

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 7日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790622

研究課題名（和文）細胞死を制御する microRNA の同定とそのがん化における役割

 研究課題名（英文） Identification of microRNAs regulating apoptosis
and elucidation of their roles in tumorigenesis

研究代表者

辰巳 直也 (TATSUMI NAOYA)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：60512960

研究成果の概要（和文）：

WT1 遺伝子は白血病をはじめ種々の固形癌において過剰発現し、抗アポトーシス機能など癌遺伝子様機能を果たすことによりがん化に深く関与する。本研究では、WT1 遺伝子を直接の標的としその発現を抑制する microRNA として microRNA-A(miR-A)を同定した。miR-A 欠損マウスは、末梢血、脾臓、骨髄において成熟骨髄系細胞の増加を特徴とする骨髄増殖性疾患(MPD)を発症した。miR-A 欠損 MPD 発症マウスの骨髄では、造血幹前駆細胞(LSK 細胞；Lineage-Sca-1+c-Kit+) の増加、LSK 細胞における WT1 の発現上昇が認められた。さらに LSK 細胞における WT1 の発現抑制は骨髄系細胞の増殖を抑制した。以上より、miR-A は骨髄造血幹前駆細胞において WT1 の発現を調節し、その調節機構の破綻は骨髄増殖性疾患発症に繋がることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The Wilms' tumor gene WT1 is overexpressed and plays an oncogenic role in the majority of human leukemia and various types of solid tumors. Therefore, it is important to identify the molecular mechanism by which WT1 is overexpressed to understand their roles in tumorigenesis. In the present study, we identified microRNA-A (miR-A) as a miRNA that repressed WT1 expression by its binding to the WT1-3'UTR. miR-A-deficient mice exhibited high expression of WT1 in hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) and developed myeloproliferative disorders (MPDs) characterized by expansion of myeloid cells in the BM, spleen and peripheral blood. Furthermore, silencing of WT1 expression in HSPCs of MPD miR-A-deficient mice by short hairpin RNA inhibited myeloid proliferation and differentiation in vitro. These results indicate that loss or decreased expression of miR-A plays an important role in the development of MPD through dysregulated overexpression of WT1 in HSPCs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：microRNA、WT1 遺伝子、骨髄増殖性疾患

1. 研究開始当初の背景

われわれはこれまでに、ウィルムス腫瘍遺伝子 WT1 が白血病をはじめ種々の固形癌で高頻度に過剰発現し、抗アポトーシス機能など癌遺伝子様機能を果たすことにより癌化に深く関与することを明らかにしてきた。しかし白血病細胞や癌細胞において WT1 が高発現する原因は未だ不明であり、WT1 の発現調節機構の解明はがんの発症や進展の機序を理解するうえで重要である。

近年、遺伝子の発現調節機構として、microRNAs (miRNAs) による転写後段階での調節機構が注目されている。miRNA は 21-25-nt の長さのタンパクをコードしない内在性低分子 RNA であり、標的 mRNA の 3' UTR におもに結合し、標的 mRNA の分解を促進あるいは翻訳を阻害することによりその発現を抑制する。多くの研究成果から、miRNA は異なる種間において高度に保存されており、細胞増殖、アポトーシス、分化など様々な細胞内イベントにおいて極めて重要な機能を果たすこと、造血を含むほとんどすべての組織の発達に不可欠であることが明らかになってきた。また miRNA の発現異常が様々な固形癌や造血器悪性腫瘍の発症や進展に深く関与することが報告されている。

最近われわれは、WT1 遺伝子を直接標的とし、その発現を抑制することにより癌細胞に対して細胞死を誘導する microRNA を 3 種同定した。同定した 3 種の miRNA のうち、miR-A (仮称) が最も効率よく WT1 の発現を抑制し、それに相関して最も強くアポトーシスを誘導できることを示した。このように、アポトーシス実行過程において miR-A が WT1 のおもな発現抑制因子として働いていることを証明し、miR-A による WT1 発現調節機構の生体内における役割を明らかにするため、miR-A 欠損マウスを作成した。

2. 研究の目的

作成した miR-A 欠損マウス表現型を解析し、miR-A による WT1 発現調節機構が制御する生命現象を明らかにすること、および miR-A による WT1 調節機構の破綻ががん化において果たす役割を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

miR-A 欠損マウスの血液学的解析および病理学的解析により野生型マウスに比較して異常を呈する血球分画・器官を明らかにし、miR-A による標的遺伝子 WT1 の制御が不可欠な生命現象を明らかにする。

4. 研究成果

① miR-A 欠損マウスは骨髄増殖性疾患 (MPD) を発症する

miR-A の造血における役割を明らかにするため、miR-A(+/+), miR-A(+/-), および miR-A(-/-)マウスの末梢血を 12 ヶ月齢まで定期的にモニタリングした。血算検査およびメイギムザ染色による形態観察により、miR-A(+/-)マウスの 84.2% (19 匹中 16 匹)、miR-A(-/-)マウスの 18.8% (16 匹中 3 匹)が、約 3 ヶ月齢を過ぎたあたりから末梢血において芽球増加を伴わない成熟型顆粒球の増加を示すことが明らかになった (図 1A)。FACS 解析により、増加した顆粒球は Gr-1+/Mac-1+ 成熟好中球であることを確認した (図 1A)。これらのマウスは脾腫を呈しており (図 1B)、HE 染色により、顆粒球増加による赤脾髄の拡張と白脾髄の萎縮が観察された (Fig. 1B)。脾細胞および骨髄細胞の FACS 解析により、Mac-1+ 骨髄系細胞の割合の増加、B220+B 細胞の割合の減少を確認した。これらの結果から、miR-A 欠損マウスは成熟骨髄系細胞の増加を特徴とする骨髄増殖性疾患 (MPD) を発症することが明らかになった。

図 1 A

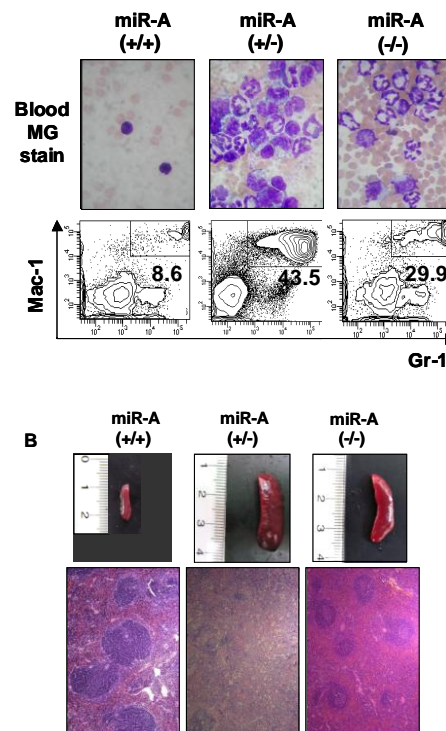


図 1 miR-A 欠損マウスは MPD を発症する

(A) (上段)末梢血メイギムザ染色像 (下段)末梢血 FACS 解析の結果. (B) (上段)摘出した脾臓マクロ像 (下段)脾臓の HE 染色像

② MPD を発症した miR-A 欠損マウスの骨髄では造血幹前駆細胞が増加している

MPD を発症した miR-A 欠損マウスの骨髄における骨髓系細胞をより詳細に解析した結果、Gr-1+/Mac-1+成熟好中球、そのプロジェニター分画である GMP (granulocytes-macrophage progenitor) および造血幹前駆細胞分画 (LSK 細胞分画; Lineage-Sca-1+c-Kit+) の割合 (図 2A) および絶対数 (図 2B) が増加していることが明らかになった。また分化は障害されていないことも確認された。これらの結果は、miR-A 欠損マウスに発症した MPD は、造血幹前駆細胞の異常増殖に起因していることを示している。

図 2

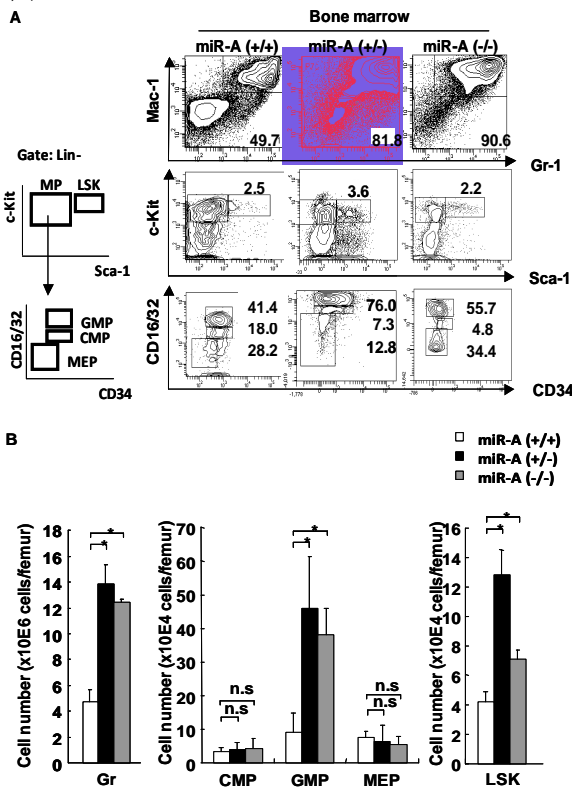


図 2 miR-A 欠損 MPD マウスにおける LSK, GMP 分画、成熟顆粒球の増加

(A) 骨髄における骨髓系細胞の各分画の割合を FACS 解析した。成熟顆粒球 (Gr) (Gr-1+/Mac-1+), LSK 細胞 (Lin-Scal+cKit+), 骨髓系前駆細胞 (MP) 分画のうちの CMP (Lin-Scal-c-Kit+CD34+CD16/32low), GMP (Lin-Scal-c-Kit+CD34+CD16/32high), MEP (Lin-Scal-c-Kit+CD34-CD16/32-) 分画の割合を示す。(B) miR-A (+/+), miR-A (+/-), miR-A (-/-) マウスそれぞれの大腿骨一本から採取した骨髄細胞数と FACS 解析の結果から算出した各分画の細胞絶対数を示す。*: p<0.05, n.s: not significant.

③ 造血幹細胞分画における miR-A の発現低下は WT1 の過剰発現を引き起こす

miR-A の骨髄細胞各分画における発現を real-time PCR 法により解析したところ、miR-A は造血幹前駆細胞 (LSK 細胞) に高発現する miRNA であることがわかった。このことから miR-A はおもに LSK 細胞において機能を担っていると考えられ、miR-A 欠損マウスの LSK 細胞における WT1 の発現を解析した。その結果、miR-A (+/+) マウスに比べ、miR-A (+/-) マウス LSK では 15.0 倍、miR-A (-/-) マウス LSK では 1.54 倍の上昇を示した。これらの結果は、LSK 細胞において miR-A は WT1 を調節していることを示している。

④ miR-A は骨髄幹前駆細胞分画において WT1 の発現調節を介して骨髓系細胞の産生を制御している

MPD 発症マウスの LSK 細胞における WT1 遺伝子の高発現が、骨髓系細胞の異常増殖の原因であるかを検証するため、明らかな WT1 発現上昇を認めた miR-A (+/-) 欠損 MPD マウス LSK 細胞における WT1 発現を WT1-shRNA (sh-WT1) により抑制し、メチルセルロース培地に蒔いて骨髓系細胞コロニー形成能を評価した。ShRNA による WT1 発現抑制は、骨髓系コロニーの形成能を阻害することが示された。

⑤ miR-X は miR-A 欠損に対する代償性 miRNA として機能する

miR-A 欠損マウス解析から、miR-A (-/-) ホモ欠損マウスは、miR-A (+/-) ヘテロ欠損マウスと比較し、MPD 発症率、LSK 細胞の増加および LSK 細胞における WT1 発現上昇の割合など、表現型が弱い傾向にあることがわかった。これらの結果は、MPD を発症しなかった miR-A (-/-) ホモ欠損マウスの LSK 細胞では、miR-A 欠損に対する代償性シグナルが機能している可能性を示している。そこで miR-A (-/-) LSK 細胞において機能している代償性シグナルを担う分子がその他の miRNA であると仮定し、miR-A の欠損 LSK 細胞における miRNA の発現を miRNA array により網羅的に解析した。その結果、array に含まれる 754 種の miRNA のうち、miR-X のみが MPD 非発症 miR-A (-/-) マウスの LSK 細胞に顕著に高発現していることが明らかになった。まず、miR-X が miR-A と同様に WT1 の発現を抑制することを確認した。次に、miR-X 発現上昇を認めた MPD 非発症 miR-A (-/-) マウス LSK 細胞における miR-X 発現を miR-X インヒビターにより機能阻害し、メチルセルロース培地に蒔いて骨髓系細胞コロニー形成能を評価した。miR-X インヒビターによる miR-X 機能阻害は、骨髓系コロニーの形成能を促進することが示された。これらの結果から、miR-A (-/-) LSK 細胞に代償性に発現誘導された miR-X は、miR-A 欠損の

結果引き起こされる WT1 発現上昇、骨髄系細胞の増加を軽減させ、MPD 発症を抑制している可能性が示された。miR-A 欠損マウス解析をとおり、マウス骨髄造血幹細胞では miR-A および miR-X の 2 種の miRNA による WT1 発現調節機構が機能していることが明らかになってきた。これら miRNA による WT1 発現調節機構がヒト造血器悪性腫瘍にも関連があるか今後さらに検証していく必要がある。

(結論)

miR-A は骨髄造血幹前駆細胞において WT1 の発現を調節することにより骨髄系細胞の産生を制御しており、その制御機構の破綻は骨髄増殖性疾患発症につながることを明らかにした。

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 3 件)

全て査読あり

1. Lin Y, Fujiki F, Katsuhara A, Oka Y, Tsuboi A, Aoyama N, Tanii S, Nakajima H, Tatsumi N, Morimoto S, Tamanaka T, Tachino S, Hosen N, Nishida S, Oji Y, Kumanogoh A and Haruo Sugiyama. HLA-DPB1*05:01-restricted WT1332-specific TCR-transduced CD4+ T lymphocytes display a helper activity for WT1-specific CTL induction and a cytotoxicity against leukemia cells. *Journal of Immunotherapy*, 36: 159-70, 2013. doi: 10.1097/CJI.0b013e3182873581.

2. Hosen N, Matsuoka Y, Kishida S, Nakata J, Mizutani Y, Hasegawa K, Mugitani A, Ichihara H, Aoyama Y, Nishida S, Tsuboi A, Fujiki F, Tatsumi N, Nakajima H, Hino M, Kimura T, Yata K, Abe M, Oka Y, Oji Y, Kumanogoh A, Sugiyama H. CD138-negative clonogenic cells are plasma cells but not B cells in some multiple myeloma patients. *Leukemia*, 26:2135-41, 2012. doi: 10.1038/leu.2012.80.

3. Nakajima H, Oka Y, Tsuboi A, Tatsumi N, Yamamoto Y, Fujiki F, Li Z, Murao A, Morimoto S, Hosen N, Shirakata T, Nishida S, Kawase I, Isaka Y, Oji Y, Sugiyama H. Enhanced tumor immunity of WT1 peptide vaccination by interferon- β administration. *Vaccine*, 30: 722-9, 2012. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.11.074.

[学会発表] (計 8 件)

1. Yuhung Lin, Fumihiko Fujiki, Akiko Katsuhara, Yoshihiro Oka, Akihiro Tsuboi, Nao Aoyama, Satoe Tanii, Hiroko Nakajima, Naoya Tatsumi, Soyoko Morimoto, Taichi Tamanaka, Sho Tachino, Naoki Hosen, Sumiyuki Nishida, Yusuke Oji, Atsushi Kumanogoh and Haruo Sugiyama. HLA class II-restricted WT1 332-specific TCR-transduced CD4+ T lymphocytes display a helper activity for WT1-specific CTL induction and cytotoxicity against leukemia cells 第 6 回国際 WT1 会議 2012 年 11 月 23 日 京都

2. Naoki Hosen, Tetsuo Maeda, Kentaro Fukushima, Soyoko Morimoto, Jun Nakata, Yoshiki Nakae, Satoshi Takashima, Hiroko Nakajima, Fumihiko Fujiki, Naoya Tatsumi, Sumiyuki Nishida, Akihiro Tsuboi, Tadakazu Kondo, Masayuki Hino, Yusuke Oji, Yoshihiro Oka, Atsushi Kumanogoh, Yuzuru Kanakura and Haruo Sugiyama. Wilms tumor 1 (WT1) peptide vaccine as an enhancer of graft versus leukemia effects 第 6 回国際 WT1 会議 2012 年 11 月 23 日 京都

3. Yusuke Oji, Zwi N. Berneman, Ulrich Keilholz, Richard O'Reilly, Giuseppe Saglio, Nicole Wargner, Yuji Heike, Eva Lundin, Eiichi Morii, Patrick Pauwels, Mauro Pappotti, Sebastien Aanguille, Daniela Cilloni, Anne Letsch, Hiroshi Ohashi, Yuko Ohno, Wim Waelput, Eleonora Duregon, Nobuyoshi Hiraoka, Keiko Udaka, Shuichi Izumoto, Satoshi Ohno, Mitsuya Iwafuchi, Mari Fukuda, Naoya Tatsumi, Megumi Kaji, Mai Utada, Yoshihiro Oka and Haruo Sugiyama. International harmonization on immunohistochemical evaluation of WT1 positivity in solid cancer 第 6 回国際 WT1 会議 2012 年 11 月 22 日 京都

4. 尾路祐介、福田茉莉、森井英一、辰巳直也、北條望、村上由依、斉藤千紗恵、鈴木望友、川田紗世、澄川美穂子、坪井昭博、岡芳弘、杉山治夫 固形癌における WT1 発現の免疫組織化学法による評価 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 21 日 札幌

5. 尾路祐介、岡芳弘、坪井昭博、保仙直毅、西田純幸、中田潤、中江吉希、中島博子、藤木文博、辰巳直也、杉山治夫 慢性期 CML に対するイマチニブ併用 WT1 ペプチドワクチン免疫療法 第 4 回造血器腫瘍免疫療法研究会

学術集会 2012年8月18日 金沢

6. 中島博子、岡芳弘、坪井昭博、藤木文博、辰巳直也、尾路祐介、杉山治夫 WT1 ヘルパーペプチド投与による抗腫瘍免疫反応の増強—マウスモデルを用いた検討— 第4回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会 2012年8月18日 金沢

7. 中島博子、岡芳弘、坪井昭博、辰巳直也、藤木文博、森本創世子、保仙直毅、白方俊章、西田純幸、尾路祐介、杉山治夫 IFN- β 併用投与による WT1 ペプチドワクチンの腫瘍拒絶効果の増強 第70回日本癌学会学術総会 2011年10月4日 名古屋

8. 中島博子、岡芳弘、坪井昭博、辰巳直也、藤木文博、保仙直毅、西田順幸、尾路祐介、杉山治夫 IFN- β 併用投与による WT1 ペプチドワクチンの造血器腫瘍に対する拒絶効果の増強 第3回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会 2011年8月20日 大分

[その他]

ホームページ等

大阪大学大学院医学系研究科 機能診断科学講座 免疫造血制御学研究室

<http://sahswww.med.osaka-u.ac.jp/~hmtonc/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辰巳 直也 (TATSUMI NAOYA)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：60512960