

令和 4 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08321

研究課題名(和文) 白血病細胞のマイクロRNA発現を利用した新規治療法開発のための探索的研究

研究課題名(英文) translational research for novel therapy for leukemia utilizing microRNA expression analysis

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：小児ALLのマイクロRNA(miR)発現解析の先行研究に基づき、独自のlenti-virus vectorを用いてALL細胞株のmiR-146a knock downを行ったところ、コロニー形成能の抑制を認め、NOTCH1 pathwayの関与が示唆された。しかし、マウスへの生着性には有意な差を認めなかった。そこで、改めて、次世代シーケンサーを用いて小児ALLのmRNAとmiRの網羅的発現解析を行ったところ、miR発現によってのみ規定される新たな予後不良群(miR-low cluster; MLC)を同定した。MLCパターンを示すALL細胞の分子遺伝学的基盤を解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児急性リンパ性白血病はリスクに応じた治療の層別化により予後の改善が見られてきた。先進国においては、90%以上の患者において長期生存が見られるようになってきたものの、未だ20%程度の患者は再発し、造血細胞移植を含む強力な治療が必要となる。さらなるリスク因子の探求は合併症なき治癒を目指す上で極めて重要である。本研究では、特定のマイクロRNA発現パターンが、従来のリスク因子とは独立した新たな因子になることを解明した点で極めて重要で、今後の診断治療の進歩が期待されるばかりでなく、分子学的背景の研究により新規治療法の開発に繋がりうる重要な成果と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Based on the preceding data on microRNA expression of childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL), we knocked down miR-146a of ALL cell lines using our lentivirus vector system. We found that the knockdown inhibited colony formation, which is mediated by the NOTCH pathway. However, the knocked-down cells did not show growth inhibition in the immune-compromised mouse model. Considering the possibility that a single miR does not significantly impact leukemic cell biology, we investigated not only miR but also mRNA expression of ALL patient samples by next-generation sequencing. By incorporating deposit data of pediatric ALL, we identified a novel miR signature (miR-low cluster; MLC), which is associated with poor prognosis independently of unknown risk factors. Investigation on the molecular basis of MLC is underway.

研究分野：小児血液腫瘍

キーワード：マイクロRNA 急性リンパ性白血病

1. 研究開始当初の背景

小児急性リンパ性白血病 (ALL) はリスク因子に基づいた治療の層別化により、著明な改善が見られた。しかしながら、およそ 2 割の患者においては再発が見られる。再発症例においては、一部の予後良好群を除いて依然として、予後不良であり新規治療法の開発と同時に、新たな予後因子の探索が望まれている。

当初植物において同定されたマイクロ RNA はその後、動物細胞でも数多く同定され個体発生や分化、細胞増殖などに深く関わっていることが示された。その後、慢性リンパ性白血病において発現の異常が報告されたことをきっかけに、数多くのヒトがんにおいて発現異常が発見され注目が集まった。しかしながら、マイクロ RNA の発現異常が持つ生物学的意義については不明な点が多く、また、白血病の領域での microRNA 研究はほとんど進んでいない状況であった。

本邦において小児白血病の診断は、全国的組織である小児白血病リンパ腫研究グループが主導して全例で中央診断が行われ、予後因子の解析が行われているが、研究開始当時、小児初発 ALL 細胞を用いたマイクロ RNA 発現解析が行われ (成育医療センター清河先生、未発表データ)、既知の遺伝子変異などのリスク因子とは関係なく、共通して上昇しているマイクロ RNA が同定された。前述のようにマイクロ RNA の発現異常が白血病の生物学的特徴及ぼす影響については殆ど知られておらず、これらのマイクロ RNA の機能については不明であったが、あらたなリスク因子としての可能性が検討されつつあった。

2. 研究の目的

本研究では小児 ALL の初発サンプルで明らかになった高発現マイクロ RNA に関して、白血病細胞の生物学的特徴への影響を検討することを目的とした。また、治療ターゲットとなりうるかの検討も視野に入れた。上述のように、さまざまな悪性腫瘍においてマイクロ RNA の発現異常が報告されているが、白血病に関しての報告は非常に少なく、治療開発を目的とした研究はほぼ行われていない。特に、本研究で用いた lenti-virus vector system を用いたマイクロ RNA の stable knock down の系は、Luigi Naldini 研究室 (Milano, Italy) との共同研究で、knock down の効果が長期間に及ぶという独自の特徴から、新たな知見がえられることが期待された。

3. 研究の方法

我々は、これまでの microRNA sensing lenti-virus vector を用いて (Luigi Naldini 研究室)、造血幹細胞における miR-126 の発現解析などを行ってきたが、本研究では同じレンチウイルスのバックボーンを用いて microRNA knock down lenti-virus vector (miR-KD) を開発し、従来の sensing lenti-virus vector によるマイクロ RNA の可視化に加えて、特定のマイクロ RNA の stable knock down が可能な系を構築した (研究成果 図 1)。
本研究では以下の順序で実験を計画した。

1. 高力価ウイルス粒子の作製

上述の造血系において幾つかの研究報告のある miR-146a に着目し、miR-146a knock down

lenti-virus vector (miR-146a KD) を作成する。miR-146 と相補的配列をもつ miR-146 binding site を組み込んだバックボーンベクターに 3 種類のアクセサリープラスミド (RRE, REV, VSV-G) を 293T 細胞に同時にリン酸カルシウム法でトランスフェクションして感染ウイルスを作成する。

2. ALL 細胞株への mir-146a KD virus vector の導入

様々な ALL 細胞株を対象に miR-146a KD virus を感染させ miR-146a を長期間 stable knock down し、細胞増殖性の変化、コロニー形成能、細胞周期解析などを行って、細胞学的影響を検討する。

3. miR-146a KD のターゲットの解析

miR-146a KD がもたらす増殖性の変化などのデータに基づき、ターゲット遺伝子の同定や、そのような変化を引き起こす細胞内シグナル伝達回路などを解析する。

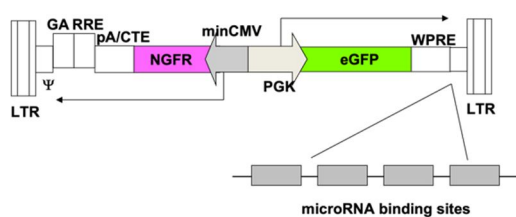
4. 患者検体を用いた miR-146a KD の検討

前年度までの結果を踏まえ、細胞株でみられた変化が患者由来の primary ALL cell でもみられるかを検討する。

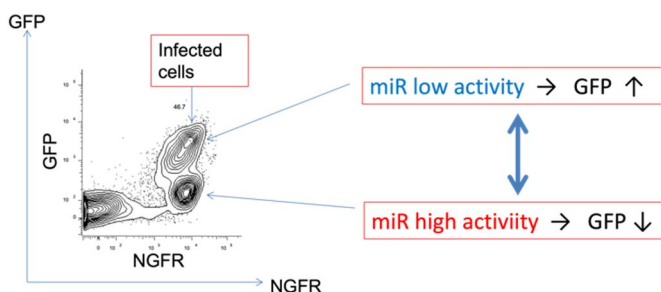
4. 研究成果

1. miR-146a の sensing lenti-virus vector ならびに lenti-virus knockout vector の作成と高力価 virus の産生

sensing vector

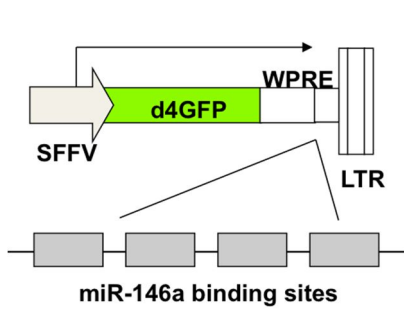


2種類のプロモーターを用いて細胞内のマイクロRNAを可視化する

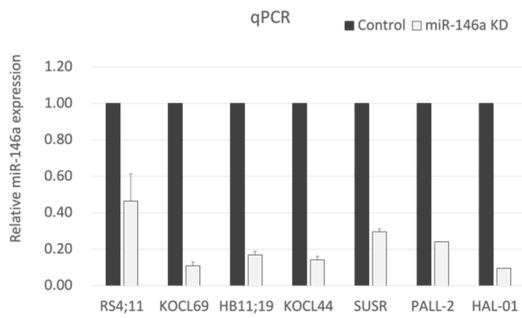


マイクロRNAの可視化例：
図はmiR-126発現が高いCD34+にmiR-126 sensing vectorを適応した解析例

knock down vector



強力なプロモーターであるSFFVによってmiR-146a binding sitesが高発現し、miR-146aを吸着する（スポンジベクター）

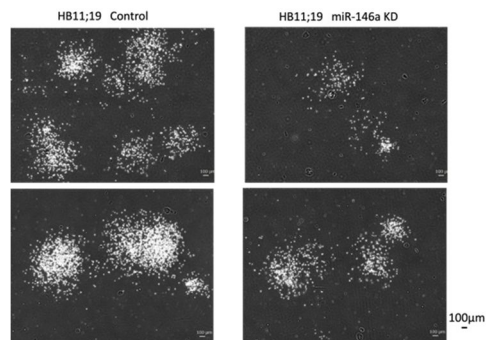
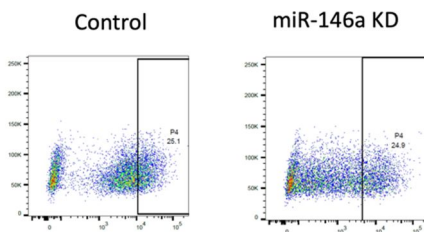


様々な ALL 細胞株に miR-146a knock down lenti-virus vector を感染させ、miR-146 の発現を PCR で定量したところ一様に発現の低下をみとめ、knock down の効果を確認した。

2 miR-RNA146 が高発現している KOCL 株、HB11;19 株を用いて、miR-146a KD lenti-virus vector による同 miR KD を行い、遺伝子発現パターンを解析した。

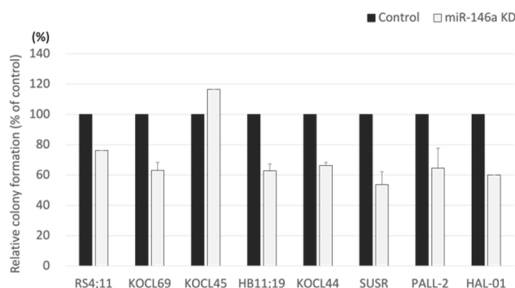
KD vector 陽性分画をソーティングし、細胞増殖、細胞周期解析、薬剤感受性を検討したが、いずれも control との差を認めなかった。しかしながら、コロニーアッセイでは KD においてコロニー形成能の低下を認めた。

KD vector + 細胞をソート

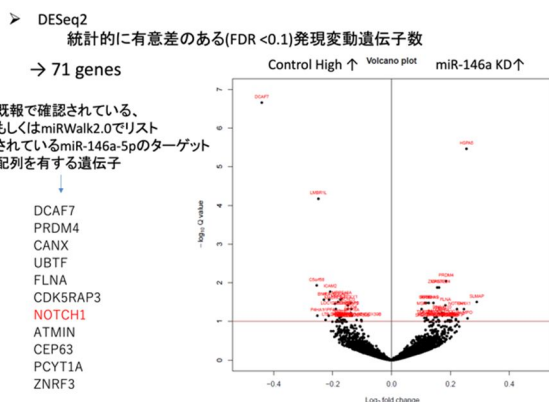


コロニーアッセイ

同様の傾向は他の細胞株でも確認された。



次に、KD を行った細胞株の RNA-sequence を行い、発現遺伝子を検討したところ、miR-146a のターゲット遺伝子で、かつ、造血に関連する NOTCH1 の発現が有意に亢進していることが示された。



併せて、KD した KOCL44 および HB11;19 細胞株を免疫不全マウスに移植し、その生着性を検討したが、残念ながら、有意な差を見出すことはできなかった。

以上から、miR-146a は多くの ALL 細胞株で発現し、その KD はコロニー形成能を低下させ、NOTCH1 遺伝子を含む遺伝子の発現が関係していることが示唆された。しかしながら、腫瘍形成能を検討する免疫不全マウスへの移植では、その差異を見出すことはできず、miR-146a 発現がもたらす生物学的意義の解明に難渋した。ALL に関連した miR 研究をすすめるにあたり、単独の miR の発現では大きな生物学的差異を説明することは困難と考え、新たに、初発小児 ALL 保存検体を次世代シーケンサーを用いて、マイクロ RNA ならびに mRNA の網羅的発現解析を行い、デポジットデータとともに統合解析を行ったところ、miR 発現が一様に低下したクラスター (miR-low cluster ; MLC) を同定した。驚いたことに、それらは既知のリスク因子 (高リスク融合遺伝子など) などとは独立した予後不良群であることを見出した (第 62 回小児血液・がん学会)。現在、MLC 発現パターンを持つ白血病の分子遺伝学的背景を解析中であり、細胞株を用いて、候補遺伝子について細胞増殖や細胞周期など、生物学的特徴に及ぼす影響に付き検討を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 窪田博仁、上野浩生、平松英文、滝田順子
2. 発表標題 B前駆細胞性急性リンパ性白血病 の統合的microRNA解析
3. 学会等名 第62回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------