

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461409

研究課題名(和文) 骨髄異形成症候群の無効造血に対する分子標的治療に向けての基礎的検討

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of ineffective hematopoiesis in myelodysplastic syndromes

研究代表者

色摩 弥生 (Shikama, Yayoi)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40291562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、骨髄異形成症候群患者の好中球において、miR-34aとmiR-155の過剰発現によりc-Fos蛋白が減少している、NF-kB p60とTNF-alpha DNAとの結合を抑えるc-Fosの減少により、炎症刺激や酸化ストレス時にTNF-alphaが過剰産生される(Shikama et al, PLoS One, 2016)、miR-34aとmiR-155の過剰発現の結果、Cdc42の活性化蛋白のDOCK8とFGD4、Rac1が減少する、これらの蛋白減少がfMLPやIL-8への遊走能低下に寄与することを明らかにした(Cao et al, J Immunol, 2017)。

研究成果の概要(英文)：We found that c-Fos was reduced via overexpression of miR-34a and miR-155 in neutrophils isolated from patients with myelodysplastic syndromes (MDS). The reduction of c-Fos, which inhibited binding of NF-kB p60 to the promoter region of TNF-alpha DNA, induced overexpression of TNF-alpha under inflammation or oxidative stress (Shikama et al, PLoS One, 2016). The overexpression of miR-34a and miR-155 interfered with expression of Cdc42-specific guanine nucleotide exchange factors DOCK8 and FGD4, and a Rho family member Rac1, resulting in impairment in migration of MDS neutrophils toward fMLP and IL-8 (Cao et al, J Immunol, 2017).

研究分野：血液内科学 骨髄異形成症候群

キーワード：骨髄異形成症候群 好中球 c-Fos miR-34a miR-155 TNF-alpha migration

1. 研究開始当初の背景

TNF- α 増加による造血細胞の apoptosis 亢進が骨髄異形成症候群 (MDS) の無効造血の一因と考えられている。しかし何故 TNF- α が増加するのか、その分子メカニズムは不明である。また、MDS で見られる血球機能異常と無効造血との関係も明らかではない。

我々は、MDS 患者の好中球で、翻訳停止時の c-Fos mRNA 誘導不全があることを見出し (Shikama et al, Bri J Haematol, 2011)、これが c-Fos mRNA の安定化不全によることを報告した (Feng et al, PLoS ONE, 2013)。

近年 c-Fos には NF- κ B による TNF- α 転写を抑制する働きのあることが報告された (Koga et al, Immunity, 2009)、これをもとに我々は、c-Fos mRNA 安定化不全の結果、MDS 患者血球の c-Fos 蛋白レベルが減少し、TNF- α の産生の亢進が起こっているのではないかと考えた。また、c-Fos mRNA 安定化不全を引き起こしているメカニズムが、血球機能にも影響を与えている可能性がある。

そこで、c-Fos 誘導不全が TNF- α 産生に与える影響と c-Fos 誘導不全の原因を明らかにし、その c-Fos 誘導不全の原因が造血や血球異常に与える影響を明らかにすることが、無効造血の治療標的の同定の一助になると考えた。

2. 研究の目的

MDS 血球における c-Fos 発現を確認し、c-Fos 発現レベルと NF- κ B を活性化する様々な刺激時の TNF- α の産生との関係を明らかにする。更に、c-Fos 発現異常を引き起こす原因を同定し、それが血球機能異常及び造血に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) MDS 患者と健常人の末梢血好中球を分離し、c-Fos mRNA の安定性制御にかかわる mRNA 結合蛋白 (HuR 等) と c-Fos を標的とする microRNA の発現量をそれぞれ、Western blotting と real-time RT-PCR で解析した。MDS 血球で発現異常の確認された microRNA (miR-34a と miR-155) または mRNA 結合蛋白 (HuR) の siRNA を electroporation でヒト前骨髄球性白血病細胞株 HL60 に導入して異常を再現し、c-Fos mRNA の発現レベルと安定性の変化、c-Fos 蛋白レベルを解析した。

(2) 患者好中球における c-Fos 蛋白レベルを flow cytometry で、1 μ M LPS 刺激時の TNF- α mRNA 量を real-time RT-PCR で、血球培養液中の TNF- α 蛋白濃度を ELISA 法で測定し、c-Fos 発現量と LPS 刺激による TNF- α 増加の関係を解析した。Electroporation で c-Fos cDNA または siRNA を導入して作成した c-Fos 強発現またはノックダウン細胞を好中球様に分化させ、CHIP assay により LPS 刺激による NF- κ B と

TNF- α DNA promoter との結合量の変化を解析した。

(3) 酸化ストレス時の TNF- α 産生における c-Fos の役割を検討するため、c-Fos cDNA または c-Fos siRNA を HL60 に electroporation で導入した。これらの細胞と control 細胞を H₂O₂ 存在下で培養し、TNF- α mRNA の増加率を real-time PCR で検討した。更に CHIP assay にて TNF- α DNA プロモーター領域との結合した NF- κ B p60 の割合を測定した。

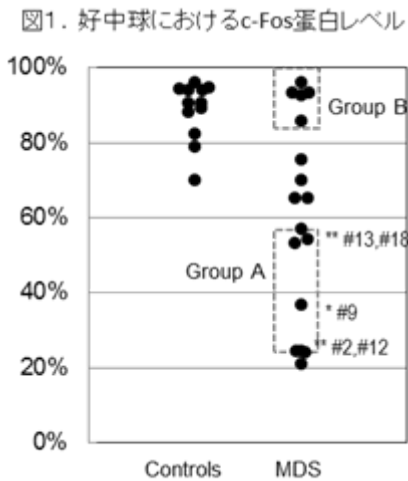
(4) c-Fos 発現異常の原因 (miR-34a と miR-155 の過剰発現) を再現した細胞株を好中球様に分化させ、fMLP 刺激時の myeloperoxidase と elastase の放出、fMLP と IL-8 に向かう遊走能、酸化ストレス (H₂O₂) 時の apoptosis 及び ROS 産生を測定した。

(5) 検出された機能変化 (遊走能低下) のメカニズムを明らかにするために、データベースより、異常発現している microRNA (miR-34a と miR-155) の標的分子をリストアップし、その中から好中球に発現が確認され、かつ遊走能に關与するもの (miR-34a の標的: DOCK8, miR-155 の標的: FDG4, Rac1) を選択した。miR-34a/miR-155 過剰発現 HL60 細胞における DOCK8, FGD4, Rac1 の蛋白レベルを Western blotting で解析した。HL60 に siRNA を導入して DOCK8, FGD4, Rac1 を減少させ、遊走能の変化を解析した。更に、MDS 患者と健常人から好中球を分離し、DOCK8, FGD4, Rac1 蛋白の発現レベルと遊走能を測定した。

4. 研究成果

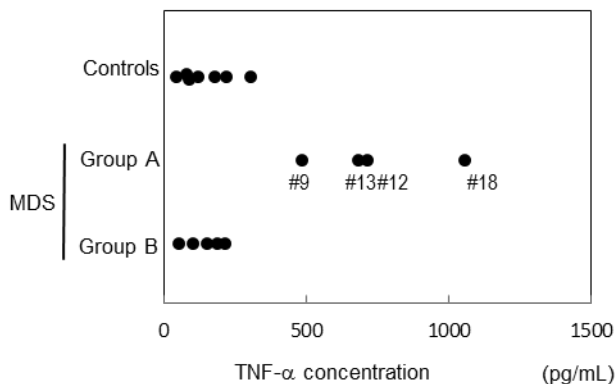
(1) mRNA 安定化蛋白 HuR の発現が低下していた MDS 患者は 20% 未満であった。一方、約 70% の患者で c-Fos を標的とする miR-34a または miR-155 の過剰発現が検出された。細胞株 HL60 に HuR siRNA または miR-34a または miR-155 を導入した場合、いずれにおいても c-Fos mRNA の安定化不全が再現された。MDS 好中球における c-Fos mRNA 安定化不全は、microRNA 過剰発現が主因であると考えられた。更に、miR-34a または miR-155 を過剰発現させた細胞では、c-Fos 蛋白の basal level が低下していることが確認された。

(2) MDS 患者から分離した末梢血好中球中の c-Fos 蛋白レベルは、miR-34a レベルと有意な負の相関を示した ($r = -0.618$, $p < 0.05$)。一方、miR-155 レベルと c-Fos レベルの間には有意な相関は認められず ($r = -0.135$, $p = 0.63$)。MDS の c-Fos 減少には miR-155 よりも miR-34a の寄与が大きいことが示唆された。c-Fos 蛋白レベルは健常人と同等のレベルを保つ症例から有意に減少している症例まで多様性が観察された (図 1)。



好中球を1 μ M LPSで3時間刺激した場合、好中球培養液中のTNF- α 濃度は、c-Fos 正常患者(143.5 \pm 65.7 pg/mL)では健常人(150.8 \pm 81.5 pg/mL)と変わらない値を示したが、低発現患者では有意に高い値を示した(735.4 \pm 237.5 pg/mL)(図2)。

図2. LPS 刺激後の培養液中TNF- α 濃度



c-Fos siRNA を導入した HL60 細胞を好中球に分化させて1 μ M LPS で刺激した場合、control siRNA 導入細胞に比べて、TNF- α DNA プロモーター領域と結合した NF- κ B p60 の増加も、TNF- α mRNA 量の増加率も有意に大きかった。非刺激時の NF- κ B-DNA 結合と TNF- α mRNA レベルは control siRNA 導入細胞との間に差はなかった。以上より、c-Fos の減少している MDS 好中球は、NF- κ B と DNA 結合を抑える c-Fos の作用が不十分であるために、TNF- α の転写が亢進し、TNF- α 濃度の高い環境形成に寄与することが示唆された。

(3) HL60 を H₂O₂ 存在下で培養した場合、H₂O₂ 濃度及び時間依存性に TNF- α mRNA レベルは上昇した。c-Fos を強発現させると、この H₂O₂ による TNF- α 増加は有意に小さくなり、TNF- α DNA プロモーター領域に結合した NF- κ B p60 の割合は減少した。c-Fos 発現を siRNA で減少させた場合には NF- κ B の DNA 結合も TNF- α mRNA の増加率も有意に

大きくなった。以上より、c-Fos には酸化ストレス時にも、NF- κ B の DNA 結合を抑制して TNF- α の過剰発現を防ぐ働きがあり、c-Fos 発現低下細胞は酸化ストレス時に TNF- α を過剰産生する可能性が示唆された。

(4) miR-34a または miR-155 を強発現させて好中球に分化させた HL60 細胞では、control miRNA 導入細胞に比べて、fMLP 刺激時の myeloperoxidase 及び elastase の放出が亢進し、fMLP 及び IL-8 に向かう遊走は有意に低下した。H₂O₂ による apoptosis と ROS 産生量には、有意な変化は認められなかった。以上より、MDS で報告されている好中球の遊走能低下には、miR-34a と miR-155 の過剰発現が関与していることが示唆された。

(5) miR-34a を過剰発現した HL60 では、Rho protein Cdc42 に特異的な guanine nucleotide exchange factor (GEF) DOCK8 の発現レベルの低下が確認された。一方、miR-155 過剰発現 HL60 では、Cdc42 特異的 GEF FGD4 と、Rho protein Rac1 の減少が確認された。DOCK8、FGD4、Rac1 の発現をそれぞれ siRNA で減少させると、いずれも fMLP 及び IL-8 に向かう HL60 の遊走が抑制された。更に、MDS 患者と健常人から分離した末梢血好中の DOCK8、FGD4、Rac1 それぞれの蛋白レベルは、fMLP に向かう遊走能と相関し (r = 0.642, 0.686, 0.436) IL-8 に向かう遊走能とも有意な相関を示した (r = 0.778, 0.659, 0.606)。以上より、MDS 好中球で見られる遊走能低下に DOCK8、FGD4、Rac1 の発現低下が寄与していることが、新たに示唆された。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 2 件)

Cao M, Shikama Y, Kimura H, Noji H, Ikeda K, Ono T, Ogawa K, Takeishi Y, Kimura J. Mechanisms of impaired neutrophil migration by microRNAs in myelodysplastic syndromes. *J Immunol.*, 査読有, 2017 Mar 1;198(5):1887-1899. doi: 10.4049/jimmunol.1600622

Shikama Y, Cao M, Ono T, Feng X, Noji H, Kimura H, Ogawa K, Suzuki Y, Ikeda K, Takeishi Y, Kimura J. Reduction of c-Fos via overexpression of miR-34a results in enhancement of TNF-production by LPS in neutrophils from myelodysplastic syndrome patients. *PLoS ONE.*, 査読有, 2016 Aug 11;11(8):e0158527. doi: 10.1371/journal.pone.0158527

(学会発表)(計 10 件)

Cao M, Shikama Y, Kimura H, Noji H,

Ikeda K, Ono T, Ogawa K, Takeishi Y, Kimura J. Mechanisms of impaired neutrophil migration by microRNAs in myelodysplastic syndromes. 第 90 回日本薬理学会年会 (長崎市) 査読無し 2017 年 3 月 16 日

Cao M, Shikama Y, Anzai M, Noji H, Kimura H, Kimura J. Mechanisms of attenuated migration of neutrophils in myelodysplastic syndromes. 第 89 回日本薬理学会年会 (名古屋市) 査読無し 2016 年 3 月

Cao M, Shikama Y, Anzai M, Kimura J. Impaired neutrophil migration resulting from miR-34a and miR-155 overexpressed in neutrophils from myelodysplastic syndrome patients. The 57th ASH Annual Meeting (Orland). 査読有, 2015 年 12 月 6 日

Shikama Y, Cao M, Ono T, Yamakawa K, Anzai M, Feng X, Kuriyama K, Hiruta S, Noji H, Kimura H, Ogawa K, Ikeda K, Takeishi Y, Kimura J. Excessive TNF- α production resulting from reduction of c-fos via aberrant expression of miR-34a in neutrophils from myelodysplastic syndrome patients. The 57th ASH Annual Meeting (Orland). 査読有, 2015 年 12 月 6 日

Cao M, Shikama Y, Kimura J. Attenuated migration of neutrophils resulting from overexpression of miR-34a and miR-155 in MDS. 第 77 回日本血液学会 (金沢市) 査読無し, 2015 年 10 月 17 日

Shikama Y, Cao M, Yamakawa K, Feng X, Anzai M, Ono T, Noji H, Ogawa K, Suzuki Y, Kimura H, Takeishi Y, Kimura J. Excessive TNF α production via reduced expression of c-Fos in neutrophils from myelodysplastic syndrome patients. 第 77 回日本血液学会 (金沢市) 査読無し, 2015 年 10 月 17 日

曹美婉、色摩弥生、木村純子. miR-34a targets Cdc42 activator DOCK8 and miR-155 targets Rac1 and Cdc42 activator FGD4 to impair neutrophil migration in MDS. 第 66 回日本薬理学会北部会 (富山市) 査読無し, 2015 年 9 月 18 日

橋本舞、色摩弥生、安斎美智子、木村純子. 酸化ストレス下の TNF- α 産生に対する c-fos の抑制作用. 第 66 回日本薬理学会北部会 (富山市) 査読無し, 2015 年 9 月 18 日

Shikama Y, Cao M, Yamakawa K, Feng X, Anzai M, Ono T, Noji H, Ogawa K, Suzuki Y, Kimura H, Takeishi Y, Kimura J. Effects of miR-34a/miR-155-mediated c-Fos reduction on TNF α production in myelodysplastic syndromes. 第 76 回日

本血液学会 (大阪市) 査読無し、2014 年 10 月

Cao M, Shikama Y, Kimura J. Effects of miR-34a and miR-155 overexpression on neutrophil functions. 第 65 回日本薬理学会北部会 (福島市) 査読無し、2014 年 9 月 26 日

〔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

色摩 弥生 (SHIKAMA, Yayoi)
福島県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号 : 40291562

(2) 研究分担者

七島 勉 (SHICHISHIMA, Tsutomu)
福島県立医科大学・医学部・研究員
研究者番号 : 10192105

野地 秀義 (NOJI, Hideyoshi)
福島県立医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 20347214

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし