

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460685

研究課題名(和文) microRNAによるWT1発現調節機構のがん化における役割

研究課題名(英文) A role of microRNA-mediated regulatory mechanism of WT1 in oncogenesis

研究代表者

辰巳 直也 (TATSUMI, NAOYA)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座助教

研究者番号：60512960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：種々の悪性腫瘍で高発現しがん遺伝子様機能を果たすWT1遺伝子を標的とするmiR-125aの欠損マウスは骨髄増殖性疾患を発症する一方で、ホモ欠損マウスにおける発症率および表現型がヘテロ欠損マウスに比較して弱いことを明らかにした。その原因となる機序として、ホモ欠損マウスでは別のmicroRNAであるmiR-486の発現が誘導され、miR-125aの欠損を代償し表現型を抑制している可能性を示した。さらに、miR-125aはがん遺伝子Zbtb7aをも標的とし、がん抑制miRNAとして機能していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we showed that knockout mice for miR-125a, which directly targets and suppresses the expression of WT1 gene, developed myeloproliferative disorder (MPD) characterized by expansion of myeloid cells. Furthermore, the incidence and severity of MPD were lower in miR-125a (-/-) mice than in miR-125a (+/-) mice, indicating the operation of compensatory mechanisms for the complete loss of miR-125a. MiR-486 was occasionally induced in complete loss of miR-125a and, resulting in the cancellation of MPD occurrence. Moreover, we showed that Zbtb7a was a direct target for miR-125a and that miR-125a played an important role in oncogenesis through the regulation of two oncogenes, WT1 and Zbtb7a.

研究分野：医歯薬学 境界医学・病態検査学

キーワード：microRNA WT1遺伝子 白血病 Zbtb7a遺伝子 肺癌

1. 研究開始当初の背景

われわれはこれまでに、白血病および種々の固形癌において高発現し、がん遺伝子様機能を果たす WT1 遺伝子を直接標的とし、その発現を抑制する microRNA として miR-125a を同定している。miR-125a 欠損マウスはヘテロ欠損、ホモ欠損マウスともに成熟骨髄系細胞の異常増殖を特徴とする骨髄増殖性疾患(MPD)を発症することを示してきた。さらに、miR-125a (-/-) ホモ欠損マウスにおける MPD の発症率は miR-125a (+/-)ヘテロ欠損マウスよりも低く、発症した場合にもその表現型が miR-125a (+/-)ヘテロ欠損マウスよりも弱いことを明らかにしてきた。これらの結果は、miR-125a (-/-) ホモ欠損マウスには miR-125a 欠損に対する代償性機構が存在し、MPD 発症を抑制している可能性を示唆する。この代償性機構の解明は、WT1 遺伝子の発現調節機構および MPD の発症機序のさらなる解明につながる重要な課題と考えられる。

miRNA は複数の機能的に関連した遺伝子を同時に標的とすることにより、その機能を効果的に発揮することが知られている。しかし、これまでに miR-125a の標的遺伝子としていくつかのがん抑制遺伝子が同定されているものの、がん遺伝子様機能を果たす遺伝子はわれわれが明らかにした WT1 遺伝子の他にはあまり知られていない。miR-125a の標的遺伝子の同定は、miR-125a がどのような分子機序によりがん抑制機能を果たしているかを理解するのに重要である。

2. 研究の目的

(1) miR-125a(-/-)ホモ欠損マウスにおける代償性機構の解明

これまでに WT1 遺伝子を標的とする miR-125a の欠損マウスは骨髄増殖性疾患を発症する一方で、ホモ欠損マウスにおける表現型がヘテロ欠損マウスに比較して弱いことが明らかになっている。このことは、miR-125a (-/-) マウスには代償性機構が働いていることを示唆し、その分子機序を明らかにする。

(2) miR-125a 新規標的遺伝子の同定

miR-125a の標的遺伝子、特にがん細胞の悪性化に関わる機能を有する標的遺伝子を同定し、miR-125a が果たしているがん抑制機能の分子機序を理解する。

3. 研究の方法

(1) miR-125a(-/-)ホモ欠損マウスにおける代償性機構

miR-125a(-/-)ホモ欠損マウスにおける代償性機構の分子機序を明らかにするため、miR-125a(-/-)マウスに特異的に発現異常を示す miRNA が他に存在するかを miRNA Array を用いて網羅的に解析した。

(2) miR-125a 新規標的遺伝子の同定

miR-125a が果たしているがん抑制機能の分子機序を理解するため、miR-125a 新規標的

遺伝子の同定とその機能解析を行った。miR-125a 欠損マウスの造血幹細胞における遺伝子発現プロファイル解析および miRNA 標的予測データベース解析を組み合わせ、miR-125a 新規標的遺伝子の同定をおこなった。機能解析に関しては、特に、我が国の統計では癌死亡の上位を占める疾患である肺癌において検証した。

4. 研究成果

(1)miR-125a(-/-)ホモ欠損マウスにおける代償性機構

われわれはこれまでに、WT1 を標的とする miR-125a の欠損マウスはヘテロ欠損、ホモ欠損マウスともに骨髄増殖性疾患(MPD)および水腎症を発症することを示している。さらに、miR125a (-/-) ホモ欠損マウスにおける発症率および表現型が miR-125a (+/-) ヘテロ欠損マウスに比較して弱いことを明らかにしてきた(表 1)。これらの結果は、miR-125a (-/-) マウスにおいて代償性機構が働いていることを示唆する。そこで、代償性機構を miR-125a 以外の他の miRNA が担っている可能性を検証した。miR-125a(+/+)マウス(n=3)、miR-125a (+/-) MPD マウス(n=3)、miR-125a (-/-) MPD マウス(n=2)、miR-125a (-/-) non-MPD マウス(n=3)の造血幹前駆細胞(Lin-Sca1+c-Kit+, LSK細胞)をFACS sortし、TaqMan MicroRNA Array Cardsを用いてmiRNAの発現レベルを網羅的に解析した。その結果、単一のmiRNA, miR-486のみがmiR-125a(-/-)MPD および miR-125a(-/-) non-MPD マウスの LSK において発現上昇し、それぞれ miR-125a(+/+)マウスに比較して 11.4 倍および 412.0 倍の発現上昇を示した。また miR-486 は miR-125a(+/-)MPD マウスの LSK 細胞においては検出されなかった(図 1A)。さらに、miR-486 は WT1 タンパクの発現を抑制しうることを確認した(図 1B)。次に、miR-125a 欠損による骨髄系細胞産生能亢進が、miR-486 の発現により抑制されるかを検証した。miR-125a(-/-)non-MPD マウスの LSK 細胞において高発現している miR-486 を antagomir-486 により機能阻害し、骨髄系コロニー形成能を評価した(図 1C)。miR-486 の阻害は CFU-GEMM, CFU-GM, CFU-M の数を増加させ、BFU-E の数を減少させた。これらの結果により、miR-486 が miR-125a の欠損に対する代償機構として発現が誘導され、miR-125a に代わって WT1 の発現を低下させ、MPD の発症を抑制している可能性を示した。

表 1 Phenotypes of miR-125a knockout mice

Phenotypes	Genotypes		
	125a (+/+)	125a (+/-)	125a (-/-)
Normal	12	3	11
MPD	0	16	3
Hydronephrosis	0	5	3
Total number of mice examined	12	19	16

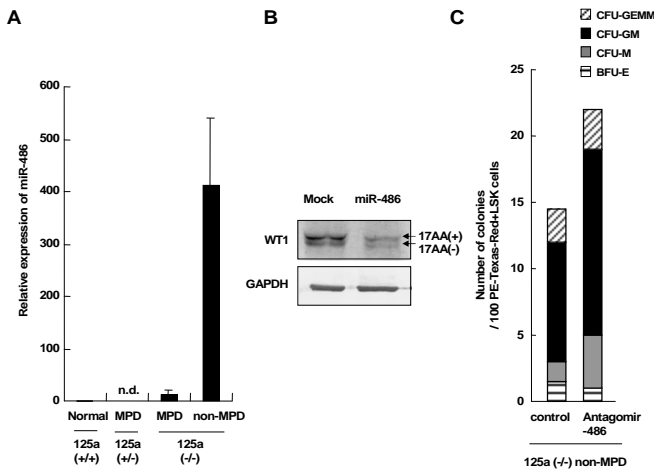


図 1. miR-486 は miR-125a(-/-)マウスにおいて miR-125a 欠損に対する代償性分子として機能する (A)miR-125a(-/-)non-MPD マウスの LSK における miR-486 の発現レベル。miR-125a(+/+)マウス(n=3), (+/-)MPD マウス(n=3), (-/-)MPD マウス(n=3), (-/-)non-MPD マウス(n=3)の LSK を FACS ソーティングにより分離し、RNA を抽出し、TaqMan MicroRNA Array Card により miR-486 発現レベルを測定した。miR-125a(+/+)マウスの LSK における miR-486 発現レベルを 1.0 として示した。(B)miR-486 発現ベクターを Kasumi-1 AML 細胞に導入し、ウェスタンブロットにより WT1 タンパクレベルを解析した。その代表例を示す。(C)miR-125a(-/-)non-MPD マウスの LSK 細胞を FACS ソーティングにより分離し、antagomir-486 またはコントロールベクターを導入し、M3434 メチルセルロース培地で 9 日間培養し、コロニー数をカウントした。

(2) miR-125a の新規標的遺伝子の同定 miR-125a 標的遺伝子候補の同定

miR-125a が果たすがん抑制機能の分子機序を明らかにするため、miR-125a 標的遺伝子候補のスクリーニングを行った。まず miR-125a の機能的な下流遺伝子を同定するため、miR-125a(+/+) 野生型マウス、MPD を発症した miR-125a(+/-)マウス、および MPD を発症した miR-125a(-/-)マウスの造血幹細胞(HSC, Lin-Sca-1+c-Kit+Flt3-)における遺伝子発現プロファイル解析を CodeLink™ Whole Genome DNA array を用いた。35,587 遺伝子について解析した結果、miR-125a 欠損 HSC では野生型 HSC に比較して、332 遺伝子が 2 倍以上に発現上昇し、173 遺伝子が 2 分の 1 以下に発現低下していることが明らかになった。一般に miRNA の標的遺伝子の多くは、mRNA レベルで発現抑制を受けることが知られていることから、miR-125a 欠損 HSC において発現上昇した 332 遺伝子に着目し、これらが miR-125a の直接標的遺伝子である可能性について標的遺伝子予測データベースにより解析した。使用した 3 種の標的予測アルゴリズム(miRanda, TargetScan, Pita)のうち、

少なくとも 2 つ以上のアルゴリズムで miR-125a の直接標的遺伝子候補として予測された遺伝子(253 遺伝子)と照合した結果、4 種の遺伝子 Zbtb7a, MGLL, TEF, ETV6 が候補遺伝子としてあがった。これら 4 種の遺伝子のうち、癌遺伝子様機能が報告されている 3 種の遺伝子 Zbtb7a, MGLL, TEF について、miR-125a の標的遺伝子である可能性を検証した。まず miR-125a を肺癌細胞株 A549 に導入し、それぞれの mRNA レベルを解析した結果、Zbtb7a mRNA 発現レベルのみが miR-125a の導入により抑制されることを確認した。また miR-125a による Zbtb7a の発現抑制は、タンパクレベルでも確認された。

Zbtb7a は miR-125a の直接の標的遺伝子である

miRNA 標的予測データベースにより、Zbtb7a mRNA の 3'UTR 内に miR-125a の結合候補配列が 3 か所存在することが示唆された(図 3 左)。miR-125a が Zbtb7a の 3'UTR を介してその発現を直接抑制しているかを、EGFP 遺伝子下流に Zbtb7a 3'UTR 配列を挿入したレポータープラスミドを用いて、EGFP レポーターアッセイにより検証した。miR-125a は EGFP-Zbtb7a-3'UTR レポーターの EGFP 活性を優位に抑制した(図 3 右)。これら結果は、Zbtb7a が miR-125a の直接の標的遺伝子であることを示している。

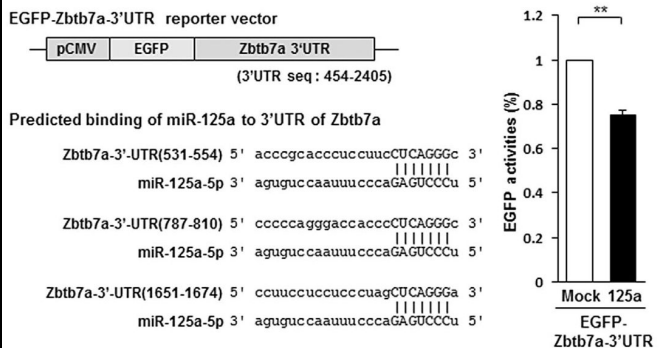


図 2. Zbtb7a は miR-125a の直接の標的遺伝子である。(左) EGFP-Zbtb7a-3'UTR レポーターベクターと、標的予測データベース(TargetScan)により予測された Zbtb7a-3'UTR 内の miR-125a 結合サイトを示す。予測された miR-125a 結合サイトを含むヒト Zbtb7a-3'UTR 配列(1,952-bp, position 454-2405)を EGFP レポーター遺伝子の下流に挿入した。(右) A549 細胞に EGFP-Zbtb7a-3'UTR レポーターベクターと、miR-125a 発現ベクター(125a)またはコントロールベクター(Mock)を共発現させ、24 時間後にフローサイトメトリーにより EGFP 活性を測定した。Mock における EGFP 蛍光強度を 1.0 とし、相対平均蛍光強度(MFI)を示した。独立して行った 3 回以上の実験データの平均値および標準偏差を結果として示した。**, p<0.01.

Zbtb7a の発現抑制は肺癌細胞において細胞周期 G1 停止およびアポトーシスを誘導する

Zbtb7a の肺癌細胞における役割解析した。Zbtb7a に特異的な siRNA (si-Zbtb7a) を肺癌細胞株 A549 に導入し 48 時間後に細胞増殖、アポトーシスおよび細胞周期を解析した。その結果、G1 期にある細胞の割合が有意に増加し、S-G2M 期にある細胞の割合が低下した。さらに、si-Zbtb7a の導入により、Annexin-陽性アポトーシス細胞が有意に増加した。これらの結果は、Zbtb7a は細胞周期進行を促進し、アポトーシスを抑制することにより、肺癌細胞の増殖を亢進させていることを示している。またわれわれは miR-125a の強制発現が、A549 肺癌細胞において、細胞周期 G1 停止およびアポトーシスを誘導することにより細胞増殖抑制効果をもたらすことも示している。したがって、Zbtb7a の発現抑制が肺癌細胞増殖に与える効果は、miR-125a の導入による細胞増殖抑制効果と一致することを確認できた。このことから、miR-125a による Zbtb7a の発現抑制が miR-125a の肺癌細胞に対する増殖抑制効果に少なくとも一部関与していることが示唆された。

非小細胞肺癌患者組織における miR-125a と Zbtb7a の発現は逆相関する

miR-125a と Zbtb7a の発現の相関をヒト非小細胞肺癌組織において解析した。56 例の NSCLC 患者組織における miR-125a および Zbtb7a mRNA の発現レベルを qRT-PCR により測定し、スピアマン順位相関係数検定した (図 3)。miR-125a と Zbtb7a mRNA の発現は有意に逆相関した。 ($r=-0.36$; $p=0.0075$)

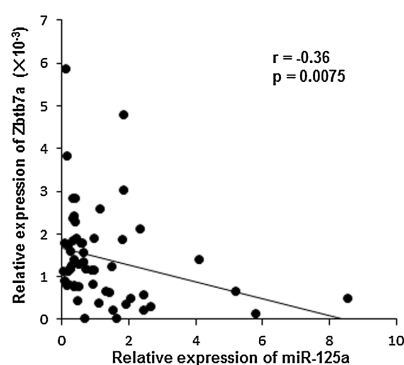


図 3. miR-125a と Zbtb7a の発現は非小細胞肺癌 (NSCLC) 組織において逆相関する。56 例の NSCLC 患者組織における miR-125a および Zbtb7a mRNA 発現レベルを qRT-PCR により測定した。U6snRNA および Actin mRNA をインターナルコントロールとし、miR-125a および Zbtb7a mRNA 発現レベルの補正にそれぞれ使用した。スピアマン順位相関係数検定の結果、miR-125a 発現レベルと Zbtb7a mRNA 発現レベルの間に有意な相関が示された。 ($r=-0.36$; $p=0.0075$)

(まとめ)

目的 (1) の研究により、WT1 遺伝子の発現は少なくとも 2 種の miRNA、miR-125a および miR-486 による発現調節されており、その制御機構の破綻は造血器腫瘍の発症に關与することが明らかになった。さらに、目的 (2) の研究により、miR-125a は複数のがん遺伝子 WT1 および Zbtb7a を調節することにより、癌発症や進展において重要な機能を果たしていることが示された。

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 9 件)

全て査読あり

1. Hojo N, Tatsumi N, Moriguchi N, Matsumura A, Morimoto S, Nakata J, Fujiki F, Nishida S, Nakajima H, Tsuboi A, Oka Y, Hosen N, Hayashi S, Sugiyama H, Oji Y. A Zbtb7a proto-oncogene as a novel target for miR-125a. Mol Carcinog, in press. 2015 Dec 29. doi: 10.1002/mc.22446.
2. Tatsumi N, Hojo N, Yamada O, Ogawa M, Katsura Y, Kawata S, Morii E, Sakamoto H, Inaba R, Tsuda A, Fukuda I, Moriguchi N, Hasuwa H, Okabe M, Fujiki F, Nishida S, Nakajima H, Tsuboi A, Oka Y, Hosen N, Sugiyama H, Oji Y. Deficiency in WT1-targeting microRNA-125a leads to myeloid malignancies and urogenital abnormalities. Oncogene, 35:1003-14, 2016 doi: 10.1038/onc.2015.154.

[学会発表](計 4 件)

1. Tatsumi N, Hojo N, Yamada O, Ogawa M, Katsura Y, Kawata S, Morii E, Sakamoto H, Inaba R, Tsuda A, Fukuda I, Moriguchi N, Hasuwa H, Okabe M, Fujiki F, Nishida S, Nakajima H, Tsuboi A, Oka Y, Hosen N, Oji Y, Sugiyama H Identification of a novel WT1 regulator, miR-125a 第 8 回国際 WT1 会議 2015 年 11 月 19 日 京都
2. 辰巳直也、北條望、森井英一、蓮輪英毅、岡部勝、保仙直毅、尾路祐介、杉山治夫 WT1 を標的とする miR-125a の骨髄増殖性腫瘍発症における役割 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 10 日 (土) 愛知
3. 北條望、辰巳直也、森口奈保子、松村晃秀、林清二、尾路祐介、杉山治夫 miR-125a 新規標的遺伝子 Zbtb7a の同

定とその機能解析 第 74 回日本癌学会
学術総会 2015 年 10 月 10 日(土)愛
知

4. 辰巳直也、北條望、森口奈保子、保仙直
毅、杉山治夫、尾路祐介 WT1 を標的とす
る microRNA-125a 欠損マウスは骨髄増殖
性疾患を発症する 第 19 回造血器腫瘍
研究会プログラム 2015 年 1 月 24 日
(土)佐賀

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