

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：11401
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2011～2013
課題番号：23591365
研究課題名(和文) 骨髄性白血病におけるmiRNA発現異常

研究課題名(英文) Detection for miRNA dysregulation in CML

研究代表者

高橋 直人 (Takahashi, Naoto)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80344753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：B6マウスから幹細胞を採取しBcr-abl遺伝子を導入後、腫瘍発生組織(脾臓)から、幹細胞をとりだし、RNAを採取、その後網羅的miRNA遺伝子解析を行った。Bcr-abl陽性のマウス白血病幹細胞では、正常対応細胞と比較し、いくつかのmiRNAが過剰発現または、発現低下をしており、現在CMLにおけるmiR-200cの標的蛋白の同定の為の実験を行っており、そのひとつとしてBmi-1を同定した。In vivoの実験ではbortezomibがmiR-200cの再活性化を通じてCMLのがん幹細胞をアポトーシス誘導することを示しつつある。

研究成果の概要(英文)：To detect specific miRNA in cancer stem cell of chronic myelogenous leukemia (CML), we established CML mice (B6) which can develop CML. We got cancer stem cells from B6 mice and examined miRNA expression from KLS population. We found that several miRNA were up-or down regulated in these mice. For instance, down regulation of miR-203, miR-200c, miR-26, miR-21, miR-2105, and miR-181. In this time we are examining targets of these miRNAs. We identified Bmi-1 is possible target of miR-200c in CML stem cells. And we further demonstrated that bortezomib was effective for diminishing CML stem cells by targeting both Bmi-1 and miR-200c.

研究分野：血液内科学

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：CML miRNA miR-200c Bmi-1

研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

近年、microRNA(以下 miRNA)と呼ばれる non coding RNA が、蛋白の翻訳を阻害し、細胞の分化、増殖に重要な働きをもつことが報告されている。一方、がん幹細胞はがん細胞の供給源となる細胞として注目を集めている。このがん幹細胞は抗がん剤治療に対して抵抗性を示し、治療後の再発を引き起こす原因になると考えられている。最近、乳がんや前立腺がん、その他の固形癌で、miRNA ががん幹細胞で異常発現し重要な働きをしているという報告が次々となされている (Shimono et al., Cell 2008; O'Connell et al., PNAS 2010; Leu et al., 2010 Nat.Med)。しかし、がん幹細胞の治療抵抗性メカニズムにおける miRNA の役割は解明されていない。

慢性骨髄性白血病(CML)は幹細胞レベルで、BCR-ABL1 転座が生じることが明らかになっている。CML 患者の治療には BCR-ABL1 遺伝子産物のチロシンキナーゼ活性を標的とするグリベック、スプリセルなどのチロシンキナーゼ阻害薬が広く用いられている。しかし、このようなチロシンキナーゼ阻害薬による治療後の再発は患者の生命を脅かす重大な問題となっている。CML 幹細胞の残存は、このような CML の再発を引き起こす原因になることが報告されている。さらに、チロシンキナーゼ阻害薬に不応性の T315I 変異を有する BCR-ABL1 の発現は CML 患者に治療を行う上で非常に大きな障壁となっている。CML 幹細胞は、この T315I 変異を

有する CML 細胞を産み出す発症母細胞となる可能性が考えられる。従って、CML 幹細胞の薬剤に対する抵抗性メカニズムを解明することは重要な研究課題であり、現在、国内外の研究者によって活発に研究がおこなわれている。

申請者はこれまでに、miRNA の研究で世界をリードする優れた研究成果あげてきた。この miRNA 領域での研究基盤に立脚し、白血病でも幹細胞レベルで miRNA の異常が生じている可能性が高いと着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、BCR-ABL 陽性白血病のマウス発症モデルを用いて、がん幹細胞分画を純化し、網羅的 miRNA 発現解析を行って「**白血病がん幹細胞で異常発現する miRNA**」を同定する。同定された場合はその機能解析を行い、miRNA ががん幹細胞に及ぼす病理・病態を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) **マウス CML 幹細胞における miRNA の発現解析** (遺伝子組み換え、動物実験有)
C57BL/6 マウス(以下 B6 マウス)の造血幹細胞分画(cKit 陽性 Sca1 陽性分化マーカー陰性細胞 以下 KSL)に BCR-ABL1 キメラ遺伝子を導入し、同感染細胞を B6 マウスに移植する。BCR-ABL 陽性白血病発症マウスから CML 幹細胞 (KSL 分画) 前駆細胞様 CML 細胞(cKit 陽性 Sca1 陰性分化マーカー陰性細胞)、並びに分化 CML 細胞をセルソーターで抽出し、RNA を精製し、

miRNA(non-coding) や通常遺伝子(coding)の網羅的発現解析を行い、がん幹細胞特異的に発現する miRNA や遺伝子を同定する。

(2) ヒト CML 患者由来の CML 幹細胞における miRNA の発現解析

ヒト患者検体の幹細胞 CD34+CD38-分化マーカー陰性細胞をセルソーターで採取し、マウスで同定された miRNA の定量解析 (Taqman PCR) を行う。マウス、ヒトで共通に異常発現する miRNA を同定し、その後、同 miRNA の標的遺伝子の探索、機能解析へと研究を発展させる。

(3) CML 幹細胞特異的発現 miRNA の標的遺伝子の解析

遺伝子発現解析と miRNA 発現解析で、連動して動く miRNA と遺伝子の関係を明らかにする。また、Target Scan などの program を使用し、miRNA の target を絞り込む。標的遺伝子候補は、Taqman 法によるバリデーションを行い、CML 細胞株などに、候補遺伝子を導入した transfectant を用いて標的蛋白の発現の変化を検討する。

(4) CML 幹細胞特異的 miRNA を標的とする CML 治療方法の検討

BCR-ABL1 遺伝子に T315I 突然変異のある CML マウスモデルを作製し、同様に遺伝子発現解析を行う。通常の CML 発症マウスと miRNA の発現差が幹細胞レベル、あるいは他の lineage であるか否かを検討したい。

(5) マウス CML 幹細胞の治療抵抗性機構における miRNA の役割

CML 幹細胞に特異的な miRNA のアンチセンス RNA の発現ベクターを CML 幹細胞に導入し、マウスに移植を行う。このマウスにチロシンキナーゼ阻害薬を投与して、

CML 幹細胞の治療抵抗性における miRNA の役割を解明する。

(6) miRNA をターゲットとするマウス CML 幹細胞の治療効果の検証

同定された miRNA のアンチセンスを CML 発症マウスに経静脈的に投与することにより、腫瘍に抑制効果が生じるか等を検討する。

4 . 研究成果

B6 マウスから幹細胞を採取し Bcr-abl 遺伝子を導入後、腫瘍発生組織(脾臓)から、幹細胞をとりだし、RNA を採取、その後網羅的 miRNA 遺伝子解析を行った。

Bcr-abl 陽性のマウス白血病幹細胞では、正常対応細胞と比較し、いくつかの miRNA が過剰発現または、発現低下をしており、それらは miR-203, miR-200c, miR-26, miR-21, miR-2105, miR-181 などであり、そのうちのいくつかは、KLS 陽性細胞と陰性細胞の分画で比較しても発現差をみた。例えば miR-200c がそうであるが、現在 CML における miR-200c の標的蛋白の同定の為の実験を行っており、そのひとつとして BMI-1 を同定した。Bmi-1 は polycomb 蛋白であり、がん幹細胞での重要な役割が多くのがんで証明されている。In vivo, In vitro の実験では bortezomib が miR-200c の再活性化を通じて CML のがん幹細胞をアポトーシス誘導することを示しつつあり、現在論文準備中である。

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9件)

01. Nara M, Teshima K, Watanabe A, Ito M, Iwamoto K, Kitabayashi A, Kume M, Hatano Y, Takahashi N, Iida S, Sawada K, Tagawa H. Bortezomib reduces the tumorigenicity of multiple myeloma via downregulation of upregulated targets in clonogenic side population cells. *PLoS One*. 2013;8(3):e56954.
02. Ubukawa K, Guo YM, Takahashi M, Hirokawa M, Michishita Y, Nara M, Tagawa H, Takahashi N, Komatsuda A, Nunomura W, Takakuwa Y, Sawada K. Enucleation of human erythroblasts involves non-muscle myosin IIB. *Blood*. 2012; 119:1036-44.
03. Liu J, Guo YM, Hirokawa M, Iwamoto K, Ubukawa K, Michishita Y, Fujishima N, Tagawa H, Takahashi N, Xiao W, Yamashita J, Ohteki T, Sawada K. A synthetic double-stranded RNA, poly I:C, induces a rapid apoptosis of human CD34(+) cells. *Exp Hematol*. 2012; 40:330-41.
04. Shida S, Takahashi N, Fujishima N, Kameoka Y, Nara M, Fujishima M, Saitoh H, Tagawa H, Hirokawa M, Ichinohasama R, Sawada K. False-positive human immunodeficiency virus antibody test and autoimmune hemolytic anemia in a patient with angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Intern Med*. 2011;50(20):2383-7.
05. Michishita Y, Hirokawa M, Guo YM, Abe Y, Liu J, Ubukawa K, Fujishima N, Fujishima M, Yoshioka T, Kameoka Y, Saito H, Tagawa H, Takahashi N, Sawada K. Age-associated alteration of $\gamma\delta$ T-cell repertoire and different profiles of activation-induced death of V δ 1 and V δ 2 T cells. *Int J Hematol*. 2011; 94:230-40.
06. Watanabe A, Tagawa H, Yamashita J, Teshima K, Nara M, Iwamoto K, Kume M, Kameoka Y, Takahashi N, Nakagawa T, Shimizu N, Sawada K. The role of microRNA-150 as a tumor suppressor in malignant lymphoma. *Leukemia* 2011;25:1324-34.
07. Takahashi N, Yoshioka T, Kameoka Y, Tagawa H, Fujishima N, Saitoh H, Hirokawa M, Enomoto K, Sawada K. Fatal hemorrhagic pneumonia caused by *Stenotrophomonas maltophilia* in a patient with non-Hodgkin lymphoma. *J Infect Chemother*. 2011;17:858-62
08. Miura M, Takahashi N, Kanno S, Kato S, Nara M, Itoh M, Saitoh H, Yoshioka T, Kameoka Y, Fujishima N, Tagawa H, Hirokawa M, Sawada K. Drug interaction of (S)-warfarin, and not (R)-warfarin, with itraconazole in a hematopoietic stem cell transplant recipient. *Clin Chim Acta*. 2011; 9;412:2002-6.
09. Ito M, Takahashi N, Saitoh H, Shida S, Nagao T, Kume M, Kameoka Y, Tagawa H, Fujishima N, Hirokawa M, Tazawa H, Minato T, Yamada S, Sawada K. Successful treatment of necrotizing fasciitis in an upper extremity caused by *Clostridium perfringens* after bone marrow transplantation. *Intern Med*. 2011;50:2213-7.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 直人 (TAKAHASHI Naoto)

秋田大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号 80344753

(2) 研究分担者

田川 博之 (TAGAWA Hiroyuki)

秋田大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号 30373492