

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5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790904

研究課題名（和文）miR-126によるB細胞分化促進作用機序の解析

研究課題名（英文）B cell differentiation induced by miR-126

研究代表者 幸谷 愛（KOTANI AI）

東海大学・創造科学技術研究機構・特任准教授

研究者番号：00517477

研究成果の概要（和文）：microRNA（miRNA）は哺乳類では2000年に発見された18-24塩基のsmall non coding RNAである。

miR-126は造血幹細胞では高発現しているが、B細胞の分化が進むにつれて発現が低下する。昨年度までにmiR-126のB細胞分化促進作用をMLL-AF4白血病細胞や正常造血細胞において見出した。興味深いことに、MLL-AF4白血病細胞においては、miR-126はB細胞分化における重要転写因子であるEBF1, E2A, PAX5といった転写因子群の発現を変化させなかった。更には転写因子を欠損している場合においてもmiR-126が部分的にB細胞分化を誘導できることを見出した。miR-126はまだ系列にコミットしていない細胞群に対して転写因子非依存的にB細胞に細胞運命決定する機能を持つことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：MicroRNAs (miRNAs) are small noncoding RNAs vital to many cell functions that act post-transcriptionally to decrease the expression of target mRNAs. In this study we investigated miRNA involvement in cell differentiation in acute leukemia. In ALLs with MLL rearrangement, the expression of miR-126 is downregulated compared to other types of ALLs. When we restored miR-126 expression in a cell line derived from an MLL-AF4 ALL patient (SEM), B cell markers CD20 and CD19 were significantly upregulated, suggesting that miR-126 had induced B cell differentiation in MLL-AF4 ALL. A cDNA array measuring gene expression also showed upregulation of B cell related genes in SEM cells overexpressing miR126. When we overexpressed miR-126 in normal hematopoietic cells in vivo via mouse bone marrow transplantation, we also observed an increase in the number of CD19+ cells in the peripheral blood, revealing that miR-126 induces B cell differentiation both in leukemia and normal hematopoietic cells. The mechanism of B cell differentiation by miR-126 was investigated using the coculture system of mouse fetal liver cells and TSt-4 stromal cells, which showed that miR-126 induces differentiation in uncommitted cells but not in cells committed to a lymphoid or myeloid lineage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：miRNA、細胞運命決定

1. 研究開始当初の背景

microRNA(miRNA)は哺乳類では2000年に発

見された18-24塩基のsmall non coding RNAである。急性前骨髄性白血病におけるレチノイン

酸による分化誘導療法は従来の抗がん剤を用いた“total kill therapy”とは一線を画す画期的な治療法であるが、他の悪性疾患においては有効なものが報告されていない。細胞系列決定は発生において、また成体組織の維持においても重要である。造血系では表面マーカーによって細胞を純化することによって、発生学的ヒエラルキーが最も精力的に研究され、詳細に明らかにされている。細胞の運命決定には現在までのところ転写因子が重要な働きをしているというのが一般的で、各系列への運命決定は、EBP, PAX5, GATA2, C/EBP, PU.1 などによって誘導されると考えられている。しかしながら、転写因子によって引き起こされる転写活性の差だけで造血系全ての系列決定を説明するのは難しく、他のメカニズムが関わっている可能性が考えられる。その一例に B 細胞にコミットした細胞に、骨髄系細胞の分化に必須の転写因子 c/EBP α を異所性に発現させた場合や、逆に B 細胞分化維持に必要な PAX5 をノックアウトした場合、マクロファージへのリプログラミングが起こるが、逆に、骨髄系にコミットした細胞、つまり CMP 以降に分化した骨髄系の細胞に PAX5 や E2A を導入しても、c/EBP α をノックアウトしても B 細胞系列へのリプログラミングはおこらないということがある。microRNA は哺乳類では 2000 年に発見された 18-24 塩基の small non coding RNA である。microRNA はターゲット mRNA の 3' UTR に結合し、その発現を mRNA レベルおよび、蛋白翻訳レベルにおいて抑制する機能を持つ。一つの microRNA は数百のターゲット遺伝子をもつこともあり、その機能的な重要性は microRNA の生成に必須である Dicer や Drosha 遺伝子をノックアウトしたマウスが胎性致死であることより明らかである。また、がんにおいても重要な機能を担っており、申請者は最近 MLL-AF4ALL (acute lymphocytic leukemia) において miR-128b, miR-221 を発現したときには抗がん剤に対する

感受性を高めることを報告した。(Kotani A et al BLOOD 2009) 更に miR-126 を B 細胞と骨髄系細胞両方のマーカーを発現し B-骨髄系前駆細胞が形質転換したと考えられる MLL-AF4 ALL 細胞に導入した場合、CD20, CD19 といった B 細胞分化マーカーの発現が上昇することを見出した。cDNA array の結果では、miR-126 を過剰発現した場合、B 細胞関連遺伝子群の発現が、単球骨髄細胞関連遺伝子群よりも全体として有意に上昇するという結果を得た。興味深いことに、B 細胞分化が進むにつれて発現の上昇する PAX5, EBF1 といった転写因子の発現は、miR-126 を過剰発現しても変化しなかった。

2. 研究の目的

以上の結果より、転写因子以外のメカニズム、PAX5, EBF1 などの B 細胞分化維持に重要な働きを持つ転写因子とは独立な働きを持つ可能性がある miR-126 によって引き起こされる B 細胞分化のメカニズムを詳細検討することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

miR-126 が機能する造血前駆細胞分化段階を特定するために、マウス胎児肝より各分化段階細胞分画を分離精製し、miR-126 が B 細胞系の分化を促す分化段階を、前述の TsT4 細胞との共培養系にて特定する。更にその作用機序を転写因子との相互作用を中心に cDNA array 等を用いて検討し、miR-126 の B 細胞分化促進作用のメカニズムを明らかにする。

C57/B6 CD45.1 胎児肝より、All progenitor cells (lin⁻), lymphoid-primed multipotent progenitor (LMPP) (lin⁻c-kit+Sca-1+CD27⁺), CMP(Lin⁻ Sca-1-CD34+c-kit+IL-7R α -Fc γ Rlow),

GMP((Lin-Sca-1- CD34+c-kit+IL-7 α R-Fc γ R high), CLP(lin-c-kitlow Sca-1low Thy1-IL-7R α +)を採取し、レトロウイルスによって miR-126/GFP を導入した後、GFP 陽性細胞をソートし、TsT4 細胞と共培養する。6 日後に CD19、mac-1 等系列マーカー (lin) を測定し、コントロール細胞との差を比較する。すでに lin-細胞に CD19 細胞が miR-126 導入細胞において、コントロール細胞 より増加することを明らかにしている。よって、lin-を更に分画した上記 4 種類の細胞群に同様の表現形を持つ細胞群が存在するはずである。その細胞群よりソーティングし、ゲノムを抽出し、免疫グロブリン重鎖の VDJ 領域組み換えの有無を変性ゲノミック PCR にて検討し、分子レベルでの B 細胞系列へのコミットの有無を確認する。分子レベルにて B 細胞へのコミットが確認された miR-126 導入細胞がコントロール細胞より B 細胞の産生を増やす血液分化段階が特定されれば、上記結果をより厳格に確認するために、顕微鏡下 1 細胞採取、もしくは限界希釈法による単一細胞培養を行い、B 細胞の出現頻度を測定する。

また、miR-126 が上記を引き起こすメカニズムについて、転写因子との関連性の有無、ターゲット遺伝子同定を目的に、マイクロアレイを用いて網羅的に遺伝子の発現を検討する。

4. 研究成果

miR-126 の B 細胞分化促進作用を MLL-AF4 白血病細胞や正常造血細胞において見出した。興味深いことに、MLL-AF4 白血病細胞においては、miR-126 は B 細胞分化における重要転写因子である EBF1, E2A, PAX5 といった転写因子群の発現を変化させなかった。更には転写因子を欠損している場

合においても miR-126 が部分的に B 細胞分化を誘導できることを見出した。miR-126 まだ系列にコミットしていない細胞群に対して転写因子非依存的に B 細胞に細胞運命決定する機能を持つことが明らかとなった。

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 2 件)

1. Honjo T, Kobayashi M, Begum N, Kotani A, Sabouri S, Nagaoka H. (査読有)
The AID Dilemma: Infection, or Cancer?
Adv Cancer Res. 2012;113:1-44.
2. Toyotaka Kawamata+, Jun Lu+, Tadayuki Sato+, Masafumi Tanaka, Hitoshi Nagaoka, Yasutoshi Agata, Takae Toyoshima, Kazuaki Yokoyama, Naoki Oyaizu, Naoya Nakamura, Kiyoshi Ando, Arinobu Tojo*, and Ai Kotani*.
+equally contributed *corresponding author.,
"Imatinib mesylate directly impairs class switch recombination through downregulation of AID." Blood. 2012 Mar 29;119(13):3123-7. (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

1. Ai Kotani
Imatinib mesylate directly impairs class-switch recombination through downregulation of AID: its potential efficacy as an AID suppressor"
Keystone Symposia's 2012 Meeting on "Mutations, Malignancy and Memory - Antibodies and Immunity"
2012 年 3 月 19 日 Boston (USA)

2. Jen Lu, Ai Kotani

EBV positive secretary miRNAs

Keystone Symposia's 2012 Meeting on "Gene Silencing by Small RNAs" Vancouver (Canada)

2012年2月7日

3. 呂 軍、大庭成喜、幸谷 愛

Evi1 をターゲットとする miRNA の同定

第73回日本血液学会学術集会 (口演)

2011年10月16日 名古屋国際会議場(名古屋)

4. 井上 優希、呂 軍、幸谷 愛

EBV 陽性リンパ腫における分泌性 miRNA

第73回日本血液学会学術集会 (口演)

2011年10月15日 名古屋国際会議場(名古屋)

5. 幸谷 愛、miR-126 の造血細胞における機能解析、第73回日本血液学会学術集会 (口演)

2011年10月14日 名古屋国際会議場(名古屋)

6. 幸谷 愛

造血悪性疾患における miRNA の機能

第70回日本癌学会学術総会 (招待講演) 2011年

10月5日 名古屋国際会議場(名古屋)

7. 幸谷 愛

造血系腫瘍における miRNA

第3回日本 RNAi 研究会(招待講演)

2011年8月26日 広島プリンスホテル(広島)

[図書] (計 1 件)

1. Jun Lu⁺, Bidisha Chanda⁺ and Ai Kotani^{*,+},
*corresponding author +equally contributed. "EBV
encoded miRNAs in EBV related malignancy"
Hematology - Science and Practice 2012.

[その他]

ホームページ等

http://www.u-tokai.ac.jp/tuiist/tt/announcement_koutani.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

幸谷 愛 (KOTANI AI)

東海大学・創造科学技術研究機構・准教授

研究者番号：00517477