

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 12 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790911

研究課題名（和文）難治性白血病におけるマイクロ RNA を介した分子病態の解明及び新たな治療戦略の探索

研究課題名（英文）Novel therapeutic strategy on analysis of molecular mechanism through micro RNA in refractory leukemia

研究代表者

小埜 良一（ONO RYOICHI）

三重大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：40422414

研究成果の概要（和文）：本研究では、まず、既報に準じて難治性の染色体 11q23 転座型白血病モデル細胞系を確立し、その性状を検討した。その結果に基づき、total RNA を用いた網羅的解析を行い、少なくとも 3 種類のマイクロ RNA の興味深い発現の変動を見出した。これらは、再現性を持って変動していることも確認できた。この知見の臨床的な可能性を検討する目的で、新規マイクロ RNA 発現導入ベクターの可能性も追求し、治療的効果に対する解析を進めている。

研究成果の概要（英文）：In the present study, I first developed a model of refractory leukemic cells with rearrangement of chromosome 11q23 as previously described, and characterized this model cells. On the basis of characterization, comprehensive analysis of total RNA derived these cells revealed interesting deviation of at least three kinds of micro RNA expression. This finding was confirmed by other experiments. To examine the possibility of clinical benefit on this finding, I am investigating a novel vector transducing micro RNA expression, and also going to analyze therapeutic effect using this vector.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：造血器腫瘍

1. 研究開始当初の背景

(1) マイクロ RNA は、21-25 塩基程度の小さな non-coding RNA で、特定の mRNA の翻訳を抑制することなどによって、遺伝子発現レベルを負に調節している分子である (Bartel, D.P., Cell, 116:281-297, 2004.)。他の mRNA 同様に転写された primary microRNA から precursor microRNA が切り

出され、細胞質内に運ばれて修飾を受けて、mature microRNA となって、標的遺伝子の 3' 非翻訳領域に結合するなどして、作用する。植物、線虫からヒトに至る多数の動物細胞において存在が確認され、特に哺乳類では数百種類以上が同定され、しばしば種を越えて高度に保存されている。生体においては、組織や発生段階に特異的に発現し、増殖・分

化・アポトーシスなどの様々な生命現象において、重要な役割を果たしていることが次々と報告されている。

最近、様々な悪性腫瘍を含む多様な疾患において、マイクロ RNA は分子病態に密接に関与していることが明らかにされてきた(Calin, G.A., et al., Nat Rev Cancer, 6:857-866, 2006.)。幾つかの病型の白血病に関しても、アポトーシスに関連する特定マイクロ RNA の発現レベルが低下する、白血病に関連した遺伝子変異産物(AML1-MTG8 融合蛋白)が分化促進に関与する特定マイクロ RNA の発現を負に制御するなど、興味深い報告が散見される。しかし、11q23 転座型白血病を含む多くの病型の白血病では、マイクロ RNA の関与する分子病態について十分な解析はなされておらず、未解明な点が数多く残されている。

(2) 染色体 11q23 転座型白血病は、全急性白血病の 5-10%、特に乳児白血病の大部分を占める予後不良の白血病の一つである。11q23 に座位する *MLL* (*Mixed Lineage Leukemia*) 遺伝子と転座相手遺伝子による遺伝子再構成の結果、*MLL* 融合遺伝子が形成され、白血病発症に重要な役割を果たしていることは様々な解析手法を用いて示されてきた(Krivtsov, A.V., et al., Nat Rev Cancer, 7:823-833, 2007)。

(3) 近年、野生型 *MLL* はヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を有する epigenetic な遺伝子発現調節に関与する分子であるのに対し、*MLL* 融合蛋白はそのような活性を持たず、むしろ異常な転写活性をもたらす分子複合体を構成して機能することが明らかにされた。また、造血細胞における自己複製能の亢進や分化阻害を通じて、白血病幹細胞が出現し、二次的遺伝子変異を獲得して発症に至るモデル系が提唱されるなど、白血病発症の分子基盤の研究対象としても、11q23 転座型白血病発症の解析は急速に発展を遂げている。

(4) 一方、造血幹細胞移植を組み合わせた集学的治療法の進歩により、11q23 転座型白血病の治療成績は向上してきたとはいえ、今なお完治しない症例は少なくない。また、乳幼児症例では、強力な治療に関連した重篤な合併症や重大な後遺症などの問題点も指摘されている。従って、*MLL* 融合遺伝子に起因する分子病態をふまえた特異的分子標的療法の開発は、最重要課題の一つである。しかし、重要な分子生物学的知見の蓄積にもかかわらず、そのような分子標的療法は確立されていないのが現状である。

2. 研究の目的

(1) 上記の背景を踏まえ、本研究は、染色体 11q23 転座型白血病をモデルとして、難治性

白血病における、マイクロ RNA を介した遺伝子発現制御機構に注目した分子病態の解析を行い、新たな治療戦略の可能性を探ることを目的とする。

(2) 類似した機能的特徴を有すると分類される *AML1-ETO* 融合蛋白におけるマイクロ RNA の制御機構の報告から、*MLL* 融合蛋白においてもマイクロ RNA を介した未知の白血病発症に関わる分子機構の存在を示唆すると考えられる。従って、異常なマイクロ RNA の制御機構を解明することは、例えば、抑制されたマイクロ RNA の補充的投与、過剰なマイクロ RNA に対する阻害分子の投与など、全く新しい治療戦略の探索にも発展させられると考えられる。このようにして、*MLL* 融合蛋白における、マイクロ RNA の制御分子としての新たな側面の解析を行い、分子標的療法への応用も視野に研究を進める。

3. 研究の方法

(1) *MLL-ENL* の機能レベルを、タモキシフェンの有無で変化させられる *MLL-ENL-ER* 融合遺伝子を作成して、それを用いた不死化細胞株 *MER* を作成する。定常状態と機能低下状態における total RNA を抽出し、マイクロ RNA の発現レベルについて mirVanaTM miRNA Bioarrays などのアレイ解析を行う。

(2) 有意な発現の変化を認めたマイクロ RNA に関して、*MLL-ENL* や *MLL-SEPT6*、あるいは *MLL* 融合蛋白の下流の重要分子 *HOXA9* によって不死化した細胞株について、TaqMan[®] MicroRNA Assays などを用いて、*MLL* 融合蛋白に共通して特異的な変化を来すものを見出す。

(3) 得られた候補マイクロ RNA について、レトロウイルスによる遺伝子導入による発現誘導や、各マイクロ RNA に対する LNA オリゴヌクレオチドから成る knock down probe のトランスフェクションによる機能阻害を行う。そのため、新規のマイクロ RNA 発現導入レトロウイルスベクターを開発し、*MLL* 融合遺伝子による不死化細胞株に遺伝子導入して、表現型の変化を検討する。

(4) より生理的な条件での検討を行うため、conditional *MLL-ENL* transgenic マウスを作成して、*MLL-ENL* 発現誘導時のマイクロ RNA の発現に対する影響を検討する。

(5) *in vitro* で機能的意義を認めたマイクロ RNA の白血病発症における *in vivo* の機能解析を、*MLL* 関連白血病マウスモデルを用いて検討する。このモデルでは、*MLL* 融合蛋白をレトロウイルスで遺伝子導入したマウス造血前駆細胞を、レシピエントに骨髄移植して白血病を発症させる。そして、白血病発症に正に働くと予想される場合は、knock down probe の *in vivo* 投与を行い、負に働くと予想される場合は、発症後の骨髄細胞にレ

トロウイルスを用いて発現導入し、二次移植を行う。

4. 研究成果

(1) pMXs-neo-MLL-ENL (Ono, R., et al., J Clin Invest, 115:919-920, 2005)における MLL-ENL 遺伝子に、ER 断片を、定法に基づいた PCR を用いた手法で融合させ、*MLL-ENL-ER* 融合遺伝子断片を得た。この断片を、レトロウイルスベクターに挿入し、既報 (Ono, R., et al., J Clin Invest, 115:919-920, 2005)のように Plat E 細胞にトランスフェクションして、レトロウイルスを作成し、5-フルオロウラシルを事前に投与したマウスから回収した骨髓細胞に感染させ、遺伝子導入を行った。上記既報にあるように、サイトカイン存在下にメチルセルロース培地で継代を繰り返すことにより、無限に増殖可能なインターロイキン(IL)-3 依存性不死化細胞 MER を樹立した。なお、MLL-ENL-ER の活性化の誘導に必要な薬剤として 4-ヒドロキシタモキシフェン(4OHT)を 1 μ M 添加している。不死化後、実際に 4OHT の有無による MER の細胞数の変化を経時的に観察し、既報 (Ayton, P.M., et al., Genes Dev, 17:2298-2307, 2003)のように、4OHT 依存的に増殖することを確認した(図 1)。

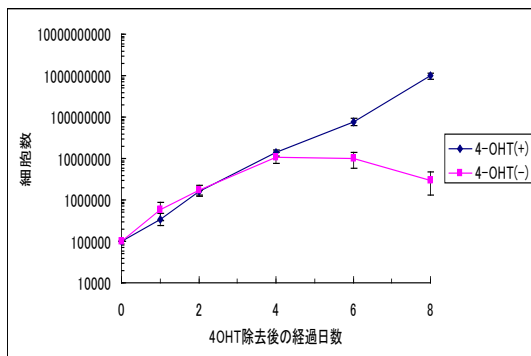


図 1 MER 細胞における 4OHT 依存性

(2) 上記結果を踏まえ、4OHT 除去後 1-4 日経過した MER 細胞から、Trizol 試薬 (Invitrogen 社)を用いて total RNA を抽出し、一部はさらに Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (GE ヘルスケア・ジャパン社)を用いて逆転写反応を行い、cDNA も作成した。作成した cDNA を用いて、経時的に既知の MLL 融合遺伝タンパクの下流遺伝子 *Hoxa7*, *Hoxa9*, *Meis1a* について、既報((Ono, R., et al., J Clin Invest, 115:919-920, 2005))に記載したような RT-PCR を用いて、発現レベルの変化を検討した(図 2)。

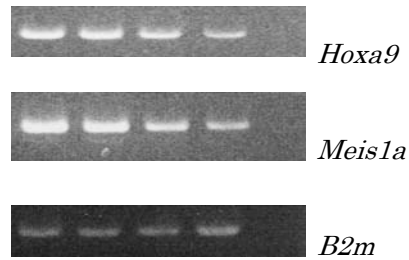
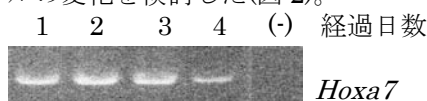


図 2 MER 細胞における 4OHT 除去後の、*Hoxa7*, *Hoxa9*, *Meis1a* の発現レベルの経時的変化

(3) 細胞数や RT-PCR の検討結果より、4OHT 除去後、4 日経過した MER 細胞の total RNA について、mirVana™ miRNA Bioarrays による網羅的な解析を行った(図 3)。



図 3 4OHT 除去後、4 日経過した MER 細胞における mirVana™ miRNA Bioarrays による標識画像

(4) 図 3 を数値化して、4OHT の有無による比較検討を行ったところ、種々の報告等も参考にして、3 種類のマイクロ RNA(未発表データのため、ここでは mir-a, mir-b, mir-c と称する)の変動が特に大きいと判断した。そこで、複数回分の、4OHT 除去した MER 細胞由来の total RNA について、TaqMan® MicroRNA Assays を用いて、確認実験を行った (図 4)。

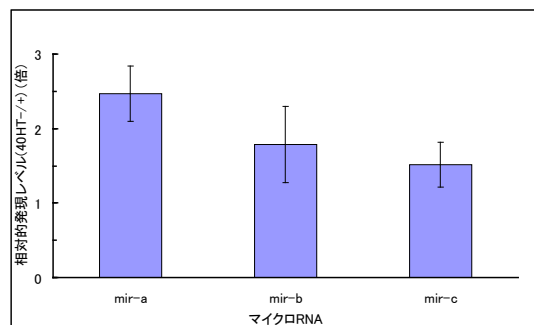


図 4 4OHT 除去後 4 日経過した MER 細胞における mir-a, mir-b, mir-c の相対的発現レベル

さらに MLL-ENL, MLL-SEPT6, *Hoxa9* により不死化した細胞に関して、Ba/F3 細胞

をコントロールとした発現レベルの解析を同様にを行い、mir-a、mir-b に関しては上昇、mir-c に関しては低下、という予備的結果を得たが、現在さらに他の遺伝子による不死化細胞の結果も解析する予定としている。

(4) これらのマイクロ RNA の強制発現導入を効率的に行うため、改変型レトロウイルスベクターに、ある種のプロモーター配列を導入し、その直下にマイクロ RNA 関連の配列を導入するなどして、発現効率の検討を行った。種々の構造を試し、ある種の構造では予備的には一定の発現導入が可能と考えられたが、その頃、別の実験プロジェクトの結果から、大幅に改善の余地があることが示唆されたため、現在、さらなる改変を行う方向で検討中である。

(5) 生理的条件下に近い発現を期待する conditional Tg マウスは 1 系統は樹立されたものの、通常複数系統が必要とされるため、現在、さらにその実験を進めている。

(6) 骨髄移植による白血病発症マウスモデルに関する検討は、上記(4)におけるベクターの開発が完了した後に行い、今後、生体におけるこれらのマイクロ RNA の治療的な役割に関して、解析を行う予定である。

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 6 件)

① Suzuki K, Ono R, Ohishi K, Masuya M, Kataoka I, Liu B, Nakamori Y, Ino K, Monma F, Hamada H, Kitamura T, Katayama N, Nosaka T. IKAROS isoform 6 enhances BCR-ABL1-mediated proliferation of human CD34+ hematopoietic cells on stromal cells. *Int J Oncol.* 40:53-62, 2012, 査読有.

② 野阪哲哉、小埜良一. MLL 融合遺伝子による白血病発症機構. *血液・腫瘍科*, 61:217-223, 2010, 査読無.

③ Minobe K, Ono R, Matsumine A, Shibata-Minoshima F, Izawa K, Oki T, Kitaura J, Iino T, Takita J, Iwamoto S, Hori H, Komada Y, Uchida A, Hayashi Y, Kitamura T, Nosaka T. Expression of ADAMTS4 in Ewing's sarcoma. *Int J Oncol.*, 37:569-581, 2010, 査読有.

④ Ono R, Kumagai H, Nakajima H, Hishiya A, Taki T, Horikawa K, Takatsu K, Satoh T, Hayashi Y, Kitamura T, Nosaka T. Mixed-lineage-leukemia (MLL) fusion protein collaborates with Ras to induce acute leukemia through aberrant Hox expression and Raf activation. *Leukemia*, 23:2197-2209, 2009, 査読有.

⑤ Jin G, Matsushita H, Asai S, Tsukamoto H, Ono R, Nosaka T, Yahata T, Takahashi S, Miyachi H. FLT3-ITD induces ara-C resistance in myeloid leukemic cells through the repression of the ENT1 expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 390:1001-1006, 2009, 査読有.

⑥ Watanabe-Okochi N, Oki T, Komeno Y, Kato N, Yuji K, Ono R, Harada Y, Harada H, Hayashi Y, Nakajima H, Nosaka T, Kitaura J, Kitamura T. Possible involvement of RasGRP4 in leukemogenesis. *Int. J. Hematol.*, 89:470-481, 2009, 査読有.

[学会発表] (計 10 件)

① 小埜良一、榎屋正浩、中島秀明、榎本豊、宮田恵里、上迫努、伊藤守、中村彰秀、鈴木圭、片山直之、北村俊雄、野阪哲哉. 11q23 転座型白血病における自己複製能関連転写因子を介した新規分子メカニズムの解析. 第 53 回日本小児血液・がん学会 学術集会、2011 年 11 月 25 日、前橋.

② 美濃部こころ、松峯昭彦、小埜良一、飯野隆大、林泰秀、北村俊雄、内田淳正、須藤啓広、野阪哲也. Ewing 肉腫における新規腫瘍マーカーの探索: ADAMTS4 発現の診断的意義の解析. 第 26 回日本整形外科学会 基礎学術集会、2011 年 10 月 20 日、前橋.

③ 小埜良一、榎屋正浩、中島秀明、榎本豊、宮田恵里、上迫努、伊藤守、中村彰秀、鈴木圭、片山直之、北村俊雄、野阪哲哉. MLL 融合遺伝子による白血病発症における自己複製能関連転写因子を介した新規分子機構の解析. 第 73 回日本血液学会学術集会、2011 年 10 月 15 日、名古屋.

④ Fukuchi Y, Sadahira K, Kunimoto H, Sakurai M, Masuda A, Kawakita J, Ono R, Kitamura T, Nosaka T, Okamoto S, Nakajima H. Differential role of PU.1 in leukemogenesis by Hoxa9-Meis1 or MLL-fusion oncogene. 第 73 回日本血液学会学術集会、2011 年 10 月 15 日、名古屋.

⑤ Fukuchi Y, Kuroda K, Sadahira K, Ono R, Tenen DG, Kitamura T, Nosaka T, Okamoto S, Nakajima H. Differential role of myeloid transcription factors, C/EBPα and PU.1 in leukemogenesis by MLL-fusion oncogenes. 第 52 回アメリカ血液学会、2010 年 12 月 4 日、米国フロリダ州オーランド.

⑥ Suzuki K, Ono R, Ohishi K, Kataoka I, Masuya M, Hamada H, Kitamura T, Katayama N, Nosaka T. Ikaros isoform 6 enhances proliferative effect by BCR-ABL1 in human CD34+ hematopoietic cells. 第 72 回日本血液学会学術集会、2010 年 9 月 26

日、横浜.

⑦Fukuchi Y, Kuroda K, Sadahira K, Ono R, Ikeda Y, Kitamura T, Nosaka T, Okamaoto S, Nakajima H. Differential role of C/EBP α and PU.1 in leukemogenesis by MLL-fusion oncogenes. 第72回日本血液学会学術集会、2010年9月24日、横浜.

⑧ Ono R, Masuya M, Nakajima H, Enomoto Y, Miyata E, Kamisako T, Ito M, Suzuki K, Katayama N, Kitamura T, Nosaka T. Analysis of novel molecular mechanism in transformation by MLL-ENL targeting long-term hematopoietic stem cells. 第69回日本癌学会学術総会、2010年9月22日、大阪.

⑨小埜良一, 榊屋正浩, 宮田恵里, 中島秀明, 上迫努, 伊藤守, 鈴木圭, 片山直之, 北村俊雄, 野阪哲哉. MLL-ENL 融合遺伝子は造血幹細胞のみを標的として形質転換を生じる. 第71回日本血液学会学術集会、2009年10月24日、京都.

⑩Ono R, Masuya M, Miyata E, Nakajima H, Kamisako T, Ito M, Suzuki K, Katayama N, Kitamura T, Nosaka T. Malignant transformation by MLL-ENL fusion gene arises selectively from long-term hematopoietic stem cells. 第68回日本癌学会学術総会、2009年10月1日、横浜.

[その他]

ホームページ等

<http://www.medic.mie-u.ac.jp/microbiol/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小埜 良一 (ONO RYOICHI)

三重大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：40422414

(2)研究分担者：なし

()

研究者番号：

(3)連携研究者：なし

()

研究者番号：