

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：32644  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2014～2015  
課題番号：26830115  
研究課題名(和文) NOTCH1抑制性miRNAによるT細胞性リンパ芽球性白血病治療

研究課題名(英文) Investigation of miRNA targeting Notch1

## 研究代表者

奥山 一生 (OKUYAMA, Kazuki)

東海大学・医学部・客員准教授

研究者番号：60712750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：T-ALLは小児に好発する白血病であり、約50%にNotch1変異がみとめられる。本研究では、Notch1抑制効果をもつmiRNAの探索を行った。

Notch1が接着分子として機能することに注目し、miRNA導入後のT-ALL細胞のNotchリガンドへの接着を検討した。miRNA導入により接着力の低下した細胞を回収し、候補となる5つのmiRNAを得た。うち1つに試験管内でのNotch1抑制機能が示唆されたため、骨髄移植実験を行ったところ、候補miRNAを発現させた造血前駆細胞はB細胞によりよく分化した。候補miRNAはNotch1発現を抑制することでB細胞分化を促進したと予想される。

研究成果の概要(英文)：Notch1 mutation is one of the most frequent mutation found in T-ALL. miRNA is non-coding RNA regulating target genes post-transcriptionally. Recently miRNAs are suggested as potential biologics. In this study, I investigated miRNA targeting Notch1.

Focusing on the function of Notch receptors as adhesion molecules, I established a screening system for miRNA targeting Notch1. Library of murine miRNAs was transduced into T-ALL-derived MOLT-4, and MOLT-4 cells were incubated on OP9 expressing Notch ligand, Dll4. If transduced miRNA represses Notch1 in MOLT-4, it is suggested the adhesion of MOLT4 to Dll4 would be interfered. By use of this system, I obtained 5 candidate miRNAs. One of them, miR-669m-1 functionally suppressed Notch1 in vitro. Next I performed bone-marrow transfer experiments, and found that miR-669m-1 expressing LSK cells efficiently gave rise to B cells. Since Notch1 suppresses B-lymphopoiesis, miR-669m-1 was suggested to enhance B cell development by repressing Notch1.

研究分野：血液学

キーワード：T-ALL Notch1 miRNA

## 1. 研究開始当初の背景

T 細胞性リンパ芽球性白血病 (T cell Acute Lymphoblastic Leukemia : T-ALL) は小児および思春期男児に頻発する T 細胞性の白血病である。治療には多剤併用化学療法と造血幹細胞移植が適応され、近年では約半数の患者での治癒がみこまれる。しかしながら、一部症例では化学療法による十分な抗腫瘍効果がえられないことや、再発時の予後がきわめて不良であることなど、解決すべき問題をいまだ抱えている [ ]

T-ALL 患者の約 50%において、Notch シグナルを伝達する受容体 NOTCH1 に変異がみとめられる [ ] 哺乳類において Notch シグナルは、4 種の受容体 (NOTCH1、2、3、4) と 5 種のリガンド (DLL1、3、4、JAG1、2) により伝達される。T 細胞の初期分化、末梢 T 細胞の活性化、未熟胸腺細胞、T 細胞の増殖には、NOTCH1 からのシグナルが必須である [ ] Notch シグナルは受容体とリガンドが結合し、受容体細胞外ドメインが TACE によって、細胞内ドメイン (ICN) が  $\gamma$ -Secretase により切断され、ICN が核内に移行、転写因子として機能することで伝達される。

T-ALL にみとめられる NOTCH1 変異として、T 細胞受容体  $\beta$  鎖遺伝子座への転座や、Heterodimerization ドメイン、ICN 領域の変異などが報告されているが、いずれ変異も NOTCH1 の持続的活性化を引き起こすものである [ ]。ヒト NOTCH1 の活性化型 ICN を発現させた造血幹細胞を X 線照射処置をほどこしたマウスに移植すると、T-ALL が発症することが報告されており、過剰な NOTCH1 シグナルが T-ALL 発症の要因となることは明らかであろう [ ]

ICN が切断されることが Notch シグナル伝達に重要であることから、 $\gamma$ -Secretase に対する阻害薬 (GSI) が T-ALL の分子標的治療薬として注目されている [ ]。しかし、NOTCH1 変異をもつ T-ALL 由来細胞株のいくつかに GSI 耐性がみとめられること [ ]、また、GSI は NOTCH1 シグナルに限らず全ての Notch シグナルを阻害するために、全身性に重篤な副作用 (消化管毒性など) を引き起こすといった問題点を抱えている。従って、NOTCH1 に対して、より特異性の高い、新規治療法の開発が求められている。

## 参考文献

- J Clin Invest, 2012;122:3398-406
- Science, 2004;306:269-271
- Immunity, 1999;11:299-308
- Annu Rev Immunol, 2010;28:343-365
- J Exp Med, 1996;183:2283-2291
- Annu Rev Pathol, 2008;3:587-613
- Leukemia, 2009;23:1374-1377
- Cancer Research, 2009;69:3060-3068
- Hematology, 2009;1:353-361

## 2. 研究の目的

NOTCH1 変異に起因する T-ALL の新規治療法の開発を目指し、その前段階として、NOTCH1 を標的とするマイクロ RNA (miRNA) を探索する。

タンパク質をコードしない小分子 RNA、miRNA は、様々な標的遺伝子に発現を転写後に制御する機能性 RNA である。miRNA は標的となるメッセンジャー RNA の 3'側非翻訳領域 (3'UTR) に部分相補的に結合することで、その翻訳を抑制する。近年の研究成果から、miRNA による遺伝子発現制御が、発がん、がん抑制、免疫機能、細胞の分化・発生とさまざまな生命現象に少なからぬ影響を及ぼしていることが明らかとなっている。

miRNA は生物製剤として、試験管内での合成が容易であり、かつタンパク質製剤と比較すると安価に製造することが可能である。また、生体内の代謝系により正常に分解されるので化学製剤とは異なり毒性が低いという利点がある。つまり、NOTCH1 を標的とする miRNA を同定することができれば、これを NOTCH1 阻害剤として活用することが期待できる。

## 3. 研究の方法

BONAC 社より提供されたマウス miRNA ライブラリー (マウスに存在する 786 種類の miRNA が搭載されている) より、ヒト NOTCH1 の発現を抑制しうる miRNA を同定する。Notch 受容体が接着分子として機能することに着目し [ ]、候補となる miRNA を探索する。

Notch 受容体は、試験管内において Notch リガンドを介して足場となる細胞に強く接着する。そこで miRNA ライブラリーを導入した T-ALL 細胞を、足場細胞上に播種し、浮遊していたものを回収することで、そこから候補となる miRNA を得る。もし T-ALL 細胞に導入された miRNA が NOTCH1 発現抑制効果を発揮すれば、細胞膜表面の NOTCH1 分子が減少し、その結果、足場細胞への接着力が低下、つまり浮遊すると予想される。

次に、得られた候補 miRNA の機能解析を行う。まず初めに、得られた候補 miRNA が NOTCH1 を標的とし得るか、コンピュータ解析を行い、足場細胞への接着実験により抑制効果の再検討、ルシフェラーゼを利用した擬似実験を行う。これらの検証で高い成績を収めた候補 miRNA については、さらにマウス生体内での Notch1 抑制効果の検討を行う。具体的には、候補 miRNA が T、B 細胞分化に及ぼす効果、候補 miRNA 欠損マウスの作製および解析である。

## 参考文献

- J Immunol, 2010;185:3905-3912
- PLoS One, 2014;9

#### 4. 研究成果

##### (1) 候補 miRNA の探索

T-ALL 由来の細胞株 MOLT-4 にマウス由来 miRNA、786 種からなるライブラリーを導入した。miRNA ライブラリーは、レンチウイルスを基盤としたベクターに構築されており、1 つのベクターが 1 種類の miRNA を発現する。理論上 1 つの細胞には 1 つのウイルスがランダムに感染するので、1 つの細胞に導入される miRNA も 1 種類となる。

Notch 受容体を介した接着力を検討するため、Notch リガンドの 1 つである Dll4 を過剰に発現させた細胞 OP9-Dll4 を足場細胞に採用した。ライブラリーを導入した MOLT-4 を OP9-Dll4 上に播種し、1 時間培養した後、浮遊していた MOLT-4 を回収した。回収した MOLT-4 を 1 週間培養、増殖させた後、再度、同様の操作を行い、回収した細胞に導入された miRNA を同定した。

miR-3966、miR-1966、miR-467b、miR-495、miR-669m-1 の 5 種類の miRNA が候補として得られた。これら候補のうち、miR-467b と miR-669m-1 は同じ miRNA ファミリーに属し、無作為に 5 種類の miRNA を選択した場合に 2 つ以上の候補が同一ファミリーに属する確立は 0.03 である。miRNA の標的遺伝子を予測するアルゴリズム microRNA.org および TargetScan を用いて、それぞれの候補の標的遺伝子を予測したところ、miR-495 は Notch1 と Notch2 を、miR-669m-1 が Notch2 を標的とする可能性が示唆された ( $\chi^2$  test,  $p < 0.05$ )。さらに miRANDA を用いて、NOTCH1 3'UTR 上に候補 miRNA の部分相補的配列を検索したところ、全ての候補 miRNA の標的配列が存在することが明らかとなった。

候補 miRNA の NOTCH1 発現抑制効果を検討するために、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。3'側にヒト NOTCH1 の 3'UTR を融合したルシフェラーゼ変異体を作製し、候補 miRNA がルシフェラーゼ発現を抑制するかを解析した。その結果、miR-669m-1 が再現性をもって NOTCH1 3'UTR をもつルシフェラーゼの発現を抑制することが分かった。そこで miR-669m-1 を T-ALL 由来細胞株 Jurkat に過剰発現させ、Dll4 への接着を計測したところ、miR-669m-1 は Jurkat の OP9-Dll4 への接着を抑制することが分かった。以上の結果から miR-669m-1 は機能的に Notch1 の発現を抑制する可能性が示唆された。

Notch1 は生体内において、T 細胞の分化促進と、B 細胞の分化抑制に重要な役割を担っている。Notch1 欠損マウスの胸腺内では、T 細胞分化が著しく損なわれ、B 細胞の異所性分化が起こる。逆に、骨髄内の造血前駆細胞に活性化型 Notch1 を人為的に発現させると、B 細胞分化が抑制される。生体内での miR-669m-1 の機能解析を行うために、まず

B 細胞分化段階における miR-669m-1 の発現様式を解析した。Notch1 の発現は B 細胞分化の進行につれて減少するが、miR-669m-1 の発現はこれに反比例し、分化が進むにつれて上昇することが分かった。次に、miR-669m-1 が B 細胞分化に及ぼす影響を検討するために骨髄移植実験を行った。マウス骨髄より分化マーカー陰性の造血幹・前駆細胞集団を純化、miR-669m-1 を遺伝子導入し、X 線照射処置を施したレシピエントマウスに移植した。2 週間飼育し、骨髄細胞を回収、B 細胞分化マーカーである B220 の発現をフローサイトメトリを用いて解析した。対照実験群では、移植した細胞の約 10% が B220 を発現する B 細胞に分化していた。一方 miR-669m-1 を発現させた移植細胞の 80% が B 細胞に分化していた。この結果から miR-669m-1 は、Notch1 の発現を抑制することで、B 細胞分化を促進したのではないかと予想される。

さらに miR-669m-1 の生理的重要性を解析するために、CRISPR/Cas9 システムによる miR-669m-1 欠損マウスの作製を行った。miR-669m-1 の上流と下流の 2 箇所に gRNA を設計することで、miR-669m-1 の完全欠損マウスの作製を計画した。現在 (2016 年 3 月)、得られたヘテロ接合体を掛け合わせ、ホモ欠損マウスを得たところである。今後、欠損マウスの造血系を解析する予定である。miR-669m-1 が Notch1 の発現を調節するのであれば、miR-669m-1 欠損マウスでは、B 細胞分化に異常を呈すると予想される。

本研究では、Notch 受容体の接着分子としての機能に着目し、目的の miRNA のスクリーニングを行った。このスクリーニング法は、極めて簡便であり、また短期間で行うことができる。

miRNA あるいは shRNA や siRNA の導入によりある遺伝子が抑制された時、その遺伝子が細胞の生存や増殖に極めて重要であると、細胞は著しく減少あるいは失われ、その結果、細胞に導入されていた小分子 RNA を同定することが困難となる。従って、今回のような機能的 miRNA を探索する場合は、迅速な操作が求められる。また、標的遺伝子の発現をフローサイトメトリなどで解析する方法と異なり、本スクリーニング法は標的遺伝子の発現をより機能的に解析することに等しい。従って、完全に発現が抑制された細胞に加えて、部分的に抑制された細胞も同時に回収することができるという利点もある。

分子標的治療薬としての miRNA は期待が高く、今後、より多くの疾患での活用が見込まれる。もし、標的となるタンパク質が膜表面分子であり接着分子として機能するのであれば、本スクリーニング法はそれらの遺伝子標的 miRNA の探索にも有効であろう。今後、本スクリーニング法のさらなる開発、発展にも努めたいと考える。

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 5 件)

奥山一生, 幸谷愛, [白血病細胞の分化誘導と非コード RNA miR-126]、**感染免疫炎症**、査読無、45(2)巻、2015、68-70

A. Murata, M. Yoshino, M. Hikosaka, K. Okuyama, L. Zhou, S. Sakano, H. Yagita, S.I. Hayashi, [An evolutionary-conserved function of mammalian Notch family members as cell adhesion molecules]、**PLoS One**、査読有、9(9)巻、2014

DOI:10.1371/journal.pone.0108535

奥山一生, 幸谷愛, [マイクロ RNA による血液細胞分化制御]、**血液内科**、査読無、68(6)巻、2014、725-729

K. Okuyama, J. Ogata, N. Yamakawa, B. Chanda, A. Kotani, [Small RNA as a regulator of hematopoietic development, immune response in infection and tumorigenesis]、**Int J Hematol**、査読有、99(5)巻、2014、553-560

DOI:10.1007/s12185-014-1564-4

N. Yamakawa, K. Okuyama, J. Ogata, A. Kanai, A. Helwak, M. Takamatsu, K.I. Imadome, K.H. Takakura, B. Chanda, N. Kurosaki, H. Yamamoto, K. Ando, H. Matsui, T. Inaba, A. Kotani, [Novel functional small RNAs are selectively loaded onto mammalian Ago1]、**Nucleic Acids Res.**、査読有、42(8)巻、2014、5289-5301

DOI:10.1093/nar/gku137

[学会発表](計 7 件)

那須亮, 奥山一生, 扇屋大輔, 穂積勝人, 村田暁彦, 安藤潔, 幸谷愛, [Identification of Notch-targeting miRNA that regulates B cell development and has therapeutic potential in T-ALL]、**第74回日本癌学会学術集会**、2015年10月8日~10日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

**ポスター発表**

K. Okuyama, K. Hozumi, M. Akihiko, K. Ando, A. Kotani, [Functional and comprehensive investigation of microRNA targeting Notch receptors]、**第43回日本免疫学会学術集会**、2014年12月10日~12日、国立京都国際会館(京都府京都市)

**口頭発表**

A. Sato, N. Yamakawa, K. Okuyama, A. Kotani, K. Ando, [The critical interaction between Epstein-Barr virus positive B-cells and tumor associated macrophages]、**56<sup>th</sup> ASH Annual Meeting**、2014年12月7日、CA, USA

**ポスター発表**

B. Chanda, T. Ikawa, K. Okuyama, K.

Hozumi, K. Ando, A. Tojo, H. Kawamoto, A. Kotani, [EBF deficient hematopoietic progenitor cells potentially differentiated into immature B cell: EBF1 dispensable for B cell lineage commitment from pro-B to pre-B stage]、**56<sup>th</sup> ASH Annual Meeting**、2014年12月6日、CA, USA

**ポスター発表**

奥山一生, 黒崎なつみ, 水谷隆之, 大庭成喜, 恵口豊, 幸谷愛, [MicroRNA ライブラリーを用いた Notch 受容体標的 MicroRNA の探索]、**第6回日本 RNAi 研究会**、2014年8月28日~30日、グランドプリンスホテル広島(広島県広島市)

**口頭発表**

奥山一生, 幸谷愛, [血液腫瘍における MicroRNA]、**東海大学総合医学研究所・糖鎖科学研究所・創造科学技術研究機構 第6回公開合同シンポジウム**、2014年7月25日、東海大学湘南校舎 17号館(神奈川県平塚市)

**シンポジスト口演**

奥山一生, [MicroRNA-126 による転写因子非依存的?な B 細胞運命決定制御機構]、**第10回麒麟塾**、2014年7月12日、コクヨホール(東京都港区)

**招待口演**

6. 研究組織

(1)研究代表者

奥山 一生 (OKUYAMA, Kazuki)

東海大学・医学部・客員准教授

研究者番号: 60712750