

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04212

研究課題名(和文) B系列決定必須転写因子EBF1欠損をレスキューするmicroRNAの発見

研究課題名(英文) Identification of miRNA which rescues EBF1 deficiency indispensable for B cell lineage commitment

研究代表者

幸谷 愛 (KOTANI, Ai)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：00517477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞分化は転写因子が決定するとの古典的概念をmiRNAが覆すと考えB細胞分化に必須転写因子EBF1欠損造血前駆細胞にmiR-195を導入し分化誘導を試みた。結果、B細胞系列細胞表面マーカーCD19は再現性を持って誘導できた。miR-195を過剰発現するEBF1欠損造血細胞においては、Atac-seq解析によりEBF1の結合ゲノム領域が、オープンになっていることが明らかになった。miR-195欠損マウスにおいては、リンパ球分化に異常が認められ、概ね仮説が正しい結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転写因子中心の細胞運命決定における従来の古典的概念を覆す、単一miRNAでの転写因子の補完が可能との研究成果の学術的意義は極めて高いと考える。事実、海外学会で高い評価が得られている。また、分化誘導療法はレチノイン酸を用いて、既に白血病治療で行われていることから、本研究結果も同様の治療コンセプトで分化誘導療法に応用されるポテンシャルを有する。よって、既に癌治療において行われているmiRNAを用いた治療にもつながり、社会的意義も高いと考える。

研究成果の概要(英文)：Since miRNA overturns the classical concept that cell differentiation is determined by transcription factors, miR-195 was introduced into EBF1-deficient hematopoietic progenitor cells, which are essential for B cell differentiation, and we tried to induce differentiation. As a result, the B cell lineage cell surface marker CD19 could be reproducibly induced. In EBF1-deficient hematopoietic cells overexpressing miR-195, Atac-seq analysis revealed that the EBF1-binding genomic region was open. In miR-195-deficient mice, abnormal lymphocyte differentiation was observed, and the hypothesis was generally correct.

研究分野：血液内科

キーワード：細胞分化 microRNA 転写因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先行研究において、白血病細胞の分化誘導を転写因子の増減なく非コード RNA である miRNA が誘導することを見出した。(PNAS 2013 Okuyama et al)

一般に、細胞分化の決定因子は転写因子であるとの古典的概念を、miRNA が覆す可能性があると考え、転写因子欠損造血前駆細胞に miRNA を導入するとのも着想を得た。

発現プロファイル(などから miR-195 にその効果がある可能性を考え以下の研究を行った。

2. 研究の目的

(1) B 細胞分化に必須転写因子である EBF1 の欠損を miR-195 がレスキューするか否かを明らかにする。(図1)

(2) miR-195 の生理的な機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) EBF1 欠損造血前駆細胞を EBF1 欠損マウス胎児肝より採取し、レトロウイルスを用いて miR-195 を導入する。OP9, Tst4 などのストローマ細胞上で培養し、B 細胞分化を誘導する。B 細胞マーカーである CD19 の発現が認められるか否かを明らかにし、発現が認められれば、B 細胞系列にコミットしたことを示す、ゲノムにおける免疫グロブリンの VDJ 組み換えの有無を確認する。T,B 細胞を持たない NOG マウスに miR-195 を導入した EBF1 欠損造血前駆細胞を移植し、B 細胞の出現の有無を調べる。

(2) EBF1 欠損マウスは不妊となるため、コンディショナル EBF1 欠損マウスを入手し、造血系特異的に欠損をもたらす Vav-CRE マウスと交配し、造血系だけに EBF1 欠損するマウスを作成する。miR-195 トランスジェニックマウスを作成し、造血系特異的 EBF1 欠損マウスに交配し、(1)の結果を確認する。

(3) miR-195 欠損マウスを作成し、その表現型を解析し、EBF1 欠損を miR-195 がレスキューするにあたって、生理機能を明らかにする。

(4) EBF1 欠損を miR-195 がレスキューするにあたって、miR-195 の標的遺伝子の同定も含めてそのメカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

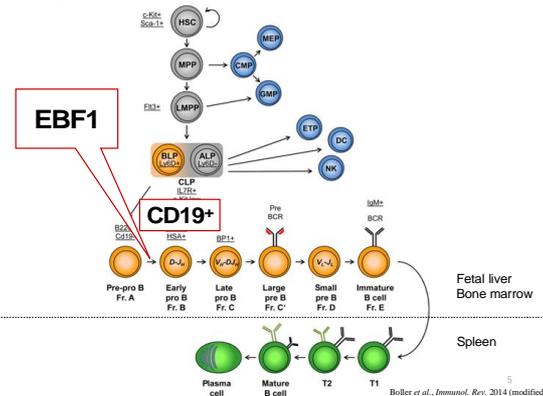
(1) B 細胞系列細胞表面マーカーである CD19 は試験管内で再現性を持って誘導できた。マウス生体内でも誘導できた。VDJ 組み換えについて検討中である。(図2)

(2) miR-195 を過剰発現する EBF1 欠損造血細胞においては、CD19 の発現が認められた。加えて Atac-seq 解析により、EBF1 の結合ゲノム領域が、オープンになっていることが明らかになった。しかしながら、不妊となったため、再現性についてはいまだ確認できていない。

(3) リンパ球分化が低下すること、また B-1 B-2 への分化異常が認められ、概ね過剰発現と反対の形質を示した。よって、miR-195 の機能については過剰発現、欠損、マウスにおいて整合性のある結果が得られたと考えられる。

(4) バイオインフォマティクス解析やルシフェラーズアッセイを用いて、標的遺伝子が数個同定され、TGF 経路や FOXO1 の関与などのメカニズムが明らかになった。(図3)

Early B cell Factor 1 (EBF1) in B cell development



Boller et al., Immunol. Rev. 2014 (modified)

図 2 miR-195 は CD19 を誘導する

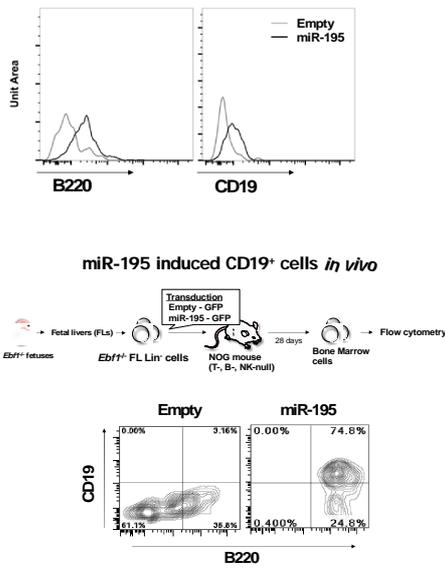
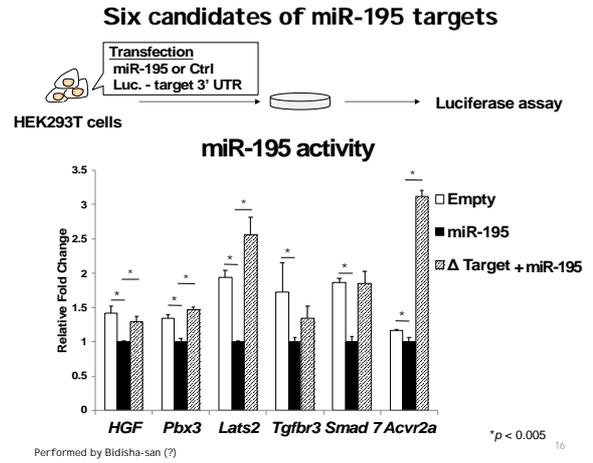
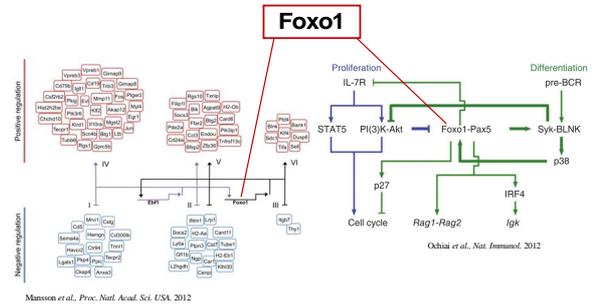


図 3 miR-195 は TGF 関連遺伝子や FOXO1 関連遺伝子を介して機能すると考えられる。



Foxo1 in B cell differentiation



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kakizaki M, Yamamoto Y, Yabuta S, Kurosaki N, Kagawa T, Kotani A	4. 巻 13(12)
2. 論文標題 The immunological function of extracellular vesicles in Hepatitis B virus-infected hepatocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0205886
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0205886	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Higuchi H, Yamakawa N, Imadome K-I, Yahata T, Fujita K, Lu J, Ogata J, Kotaki R, Yokoyama K, Okuyama K, Sato A, Takamatsu M, Kurosaki N, Mohamad Alba S, Azhim A, Horie R, Watanabe T, Kitamura T, Ando K, Kashiwagi T, Matsui T, Okamoto A, Kuroda M, Nakamura N, Handa H, Kotani A	4. 巻 131(23)
2. 論文標題 Role of exosomes as a proinflammatory mediator in the development of EBV-associated lymphoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 2552-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood-2017-07-794529	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ryutaro Kotaki, Ryo Koyama-Nasu, Natsuko Yamakawa, Ai Kotani	4. 巻 18(7)
2. 論文標題 miRNAs in Normal and Malignant Hematopoiesis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms18071495	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Ryutaro Kotaki, Ai Kotani	4. 巻 58(7)
2. 論文標題 A single miRNA complements transcription factor deficiency through the TGF pathway at time of B-cell lineage determination	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Rinsho Ketsueki	6. 最初と最後の頁 792-797
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.58.792	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ryutaro Kotaki, Hiroshi Higuchi, Daisuke Ogiya, Yasuhiro Katahira, Natsumi Kurosaki, Naoko Yukihiro, Jun Ogata, Haruna Yamamoto, Syakira Mohamad Alba, Azran Azhim, Tatsuo Kitajima, Shigeaki Inoue, Kazuhiro Morishita, Koh Ono, Ryo Koyama-Nasu, Ai Kotani	4. 巻 106(6)
2. 論文標題 Imbalanced expression of polycistronic miRNA in acute myeloid leukemia	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 811-819
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-017-2314-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計14件(うち招待講演 8件/うち国際学会 6件)

1. 発表者名 川島雅晴, カレーラス・エステバン・ジュアキム, 中村直哉, 幸谷愛
2. 発表標題 ホジキン細胞と単球の直接接触で、単球のPDL1/L2上昇が誘導される
3. 学会等名 第23回造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 幸谷愛
2. 発表標題 微小環境もヒトである～ヒトEBV + DLBCLモデルの構築とその応用
3. 学会等名 第4回リンパ腫分子病態研究会沖縄シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 幸谷愛
2. 発表標題 ウイルス感染細胞由来エクソソームの役割
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会ワークショップ(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 幸谷愛
2. 発表標題 ウイルス疾患におけるエクソソームの機能
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ai Kotani
2. 発表標題 Virus infected cells secreted potent exosome
3. 学会等名 第5回日本細胞外小胞学会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masaharu Kawashima, Ai Kotani
2. 発表標題 Upregulation of Immune Checkpoint Markers PDL1/2 on Monocytes Induced by Direct Contact with Hodgkin Cells
3. 学会等名 2018 ASH Meeting on Lymphoma Biology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ai Kotani
2. 発表標題 Potent Microenvironment Changer: EBV Derived Exosome
3. 学会等名 The 9th JSH International Symposium 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ai Kotani
2. 発表標題 Exosome-mediated communication between “cell and cell” “organ and organ” in viral disease
3. 学会等名 RIKEN IMS-JSI International Symposium on Immunology 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ai Kotani
2. 発表標題 Role of the exosome in EBV related hematological malignancy
3. 学会等名 Hong Kong RNA club (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ai Kotani
2. 発表標題 HBV derived exosome is sysemically functional
3. 学会等名 ISEV2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ai Kotani
2. 発表標題 A single microRNA, miR-195, can rescue EBF1 deficiency in B cell differentiation
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Gene Expression and Signaling in the Immune System (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 幸谷 愛
2. 発表標題 EBV 感染腫瘍由来エクソソームはマクロファージを制御し腫瘍形成を促す
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ryutaro Kotaki, Hiroshi Higuchi, Ai Kotani
2. 発表標題 Ibrutinib As a Possible Therapeutic Strategy for Epstein-Barr Virus-Positive Lymphoma/Leukemia
3. 学会等名 第59回アメリカ血液学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ryo Koike, Joaquim Carreras, Hiroshi Higuchi, Kenichi Imai, Ai Kotani
2. 発表標題 The Humanized EBV-LPD Recaptulates Human Non GC DLBCL
3. 学会等名 第59回アメリカ血液学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 PDL1発現誘導剤および免疫抑制剤	発明者 幸谷 愛、山本雄一 朗	権利者 東海大学
産業財産権の種類、番号 特許、公開2020-015711	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

幸谷研究室
<http://k-lab.jp/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	穂積 勝人 (HOZUMI Katsuto) (30246079)	東海大学・医学部・教授 (32644)	
研究分担者	伊川 友活 (IKAWA Tomokatsu) (60450392)	東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・教授 (32660)	
研究分担者	大塚 正人 (OHTSUKA Masato) (90372945)	東海大学・医学部・教授 (32644)	