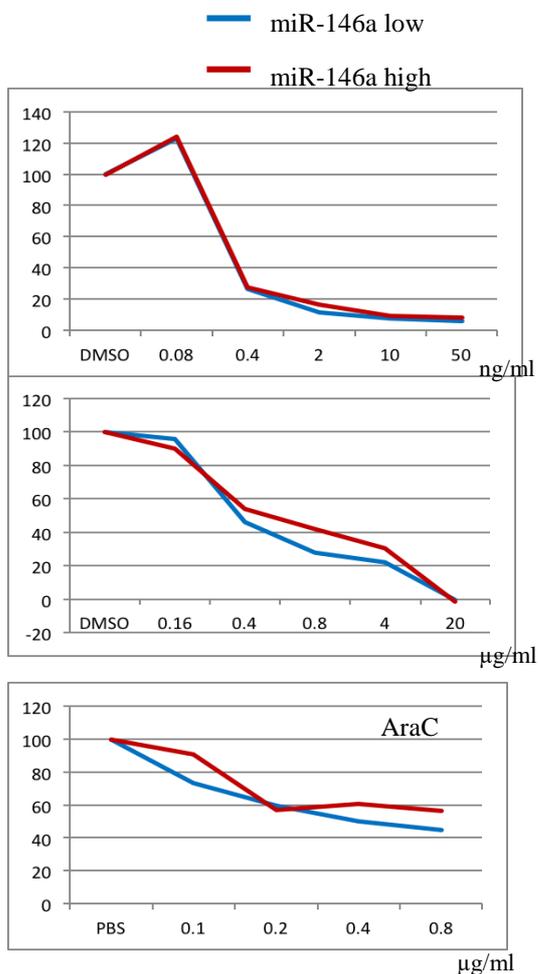
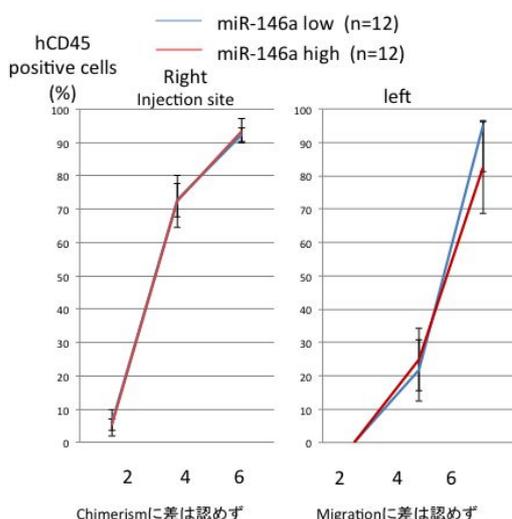


図5 a) miR-146a low 及び high population を用いた薬剤感受性試験 (WST-8 法)、 b)免疫不全マウス (NOG マウス) への移植実験

a) 薬剤感受性試験

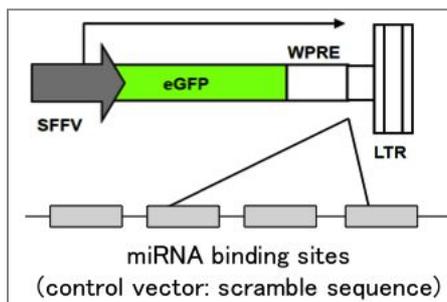


b) NOG マウスへの右大腿骨骨髓内移植



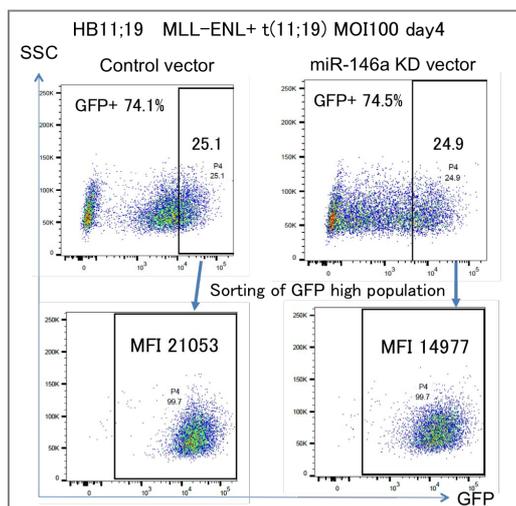
3) 上記の結果をうけて、miR knock down の系を計画した。Naldini 研究室との共同研究で、miR sensing lenti-virus の backbone のうち、GFP 発現に関わる部分を改変し、強力な SFFV (spleen focus forming virus) プロモーターを使用することで、GFP 並びにその下流に存在する miR binding site を大量に発現することで、細胞内の miR を吸着する、いわゆる sponge vector を作成した。同 vector により、十分な miR 活性の低下を基礎検討で確認しており、まず、miR-146a knocking down lenti-virus を作成した (図 6)。

図 6 miR knock down lenti-virus vector



初期検討で miR-146a の発現が特に高かった HB11;19 細胞を用いて MOI 100 で miR-146a knock down lentivirus を感染させた。感染細胞のうち、十分な knock down が得られている GFP high の分画をソーティングし、同様に細胞増殖、細胞周期、アポトーシスなどの差異につき検討を行った。(図 7)

図 7 HB11;19 細胞の miR-146 knock down



細胞周期、アポトーシスでは明らかな差を見いだせなかったが、細胞増殖においては knock down において増殖の抑制の傾向が見られた。(図 8)

さらに miR-146a knock down では著明な colony 形成能の抑制が観察された(図7) 同様の結果は KOCL44 細胞株でも観察されている。両細胞株はいずれも MLL 融合遺伝子を有しているが、その他の細胞株でも検討を行うと共に、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を施行中で、分子学的メカニズムについて解析を行っている。また、現在、primary のヒト白血病細胞を用いて、同様の検討を行っている。primary ヒト白血病細胞、とくに急性リンパ性白血病細胞では in vitro での培養が難しいことから、lentivirus の導入効率が低レベルにとどまりがちであるが、複数のサイトカインを用いることや、造血細胞の維持、増殖に適したストローマ細胞上での培養法を組み合わせることにより、ヒト白血病細胞を比較的長期にわたって培養、観察が可能であることを確認しており、実際のヒト白血病細胞でも同じ現象が観察されれば、マウスモデルを用いて、治療的应用への可能性を探索していく予定である。

図 8 HB11;19 細胞 ± miR-146a KD の増殖曲線

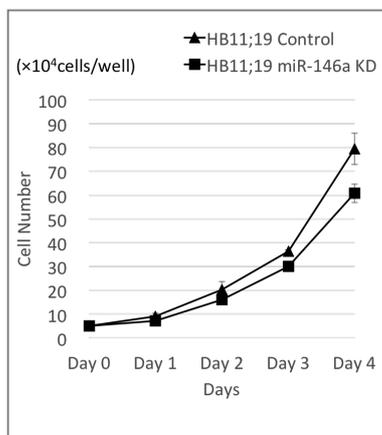
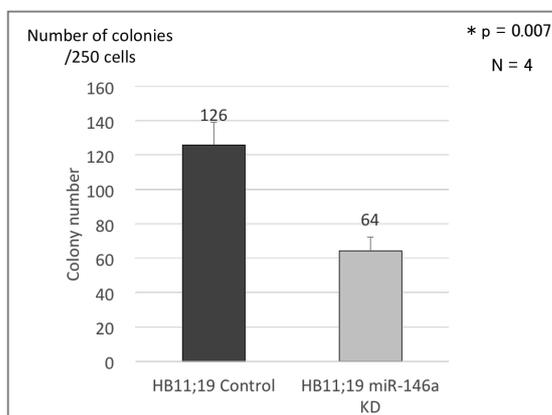


図 7 HB11;19 細胞 ± miR-146a KD のコロニー形成



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)

Kawaguchi Koji、Umeda Katsutsugu、Hiejima Eitaro、Iwai Atsushi、Mikami Masamitsu、Nodomi Seishiro、Saida Satoshi、Kato Itaru、Hiramatsu Hidefumi、Yasumi Takahiro、Nishikomori Ryuta、Kondo Tadakazu、Takaori-Kondo Akifumi、Heike Toshio、Adachi Souichi、Influence of post-transplant mucosal-associated invariant T cell recovery on the development of acute graft-versus-host disease in allogeneic bone marrow transplantation、International Journal of Hematology、査読有、in press  
DOI:10.1111/ptr.12926

Umeda Katsutsugu、Iwai Atsushi、Kawaguchi Koji、Mikami Masamitsu、Nodomi Seishiro、Saida Satoshi、Hiramatsu Hidefumi、Heike Toshio、Ohmori Katsuyuki、Adachi Souichi、Impact of post-transplant minimal residual disease on the clinical outcome of pediatric acute leukemia、Pediatric Transplantation、査読有、vol.4(21)、2017、e12926~e12926

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平松 英文 (Hiramatsu Hidefumi)  
京都大学大学院医学研究科・発達小児科  
学・講師

研究者番号：40362503

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：