

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461433

研究課題名(和文) B細胞性腫瘍発生におけるmicroRNA142過剰発現の役割

研究課題名(英文) The role of microRNA142 overexpression in B-cell tumor development

研究代表者

園木 孝志 (SONOKI, TAKASHI)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30382336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：(まとめ)二つのモデルマウスを使ってmiR142の機能解析を試みた。その結果、miR142過剰発現は血球の減少を生じることが分かった。(結果) 骨髄移植マウス：マウス骨髄細胞にmiR142とGFPを遺伝子導入した。遺伝子導入した骨髄細胞を、骨髄機能破壊マウスに移植した。その結果、miR142を強発現する血球は減少した。遺伝子改変マウス：miR142をB細胞に強発現させる遺伝子改変マウスを作成した。生後一年以上経過した遺伝子改変マウスにおいては、IgM陽性細胞が野生型に比較し減少した。(結論)上述の結果は、miR142過剰発現が細胞の運命を攪乱しガン化に関与することを示唆する。

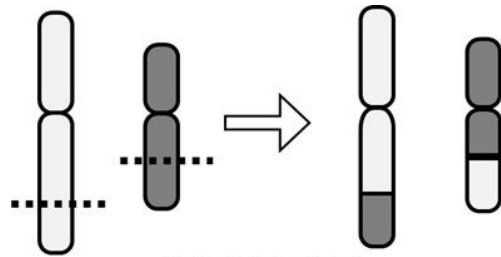
研究成果の概要(英文)：(Summary) We performed functional analyses of miR142 using two mouse models. As a result, miR142 overexpression was found to cause a decrease in blood cells. (Result) (1) Bone marrow transplantation model: MiR142 and the GFP genes were introduced into bone marrow cells. The genes-introduced bone marrow cells were transplanted into the bone marrow-disrupted mouse. As a result, the blood cells which strongly express the miR142 were reduced. (2) Genetically modified model: Genetically modified mouse to be strongly expressed in B cells was generated. In genetically modified mice that were older than one year of age, IgM-positive cells were reduced compared to the wild type. (Conclusion) As mentioned above, our results suggest that miR142 overexpression is involved in the cancer development through disruption of cell fate.

研究分野：血液内科

キーワード：B細胞性腫瘍 染色体転座 マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

造血器腫瘍細胞には遺伝子異常を反映した染色体相互転座がみられる。染色体相互転座とは、染色体の一部が切断され染色体断片が相互に移動する構造異常(下図)で、切断部位(「転座切断点」という)近傍には、細胞の増殖・分化・死に関わる生物学的に重要な遺伝子が存在している。遺伝子が染色体相互転座によって、通常の染色体の位置から移動すると発現異常が生じる。もともと転座切断点には生物学的に重要な機能を持つ遺伝子が存在しているので、染色体相互転座による遺伝子発現異常は細胞の運命を攪乱して、腫瘍を発生させると考えられている。



染色体相互転座  
(破線は転座切断点を示す)

上述の背景から、転座切断点近傍の遺伝子を同定し、その生物学的機能を調べることは、腫瘍発生の分子基盤を明らかにし、腫瘍特異的な診断や治療に結びつく。私たちは、B細胞性リンパ腫腫瘍細胞に8番染色体長腕24バンド(8q24)と17番染色体長腕21バンド(17q21)との染色体転座(t(8;17)(q24;q21))を見つけた。8q24転座切断点近傍にはMYC遺伝子が、17q21の転座切断点近傍にはマイクロRNA142(miR142)が存在し、各々、過剰に発現していることを確認した。MYCは古典的なガン関連遺伝子で、多くの研究成果が公表されている。miR142は21塩基の小さなRNAで、先行する研究で造血細胞に発現するmiRとして報告されていたが、そのin vivoでの機能と腫瘍発生での役割は不明であった。

2. 研究の目的

上述の背景のもと、miR142の生物学的機能とB細胞のガン化における役割をin vivoで解析することを目的とした。この解析を通じて、miR142発現異常がもたらす細胞形質の変化をとらえ、その分子基盤を明らかにし、新規治療法につなげることを長期的な目的とした。

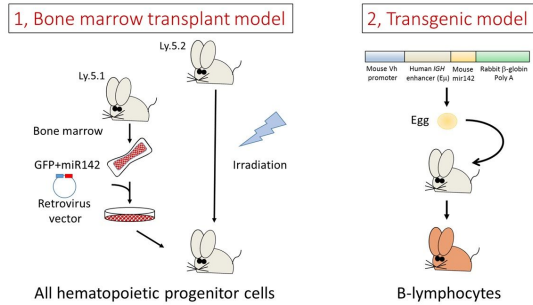
3. 研究の方法

t(8;17)(q24;q21)を示すB細胞性腫瘍細胞においては転座切断点近傍のmiR142が過剰発現していた。そこで、miR142を過剰発現させる二つのモデルマウス(骨髄移植モデル、トランスジェニックマウスモデル)を作成(右上図)し、in vivoでの影響を調べた。

骨髄移植マウス

マウスmiR142をGreen Fluorescent Protein

(緑色蛍光タンパク質、GFP)タグつきレトロウイルスベクターに組み込む。予備的検討で、このレトロウイルスベクターはおおまか



30%の細胞に感染することができる(感染効率が30%のレトロウイルスベクター)。感染した細胞はGFP陽性となるとともに、miR142がレトロウイルスベクターのエンハンサーにコントロールされるため、miR142を強発現するようになる。

マウスから骨髄細胞を採取し、ペトリ皿にて上述のレトロウイルスベクターを感染させた。レトロウイルスベクターで処理した骨髄細胞を放射線照射によって骨髄機能を破壊した同系のマウスに末梢血管から注入し移植した。レトロウイルスベクターは骨髄内にある前駆血球細胞に(骨髄球系やリンパ球系にかかわらず)ランダムに感染する。骨髄内の前駆血球細胞は成熟過程を経て、末梢血に出現する。末梢血に出現した血球の性質をフローサイトメトリーで調べた。この実験は、前駆血球細胞におけるmiR142過剰発現の影響を調べる系である。miR142のみを含まないレトロウイルスベクター(Mockベクター)を感染させた骨髄細胞を移植したマウスを対照群とした。

トランスジェニックマウス

マウスmiR142をマウス免疫グロブリン遺伝子調節領域(プロモーターとエンハンサー)の下流に組み込んだ組み換えDNA(Eμ142断片)を作成し、このDNAをマウス胚細胞に注入する。マウス胚細胞からは組み換えDNAを核内DNAに取り込んだトランスジェニックマウスが生まれてくる。トランスジェニックマウスにB細胞はEμ142断片由来のmiR142を過剰発現するようになる。トランスジェニックマウスと野生型マウスはEμ142断片の有無で選別可能である。トランスジェニックマウスでは、組み換えDNAの染色体への挿入部位の影響を排除するため、2系統のトランスジェニックマウスの表現形質を調べた(921系マウスと621系マウス)。

トランスジェニックマウスの骨髄、末梢血、脾臓の細胞を採取して、B細胞の形質変化をフローサイトメトリーで調べた。

Eμ142断片はB細胞にのみ遺伝子を発現させるように働くので、この実験は、B細胞におけるmiR142過剰発現の影響を調べる系である。同時期に生まれた野生型マウスを対照群とした。

二つのin vivoモデルマウスを何らかの症状

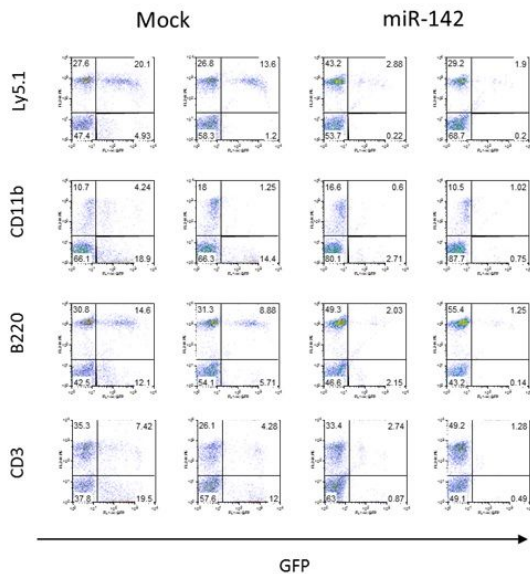
(元気のなさ、体格の変化など)を観察した。これらのモデルマウス適切な動物実験施設で飼育され、実験に際しては動物実験指針に基づいて行った。

#### 4. 研究成果

##### 骨髄移植マウス

骨髄移植マウスにおいては、約半年の観察をおこなった。miR142 強発現マウスは、明らかな症状を生じなかった。経時的に末梢血の白血球の表面抗原をフローサイトメトリーで調べた。GFP がレトロウイルス感染細胞のマーカーとなるので、緑色蛍光を横軸に、赤色蛍光を縦軸にして、フローサイトメトリーで血球細胞の表面抗原発現を検討した。その結果、コントロール (Mock) に比較して、末梢血 GFP 陽性細胞の減少が観察された (下図)。

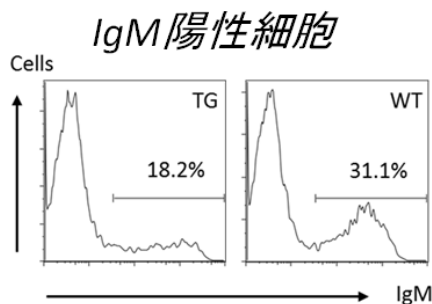
### 骨髄移植マウス



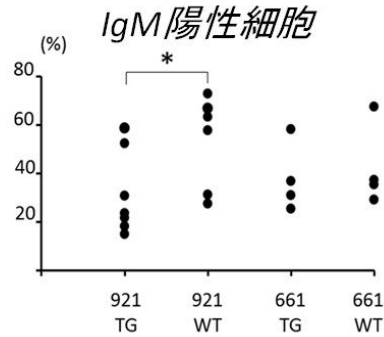
##### トランスジェニックマウス

トランスジェニックマウスにおいては、約2年間の観察期間をおいた。特に疾患発症を唆する症状は出現しなかった。生後一年以上経過したマウスの脾臓を採取してフローサイトメトリーでB細胞の形質を調べたところ、IgM 陽性 B 細胞の減少が観察された (下図、及び右上図)。

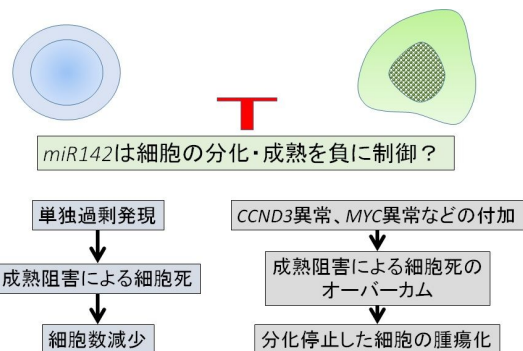
### トランスジェニックマウス脾臓



### トランスジェニックマウス脾臓



これらの結果から、私たちは、miR142 の過剰発現は血球細胞の正常な分化を攪乱して細胞死をもたらし、成熟血球数を減少させたのではないかと推察している (下図)。腫瘍細胞においては、miR142 過剰発現だけではなく MYC 過剰発現があるので、miR142 過剰発現がもたらす分化攪乱・細胞死がオーバーカムされ、分化段階で停止した細胞の腫瘍化が生じると考えている (下図)。



現在、トランスジェニックマウスの脾臓細胞を人為的に刺激し、正常マウスと比較して分化誘導に差異がないか、検討している。また、miR142 が標的とする分子をB細胞分化に焦点をあて探索している。

#### 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7件)

1. Murata S, Mushino T, Hosoi H, Kuriyama K, Nishikawa A, Nakakuma H, Sonoki T, Hanaoka N. Extracorporeal antimicrobial elimination enables antimicrobial mixing and affects resident bacteria. J Antimicrob Chemother. 2016 (in press)
2. Hanaoka N, Murata S, Hosoi H, Shimokado A, Mushino T, Kuriyama K, Hatanaka K, Nishikawa A, Kurimoto M, Sonoki T, Muragaki Y, Nakakuma H. B-cell-rich T-cell lymphoma associated with Epstein-Barr

virus-reactivation and T-cell suppression following antithymocyte globulin therapy in a patient with severe aplastic anemia. Hematol Rep 2015;7:5906.

3. Murata S, Mushino T, Hosoi H, Kuriyama K, Kurimoto M, Watanuki J, Nishikawa A, Sonoki T, Nakakuma H, Hanaoka N. Real-time monitoring of antimicrobial use density to reduce antimicrobial resistance through the promotion of antimicrobial heterogeneity in a haematology/oncology unit. J Antimicrob Chemother. 2015 Sep;70(9):2661-4.

4, Nishikawa A, Tamura S, Hatanaka K, Kuriyama K, Hosoi H, Murata S, Hanaoka N, Yonetani N, Tamaki T, Nakakuma H, Sonoki T. Outcome of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for multiple myeloma: retrospective analysis of 16 patients. Int J Myeloma 2015;5:23-29.

5, Hosoi H, Sonoki T, Murata S, Mushino T, Kuriyama K, Nishikawa A, Hanaoka N, Ohshima K, Imadome K, Nakakuma H. Successful immunosuppressive therapy for severe infectious mononucleosis in a patient with clonal proliferation of EBV-infected CD8-positive cells. Intern Med 2015;54:1537-1541.

6. Sonoki T, PVT1: A Cancer-associated Non-coding Gene Revisited. Clon Transgen 3: 120. (2014), doi:10.4172/2168-9849.1000120

7. Shimanuki M, Sonoki T, Hosoi H, Watanuki J, Murata S, Kawakami K, Matsuoka H, Hanaoka N, Nakakuma H. Molecular Cloning of IG Rearrangements using Long Distance Inverse-PCR (LDI-PCR). Eur J Haematol. 2013 Jan;90(1):59-67

〔学会発表〕(計 2 件)

1, Hiroki Hosoi, Kodai Kuriyama, Shogo Murata, Takehiro Oiwa, Hiroshi Kobata, Yusuke Yamashita, Toshiki Mushino, Akinori Nishikawa, Nobuyoshi Hanaoka, Takashi Sonoki: A novel double hit lymphoma cell line showing t(14;18)(q32;q21) and t(8;22)(q24;q11), 第 77 回日本血液学会学術集会、2015. 10.16-18 石川

2, Hiroki Hosoi, Takashi Sonoki, Masaya Shimanuki, Shogo Murata, Koudai Kuriyama, Shinobu Tamura, Akinori Nishikawa, Kazuo Hatanaka, Nobuyoshi Hanaoka, Hideki Nakakuma: Molecular cloning of t(14;20)(q32;q13) breakpoint from a B-ALL patient. 第 75 回日本血液学会学術集会、2013.10月11~13日、北海道

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

園木 孝志 (SONOKI, Takashi)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号: 30382336

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: