

論文の内容の要旨

論文題目 A functional analysis of microRNA aberrantly expressed in leukemic cells

和訳 白血病細胞において発現異常を示す microRNA の機能解析

指導教員 北村 俊雄 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 19 年 4 月 入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学 専攻

榎本 豊

「サマリー」

microRNA が造血系細胞において、重要な機能を担っていることが明らかになってきた。また白血病において発現異常が確認されているが、詳細は未解明な部分が多い。本研究では、B-cell precursor ALL (BCP-ALL) で見られた microRNA125b1 (miR125b1) 領域の染色体異常を報告する。さらに、miR125b1 を強発現したトランスジェニックマウス (TG マウス) は、B 細胞性腫瘍を発症することを示す。また、マウスの骨髄移植 (BMT) モデルでは、急性骨髄性白血病 (AML) の重症化に寄与する結果が得られた。標的遺伝子の一つとして、アポトーシス誘導遺伝子である *tp53inp1* を報告する。

「序文」

1. 本研究の背景

microRNA は、タンパク質をコードしない約 22 塩基の小さな RNA であり、標的遺伝子の 3'UTR (非翻訳領域) の相同性の高い配列に結合し、翻訳阻害や

mRNA の分解により、タンパク質としての発現を抑制する。その機能は多岐に渡り、発生、分化、アポトーシス、細胞増殖などの生命現象に関わることが、これまでの解析でわかってきた。

microRNA の解析が進み、疾患において、多くの microRNA の発現異常が確認された。特に、癌や白血病での異常については、盛んに研究が進められている。

私達の研究グループは、BCP-ALL の患者で、miR125b1 ゲノム領域が、染色体異常により免疫グロブリン重鎖 (IGH) 遺伝子領域に挿入されている例を発見し、報告した。この miR125b は、乳癌においては発現が抑制されており、抗腫瘍効果を示すことが報告されている。しかし、最近になって、造血細胞においては、AML や、B 細胞性急性リンパ性白血病 (B-ALL)、T 細胞性急性リンパ性白血病 (T-ALL) を誘導するという結果が報告された。microRNA の標的遺伝子の一つではなく、多くの遺伝子はその標的とされていると考えられている。よって、異なる組織では異なる機能を担うということも考えられる。いずれにしろ、標的遺伝子の探索を含めた、さらなる機能解析、特に複雑に色々な要因が影響する生体内での機能解析が重要である。

2. 目的および着眼点

本研究の目的は、miR125b が白血病においてどのような機能を及ぼすかを調べることである。特に、生体内における機能に注目して研究を進める。具体的には、miR125b を B 細胞で強発現させる TG マウスの作製、及び解析を行う。また、B 細胞以外での機能解析には、マウスの BMT モデルを用いる。さらに、microRNA は標的遺伝子を抑制することで機能することから、標的遺伝子の探索を行う。また、miR125b が、造血器疾患においてどれくらいの頻度で発現異常を示すかを調べるため、患者サンプルを用いて発現解析を行う。このようにして、miR125b と白血病との関連性、さらにそのメカニズムを解明していく。

「結果」

1. BCP-ALL における miR125b1 の染色体異常の解析

BCP-ALL における miR125b1 ゲノム領域と IGH 遺伝子領域の染色体異常 (insertion) により、その領域から miR125b が発現することがわかった。

2. E μ /miR125b-TG マウスは、リンパ球系腫瘍を発症する

B 細胞における miR125b の機能を解析するため、B 細胞で miR125b を強発

現する TG マウスを作製した。プロモーター領域に、Human IGH E μ enhancer、Mouse VH promoter を用いて、miR125b を Rat β -globin 遺伝子領域に挿入した。

この TG マウスを長期観察したところ、TG マウスは、造血器腫瘍を引き起こすことがわかった。発症したマウスでは、肝臓及び脾臓の腫大が見られる。

次に TG マウスの病態の解析を行った。BM、脾臓のサイトスピン像、及び末梢血 (PB) のスメア像を見ると、腫瘍細胞が各臓器で増殖していることがわかった。さらに、肝臓と脾臓の病理像を見ると、組織中に腫瘍細胞が、浸潤していることがわかった。

TG マウスから得られた細胞を用いて、FACS 解析を行った。その結果 B220 陽性、CD19 陽性の B 細胞が増えていることがわかった。以上の結果から、この TG マウスは B 細胞性腫瘍を発症している、ということがわかった。

次に、TG マウスが発症したときの、脾臓、肝臓の重量、BM の細胞数、ヘモグロビン (Hb) の数値を、WT と比較検討した。その結果、脾臓、肝臓は腫大することがわかった。また、BM の細胞数は増加し、逆に Hb の数値は減少する結果となった。

3. C/EBP α の C 末変異 (C/EBP α -C^m) と miR125b の強発現は、AML の重症化を引き起こす

次に B 細胞以外の細胞での機能解析を、BMT モデルを用いて行った。骨髓細胞 (ドナー-Ly5.1) に miR125b、mock、又は miR30a (コントロール microRNA) をレトロウイルスにより導入し (マーカーとして GFP を発現する)、マウス (レシピエント Ly5.2) に移植した。そして、移植後 1 年経過したマウスの解析を行った。その結果、miR125b を導入したマウスでは、BM、脾臓、PB、胸腺 (thymus) において、GFP 陽性、Ly5.1 陽性の細胞の割合が高くなっていることがわかった。つまり、miR125b を導入した細胞が、有意に増えているという結果が得られた。

さらに、miR125b を導入したマウスで、BM での GFP 陽性率が 50% を超えたマウスに着目して、GFP 陽性細胞の細胞マーカーを解析した。その結果、BM、脾臓、PB において、CD11b 陽性の細胞が有意に増えていることがわかった。また、胸腺では GFP 陽性細胞は T 細胞になっている結果が得られた。

以上より、miR125b は生体内で、細胞の生存においてプラスに働くことを示唆させる結果が得られた。しかし、1 年経過した時点で、造血器疾患を発症するようなことはなかった。

最近になって、miR125b が AML の誘導に働くという結果が報告された。そこ

で、AML に対して生体内でどのように機能するかを検討した。我々の研究室ではこれまでに、転写因子である C/EBP α の C 末変異 (C/EBP α -C^m) を、骨髄細胞に導入して、この骨髄細胞をマウスに移植すると AML を発症する、というモデルを報告した。この BMT モデルを用いて、AML に対して miR125b を導入することにより、協調作用が生じるかを検討した。その結果、miR125b を導入した群では、mock を導入した群と比較して、AML の発症が早まるという結果が得られた。

C/EBP α -C^m と miR125b を導入したマウスの方が、C/EBP α -C^m と mock を導入したマウスに比べて、肝臓と脾臓の更なる腫大が見られた。さらに PB のスメア像を見ると、C/EBP α -C^m と miR125b を導入したマウスの方が、C/EBP α -C^m と mock を導入したマウスに比べて、WBC の数が多い結果であった。つまり、miR125b は AML に対して、その重症化に寄与するということが示された。

4. miR125b は、造血細胞のアポトーシスを抑制する

miR125b の標的遺伝子として、trp53inp1 というアポトーシス誘導遺伝子に注目した。Luciferase assay を行った結果、この 3'UTR は、miR125b により抑制を受けることが明らかになった。さらに、結合予測配列に変異を導入すると、miR125b による抑制が見られなくなった。つまり、miR125b による発現抑制は、miR125b の結合予測配列に依存することがわかった。さらに、32Dcl3 細胞に miR125b を導入したところ、trp53inp1 の mRNA の発現レベルが抑えられることがわかった。

次に 32Dcl3 細胞を、IL-3 非存在下の培地で培養し、アポトーシスアッセイを行った。その結果、miR125b によりアポトーシスが抑制される結果となった。同様に TG マウスでも trp53inp1 の発現が低下しており、アポトーシスが抑制されることを示した。

5. 造血器疾患における miR125b の発現解析

ヒト造血器疾患における miR125b の発現量を、Real-time PCR により定量解析した。その結果、BCP-ALL で 21 例中 6 例、特にフィラデルフィア染色体陽性(Ph+) (BCR/ABL 陽性) の BCP-ALL では 9 例中 4 例で、normal サンプルと比較して 5 倍以上高い結果となった。さらに骨髄系の疾患においては、AML で 8 例中 5 例、慢性骨髄性白血病 (CML) で 4 例中 2 例、骨髄異形成症候群 (MDS) で 7 例中 2 例、骨髄増殖性腫瘍 (MPN) で 3 例中 1 例、normal サンプルと比較して

5倍以上高い結果となった。

「まとめ」

本研究では、miR125bの強発現が生体内で、B細胞性の腫瘍の発症を誘導すること、またC/EBP α -C^mとの組み合わせがAMLの重症化に寄与することを報告した。腫瘍を促進するメカニズムとして、アポトーシス誘導遺伝子のtrp53inp1がmiR125bの標的遺伝子の一つであり、その発現を抑制することを初めて示した。そして、実際に32Dcl3という造血系細胞を用いて、miR125bがアポトーシスを抑制する作用があることを示した。同様にTGマウスでもアポトーシスが抑制されることを示した。また、患者サンプルを用いた発現解析で、miR125bの発現がBCP-ALLやAML、CML、MDS、MPNにおいて、発現が高い症例を発見した。