

令和4年度  
博士学位論文

MicroRNA-142 の機能獲得型変異による  
白血病発症メカニズムの解析

熊本大学大学院薬学教育部

創薬・生命薬科学専攻 ライフサイエンスコース

ゲノム機能分野

河野 慎吾

The mechanism of leukemia

by gain-of-function mutations in microRNA-142

Shingo Kawano

## **The mechanism of leukemia by gain-of-function mutations in microRNA-142**

Department of genomics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,  
Kumamoto University, Shingo Kawano

MicroRNAs (miRNAs) play an important role in the regulation of gene expression. miRNA expression levels fluctuate and point mutations and methylation occur in cancer cells; however, to date, there have been no reports of point mutations in miRNAs that induce carcinogenesis. MicroRNA-142 (miR-142) is frequently mutated in patients with follicular lymphoma, diffuse large B-cell lymphoma, chronic lymphocytic leukemia (CLL), and acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome (AML/MDS). To understand the role of miR-142 mutation in blood cancers, the CRISPR-Cas9 system was utilized to successfully generate miR142 knockout (KO) mice and miR-142-55A>G mutant knock-in (Ki) mice, which is the most frequent mutation in patients with miR-142 mutated AML. Phenotypic analysis showed that miR-142-mutant Ki had a lower survival rate than KO, and abnormal cells infiltrated the organ. Bone marrow cells from miR-142 mutant heterozygous Ki mice were transplanted and found that the miR-142 mutant/wt cells were sufficient for the development of CD8<sup>+</sup> T-cell leukemia in mice post-transplantation, while most of the miR142 KO cells did not. RNA-sequencing analysis in hematopoietic stem/progenitor cells and CD8<sup>+</sup> T-cells revealed that miR-142-Ki/+ cells had increased expression of the mTORC1 activator, a potential target of wild-type miR-142-3p. Interestingly, the expression of genes involved in apoptosis, differentiation, and the inhibition of the Akt-mTOR pathway was suppressed in miR-142-55A>G heterozygous cells, indicating that these genes are repressed by the mutant miR-142-3p. Thus, in addition to the loss of function due to the halving of wild-type miR-142-3p alleles, mutated miR-142-3p gained the function to suppress the expression of distinct target genes that are sufficient to cause leukemogenesis in mice.

## MicroRNA-142 の機能獲得型変異による白血病発症メカニズムの解析

熊本大学大学院薬学教育部 創薬・生命薬科学専攻

ライフサイエンスコース ゲノム機能分野 河野 慎吾

microRNA とは、タンパク質には翻訳しない 20~25 塩基からなる小さい非翻訳 RNA である。miRNA は、細胞内で生合成過程を経て成熟した一本鎖 RNA となった後に seed 配列となる約 7 塩基が標的 mRNA に結合することで、mRNA の分解やタンパク質への翻訳を抑制する。一つの miRNA は、seed 配列の並びにより 100 以上の遺伝子発現制御に関わっていると推測されている。これまでに様々ながん細胞において miRNA の一塩基変異やメチル化が起こっていることが報告されているが、それらでは miRNA の発現変動のみを解析しており、現在までにがん化を誘導する miRNA の遺伝子変異については報告がない。

近年、白血病患者のがん細胞の遺伝子解析を行なった結果、主に血球細胞に多く発現している miRNA-142 (miR-142) -3p に一塩基変異が多く存在することが報告された。ヒトとマウスでその配列は 100%一致しており、miR-142 を KO したマウスについての表現型は既に報告されているが、miR142-KO のホモ接合体 (-/-) の報告のみでヘテロ接合体 (+/-) については触れられていなかった。しかし、実際に患者で見つかった一塩基変異は全てヘテロ接合状態であることから、miR142 に一塩基に変異が入ることが白血病発症の原因となると仮説を立てた。本研究では、白血病における miR-142 変異の役割を理解するために、CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集を行うことで、白血病の患者で発見された一塩基変異の中で最も頻繁にみられた変異である miR142-55A>G 変異 (miR-142-Ki) をマウスに導入した。同時期に作製した miR-142-KO と表現型を比較したところ、miR-142-KO ホモ接合体 (KO) およびヘテロ接合体と比べて miR-142-Ki ホモ接合体 (Ki/Ki) およびヘテロ接合体 (Ki/+) は生存率が低く、リンパ球系の CD4<sup>+</sup>T 細胞が減少し、CD8<sup>+</sup>T 細胞が上昇傾向にあることが明らかになった。miR-142-55A>G 変異がヘテロ接合体においても影響を及ぼしうることから、miR-142-KO、Ki/+, Ki/Ki マウスの骨髄をレ

シピエントマウスに移植を行い、一ヶ月ごとに末梢血での血球成分を比較した。その結果、骨髄移植後5ヶ月以降にマウスの末梢血液で白血球が異常に増加し、miR-142-Ki/+の骨髄細胞移植マウスは未成熟なCD8<sup>+</sup>T細胞に血球分化が偏ることが明らかになった。異常増殖した細胞の二次移植実験、TCRレパトア解析を行うことで、miR-142-55A>G変異によりヘテロ接合体でもCD8<sup>+</sup>T細胞性白血病を発症し、白血球増加がみられたマウスから次々と死亡していくことが判明した。

miR-142-55A>G変異によってどのようにして白血病化を誘導するのかを明らかにするため、造血幹前駆細胞(HSPC)及びCD8<sup>+</sup>T細胞(T-cell)のRNA-sequenceにより発現の網羅的解析を行った。白血病化したT細胞では自己増殖や代謝に関わる遺伝子発現が上昇し、正常なT細胞としての機能を失っていることが明らかになった。miR-142の一塩基変異により標的遺伝子への機能を評価するため、野生型のmiR-142-3pの標的として予測された*Rheb*や*Rras*などの、mTORC1の活性化と関与する遺伝子群の発現が上昇することがわかった。また、興味深いことにmiR-142-3p 55A>G変異した際には標的となる遺伝子発現が大きく変動していた。その中でも*Camk1d*や*Parp1*, *Zfp36l2*等のアポトーシスや血球細胞の分化、Akt-mTOR経路を阻害する遺伝子の発現が低下し、miR-142に変異が入ることで標的となった遺伝子群が抑制されることが示された。以上の結果から、miR-142-Ki/+マウスでは、miR-142-55A>G変異により野生型miR-142-3pが減少し、その標的遺伝子の抑制が緩和される機能損失と、変異型miR-142-3pによって変動した標的遺伝子を新たに抑制する機能獲得の両方が起こることで、血球の分化異常をきたし白血病を発症することが明らかになった。

本研究は、miR-142に一塩基変異を導入したマウスの表現型解析の結果から、miRNAにはseed配列の一塩基変異のみでがんが誘導される機能獲得型変異が存在することを証明する世界初の報告である。

本論文では、以下の略語を使用する。

|             |  |
|-------------|--|
| AML         | : acute myeloid leukemia   |
| AMPK        | : adenosine monophosphate-activated protein kinase   |
| BM          | : bone marrow  |
| B6N         | : C57BL/6N   |
| CRISPR-Cas9 | : clustered regularly interspaced short palindromic repeats/<br>CRISPR associated proteins 9 |
| DNA         | : deoxyribonucleic acid  |
| EDTA        | : ethylene diamine tetraacetic acid  |
| ES          | : embryonic stem   |
| FACS        | : fluorescence-activated cell sorting  |
| FBS         | : fetal bovine serum   |
| GO          | : gene ontology  |
| GSEA        | : gene set enrichment analysis   |
| HSPC        | : hematopoietic stem/progenitor cell   |
| Ki          | : knock in   |
| KO          | : knock out  |
| LSK         | : Lineage <sup>-</sup> , Sca-1 <sup>+</sup> , c-Kit <sup>+</sup>                             |
| MDS         | : myelodysplastic syndrome   |
| miRDB       | : miRNA target prediction database   |
| miRNA       | : microRNA   |
| miR-142     | : miRNA-142  |
| mRNA        | : messenger ribonucleic acid   |
| mTORC1      | : mechanistic/mammalian target of rapamycin complex 1  |

|           |   |
|-----------|---|
| ncRNA     | : non-coding RNA                                  |
| PBS       | : phosphate buffer saline                         |
| PCA       | : principal component analysis                    |
| PCR       | : polymerase chain reaction                       |
| Pre-miRNA | : precursor miRNA                                 |
| Pri-miRNA | : primary miRNA                                   |
| qRT-PCR   | : quantitative RT-PCR                             |
| RNase III | : ribonuclease 3                                  |
| RT-PCR    | : reverse transcription-polymerase chain reaction |
| SDS       | : sodium dodecyl sulfate                          |
| sgRNA     | : single guide RNA                                |
| SPF       | : specific-pathogen-free                          |
| ssODN     | : single-stranded oligodeoxynucleotide            |
| TCGA      | : the Cancer Genome Atlas                         |
| TCR       | : T-cell receptor                                 |
| TE        | : Tris-EDTA buffer                                |
| WT        | : wild type                                       |

本論文では、以下の論文を基礎とするものである。

*A gain-of-function mutation in micro-RNA-142 is sufficient to cause the development of T-cell leukemia in mice*

*Cancer Science* (Accepted)

Shingo Kawano, Kimi Araki, Jie Bai, Imari Furukawa, Keigo Tateishi, Kumiko Yoshinobu,

Shingo Usuki, Rachael A Nimmo, Tadashi Kaname, Masaharu Yoshihara, Satoru

Takahashi, Goro Sashida, and Masatake Araki.

# 目次

|  |    |
|--|----|
| 第1章. 序論 .....  | 1  |
| 第1節. Micro RNA (miRNA) .....                         | 1  |
| 第2節. 白血病について.....                                    | 3  |
| 第3節. microRNA-142 と白血病.....                          | 5  |
| 第1項. 背景 .....  | 5  |
| 第2項. 研究目的 .....                                      | 7  |
| 第2章. 実験材料と方法.....                                    | 8  |
| 第1節. 動物福祉に関して .....                                  | 8  |
| 第2節. miR-142-55A>G マウス系統の作製.....                     | 8  |
| 第1項. ES 細胞を用いた1回目のゲノム編集 .....                        | 8  |
| 第2項. 受精卵を用いた2回目のゲノム編集.....                           | 10 |
| 第3節. DNA を用いた解析.....                                 | 11 |
| 第1項. Genome DNA の抽出 .....                            | 11 |
| 第2項. Genotyping.....                                 | 11 |
| 第4節. RNA を用いた解析 .....                                | 13 |
| 第1項. total RNA 抽出 .....                              | 13 |
| 第2項. miR-142 の発現量の定量.....                            | 13 |
| 第3項. RNA sequencing.....                             | 15 |
| 第4項. Quantitative RT-PCR 法 .....                     | 15 |
| 第5節. 骨髄移植実験 .....                                    | 17 |
| 第6節. フローサイトメトリー (FACS) 解析.....                       | 18 |
| 第1項. 末梢血解析 .....                                     | 18 |
| 第2項. 骨髄・臓器解析 .....                                   | 18 |
| 第3項. 細胞分取 .....                                      | 19 |
| 第7節. サイトスピンおよびメイギムザ染色.....                           | 20 |
| 第8節. 組織学的解析 .....                                    | 21 |
| 第9節. 統計解析.....                                       | 21 |
| 第3章. 実験結果.....                                       | 22 |
| 第1節. miRNA-142-55A>G, KO の表現型解析 .....                | 22 |
| 第1項. CRISPR-Cas9 による miRNA-142 55A>G, KO マウスの作製..... | 22 |
| 第2項. miRNA-142 一塩基変異置換の確認、発現量の比較.....                | 24 |
| 第3項. miR-142 55A>G の方が miR-142 KO より生存率が低い.....      | 27 |



|  |    |
|--|----|
| 第4項. miR-142-55A>G/+において T 細胞の分化に影響を及ぼす .....                | 29 |
| 第2節. 骨髄移植実験による miRNA-142 KO, 55A>G 変異の及ぼす表現型 .....           | 30 |
| 第1項. miR-142-55A>G, KO で白血球数の異常増加、分化の偏りが起こる .....            | 30 |
| 第2項. miR-142-KO では未成熟な骨髄系細胞が増殖する個体が存在する .....                | 32 |
| 第3項. miR-142-55A>G では Killer (CD8+) T 細胞性白血病が発症する .....      | 34 |
| 第3節. miR-142-55A>G/+の白血病化の証明実験 .....                         | 36 |
| 第1項. 2次移植実験によって持続的な細胞増殖をする .....                             | 36 |
| 第2項. miR-142-55A>G/+ (Leu)マウスの T 細胞はクロナリティ増殖する .....         | 38 |
| 第4節. RNA sequence 解析による miR-142-55A>G 白血病化の網羅的な解析 .....      | 39 |
| 第1項. miR-142-55A>G/+ (Leu) では Myc, mTORC1 と関連して細胞が増殖する ..... | 39 |
| 第2項. miR-142-55A>G/+ (Leu) は T 細胞としての機能を失い、自己増殖能が上昇する .....  | 41 |
| 第5節. miR-142-55A>G 変異は機能損失と機能獲得の両方により白血病が発症する .....          | 43 |
| 第1項. miR-142-55A (WT) の標的遺伝子の抑制が緩和され発現が上昇する .....            | 43 |
| 第2項. miR-142-55A>G により新たな標的遺伝子が抑制され mTORC1 が活性化 .....        | 46 |
| 第4章. 考察 .....  | 49 |
| 第1節. miR-142-55A>G 変異による白血病化について .....                       | 49 |
| 第2節. miR-142-55A>G は機能損失能と機能獲得能の両方を併せ持つ .....                | 51 |
| 第3節. miR-142-KO による病型について .....                              | 54 |
| 第4節. miRNA の標的遺伝子に関して、本研究の限界について .....                       | 54 |
| 第5章. 総括 .....  | 56 |
| 第6章. 参考文献 .....  | 57 |
| 第7章. 謝辞 .....  | 63 |

## 第1章. 序論

### 第1節. Micro RNA (miRNA)

従来から ribosomal RNA や tRNA といった non-coding RNA (ncRNA) の存在が知られていたが、2,000 年以降の大規模なトランスクリプトーム解析によって、哺乳類ゲノムから膨大な量の ncRNA が産生されていることが明らかとなった<sup>1</sup>。これら新しく発見された ncRNA のうち、長さが 20~25 塩基からなるものを microRNA (miRNA) として区分されている。miRNA の生合成経路を以下に示す (Figure 1)。miRNA は細胞の核内でスプライシングを受け、イントロンであった部分がヘアピンのように折りたたまれて二本鎖状のヘアピン構造となる primary miRNA (pri-miRNA) となる。pri-miRNA は核内で RNaseIII 型の酵素である Drosha とその補因子によって切断され、ヘアピン構造を持った precursor miRNA (pre-miRNA) となる。pre-miRNA は Exportin-5 を介して核から細胞質へと輸送され、細胞質で RNaseIII 型の酵素である Dicer によるプロセッシングを受け 20~25 塩基の miRNA 二本鎖が生成される。その後 RNA 誘導サイレンシング複合体 (RISC) に取り込まれることで、3'側に位置する 3p と 5'側に位置する 5p の 2つの成熟した一本鎖 miRNA として機能を示す。一本鎖 miRNA の 2~7 番目の配列である seed 配列が、相補的な配列を持つ標的 mRNA と結合することで mRNA の分解やタンパク質への翻訳を抑制する機能を持つ。1つの一本鎖 miRNA は 100 以上の標的遺伝子の発現を制御することで、様々な遺伝子発現ネットワークと関わるということが知られている。近年では、miRNA とがんとの関連性が様々な研究機関で明らかにされており<sup>2,3</sup>、がん細胞において miRNA の発現量の増減<sup>4-7</sup>、また miRNA の一塩基変異やメチル化が起こることが知られている<sup>8-9</sup>。



## 第2節. 白血病について

白血病とは、血球細胞が遺伝子異常を起こすことで腫瘍化し、無制限の増殖をきたす病態である。日本人の年齢階級別白血病罹患率は、2013年の推計値で男性10万人あたり11.2人、女性10万人あたり7.7人である。白血病の症状は、正常な血球細胞がつかれない造血不全による症状が主であり、発熱や貧血、出血傾向等が挙げられる。腫瘍化した白血病細胞の増殖傾向によって病態は2つに大別されており、分化能が失われた幼若細胞のみが増殖する急性白血病と、成熟細胞のみが腫瘍化し増殖する慢性白血病に区分されている。血球細胞は骨髄において造血幹細胞から骨髄系幹細胞、リンパ系幹細胞に分化し各血球細胞として機能することから白血病においても大きく分けて骨髄系白血病、リンパ系白血病の2つに区分される。従って、白血病は急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia: AML)、急性リンパ性白血病 (acute lymphoblastic leukemia: ALL)、慢性骨髄性白血病 (chronic myelogenous leukemia: CML)、慢性リンパ性白血病 (chronic lymphocytic leukemia: CLL) の4種類に大別される。

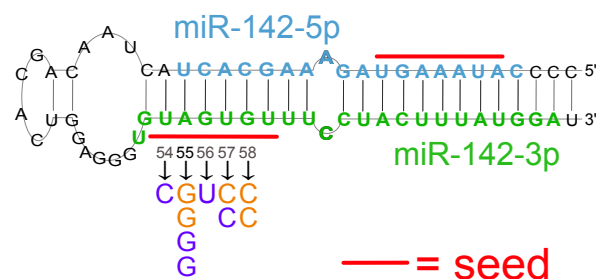
白血病の発症には遺伝子異常の蓄積が原因であり、細菌やウイルス、放射線などが関与することが考えられている。白血病を含む造血器腫瘍は以前までは定義が曖昧で臨床的な病態別に治療法を決定していたが、2001年にWHO分類という各白血病の腫瘍化の原因となる染色体・遺伝子異常は区別する手法が提唱され、最近では遺伝子情報の解析から治療法を決定することが主流となっている。WHO分類では全ての白血病等の造血器腫瘍は遺伝子異常が原因であることを前提としており、多くの白血病で *WT1* や *Myc* 遺伝子の発現が多いことやフィラデルフィア染色体等でみられる染色体の転座があること、*FLT3-ITD* や *NPM1* 遺伝子に変異することで発症することも明らかにされている。

また一方で、病態との因果関係が未だに解明されていない遺伝子異常も多いことから、今後も更なる遺伝子情報に則った病態解明により疾患を区別することで、より明確な治療が可能となることが期待されている。

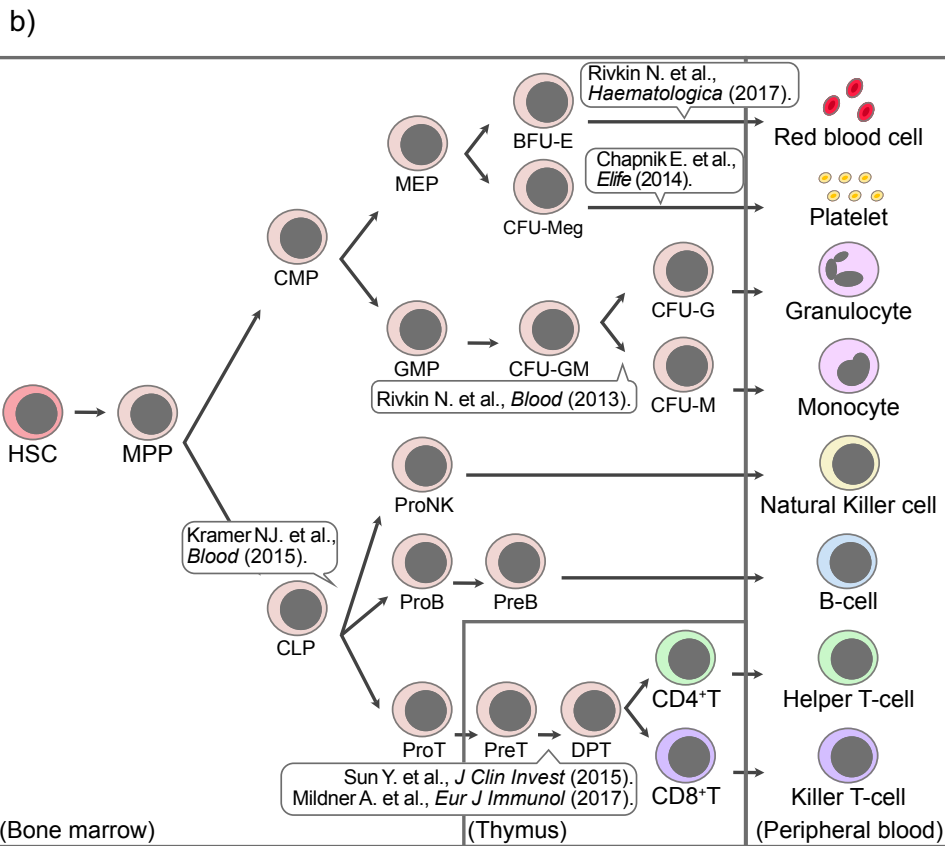
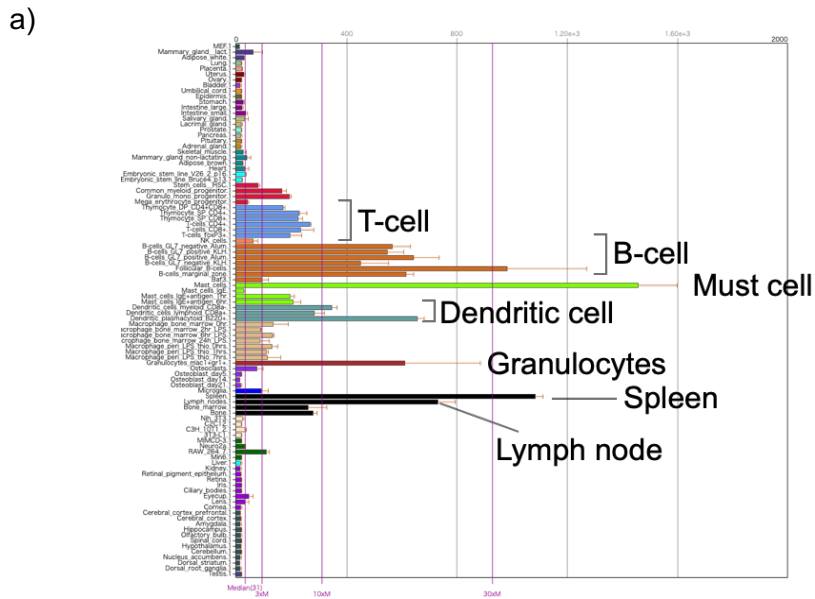
### 第3節. microRNA-142 と白血病

#### 第1項. 背景

本研究では、他のがん腫と比較して5~10数種の少数の遺伝子変異の蓄積によって引き起こされるAMLに着目した。がんの遺伝子変異は、各国で進められているがんゲノムプロジェクトにより、続々と明らかにされてきており、2013年にThe Cancer Genome Atlas (TCGA)において次世代シーケンサーを用いたAML患者200人の遺伝子変異の解析結果が報告された<sup>10</sup>。その解析から、200人中7人からmiRNAの変異が検出され、その中でもmiRNA-142 (miR-142) -3pに4人から5個の一塩基変異が存在していた。また、2015年にTholらの報告により、AML及び骨髄異形成症候群(MDS)の患者935人のうち5人からmiR-142-3pに一塩基変異が存在することが明らかにされた<sup>11</sup>(Figure 2)。miR-142はヒトとマウスにおいてその配列は同じで、主に造血細胞において多く発現しており(Figure 3a)、巨核球<sup>12</sup>、赤血球<sup>13</sup>、樹状細胞<sup>14</sup>、そして最も頻繁にT細胞の分化と機能を制御していると報告されている<sup>15-19</sup>(Figure 3b)。



**Figure 2. Mir142 pre-miR hairpin showing the position and nature of the individual single nucleotide variants identified in acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS) patients.** Numbering based on the pre-miR sequence position. Mature miRNA sequences are shown in bold with seeds underlined. Wild-type miR-142-3p is in green with mutations identified by TCGA in orange and those identified by Thol et al. in purple.



**Figure 3. miR-142-expressions and the functions.**

a) Location of miR-142-3p expression in the mice. Mainly in blood cells or lymphoid organs.

b) miR-142 functions report on hematopoiesis in mice.

## 第2項. 研究目的

Trissalらは第1項のmiR-142一塩基変異の報告を受けて、報告にあるmiR-142-3pの一塩基変異を培養細胞で強制発現させたところ、miR-142-3p変異体は野生型よりもRISCへの取り込み能が高く、さらにmiR-142-5pの発現量が低下していた。また、miR-142-3pの元々の標的であった遺伝子の発現抑制が緩和され、発現が増加していた<sup>20</sup>。これに従ってこれらmiR-142の一塩基変異は単純な機能不全型変異であると判断し、以後はノックアウト(KO)モデルマウスの解析結果を報告している。miR-142-KOはin Vivoで他の研究でも報告されており<sup>21</sup>、ホモ接合体においては血球増殖能が低く、免疫系細胞が減少することから重度の免疫不全を発症することが報告されているが、白血病は発症しておらずヘテロ接合体の表現型に関する記述はない。しかし、AML患者で検出されるmiRNA遺伝子異常は、そのほとんどが一塩基変異であり、ヘテロ接合体の状態である。そこで本研究では、miR-142の一塩基変異は機能不全ではなくヘテロ接合体でも白血病を発症する機能を獲得していると仮説を立て、最も報告に多いmiR-142-55A>G変異を導入したマウスをCRISPR-Cas9を用いて作製した。本研究の目的はmiR-142-55A>G変異、miR-142-KOの導入されたマウスの表現型解析により一塩基変異による表現型の違いを検証し、miR-142-55A>Gが実際にどのようにして遺伝子発現に影響を与えるのかRNA sequenceを用いて解析を行い、その原因を探索することである。



## 第2章. 実験材料と方法

### 第1節. 動物福祉に関して

動物実験は、本学動物実験規程および文部科学省所管の学術研究機関における動物実験等の適正な実施に関する基本的な指針に準拠して実施された。マウスは、生命資源研究・支援センター 動物実験施設本館で飼育し、餌と水を自由に与え、specific-pathogen-free (SPF)条件下で維持した。光周期は午前7時点灯、午後7時消灯に調節した。C57BL/6N (B6N)マウスおよびCD-1 (ICR)マウスは、それぞれクレアジャパンおよび日本チャールス・リバー・ラボラトリーズから購入した。本研究は、熊本大学の施設動物管理使用委員会およびDNA 実験委員会の承認を得て実施した（動物実験承認番号：A2020-016）（DNA 実験承認番号：29-053）。

### 第2節. miR-142-55A>G マウス系統の作製

#### 第1項. ES細胞を用いた1回目のゲノム編集

miRNA-142 へ一塩基変異を挿入するために、ES細胞を用いて行った。pX330-sgRNA9 は、制限酵素 BbsI を消化した pX330 ベクター (Addgene) に Table1. に示す標的配列を挿入し、作製した (Figure 4)。

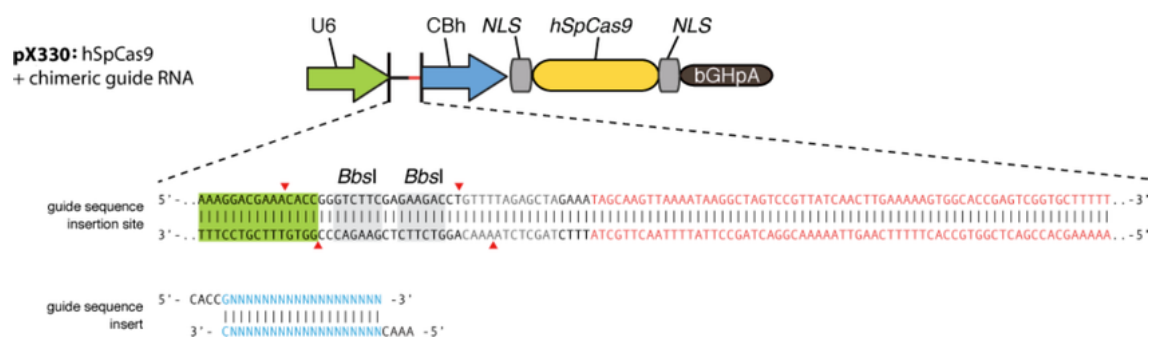


Figure 4. miR-142 Mutation Insertion Strategy in ES Cells

**Table1.**

---

5'-caccGCACTACTAACAGCACTGGA-3'

5'-aacTCCAGTGCTGTTAGTAGTGC-3'

---

疾患モデル分野において C57BL/6N マウスから樹立した 6NK-7 ES 細胞に、pX330-sgRNA9 2  $\mu$ g と、Table 2. に示す変異配列となる ssODN 3  $\mu$ g を、Xfect mESC Transfection Reagent (Clontech) を用いてトランスフェクションした。

**Table2. The sequence of ssODN with miR142-mutation**

---

5'-

CAGACAGACAGTGCAGTCACCCATAAAGTAGAAAGCACTACTAACAGC  
ACTGGAGGGTGTGGTGTTCCTACTTTATGGATGAGTGCCTGTGG  
GCTTCGGAGACCACGCCACGCCGCGGC-3'

---

2 日後、トランスフェクションした ES 細胞を 10 cm ディッシュに 3000 個 / 1 ディッシュの密度で植え付け、6.2% CO<sub>2</sub> 濃度のインキュベーター（湿度 100%）内で 7 日間培養を行った。8 日目にコロニーを摘出し保存した。得られたサンプルからサンガーシーケンスにより塩基配列を決定した。サンガーシーケンス用の PCR で用いたプライマーは Table 3. に示す。この時には目的とする一塩基変異を有するクローンは得られず、8 bp や 142 bp 欠損されたクローン #30, #43 が得られた (Figure 6b)。

**Table 3. PCR primers for Sanger sequencing**

---

miR-142-S (5'-GGGAAGAAGGTTACAAAGAGG-3')

miR-142-R (5'-TGAGAGATGCTCACCTGTTTC-3')

---

## 第2項. 受精卵を用いた2回目のゲノム編集

第1項では目的の一塩基変異が導入された配列は獲得できなかったが miR-142 の中のいくつかの範囲が欠損されたマウスを獲得した (Figure 6b)。次にクローン#30 の ES 細胞と ICR マウスを凝集させキメラマウスを作製し、C57BL/6N の雌と交配させた。miR-142-55A>G 変異を導入するため、クローン#30 の雌と C57/BL6N 雄を用いて体外受精を行い、受精卵に Cas9 タンパク質 (NIPPON GENE)、tracrRNA (FASMAC) , synthetic crRNA (FASMAC) , ssODN を先に述べている方法でエレクトロポレーションにより導入した。<sup>22</sup> synthetic crRNA はクローン#30 の 8 塩基欠損した接合部に aagtagaagcactaaca (GGG)が来るように設計した。エレクトロポレーション溶液は Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Thermo Fisher Scientific) 中に 10  $\mu$  M tracrRNA, 10  $\mu$  M 合成 crRNA, 0.1  $\mu$ g/ $\mu$ L Cas9 タンパク質, 0.1  $\mu$ g/ $\mu$ L ssODN と含んでいる。生まれた 14 匹のサンプルからそれぞれ DNA を抽出し、miR-142-S, miR-142-R を用いて塩基配列を決定し,miR-142-55A>G 配列を同定した (Figure 6b, Figure 8b)。

### 第3節. DNA を用いた解析

#### 第1項. Genome DNA の抽出

細胞およびマウス組織を Sodium dodecyl sulfate (SDS) / プロテイナーゼ K で溶解し、1:1 (vol/vol) のフェノール / クロロホルムで処理し、エタノールで沈殿させた後、Tris-EDTA buffer [TE, 10 mM Tris-HCL (pH 7.5), 1 mM EDTA] に溶解した。

#### 第2項. Genotyping

PCR で genotyping を行う際に、miR-142-55A (WT) アレルと miR-142-55A>G (Mut) アレルを検出するように、フォワードプライマー3'側末端を一塩基置換された位置にプライマーを設計して行った。miR-142-KO の検出には欠損された前の配列にプライマーを設計した。各プライマーの配列は Table 4. に示す。

**Table 4. PCR primers for genotyping**

| Name         | Sequence                           |
|--------------|------------------------------------|
| miR-142-WT-F | 5'-TAACAGCACTGGAGGTGTA-3'          |
| miR-142-G-F  | 5'-TAACAGCACTGGAGGTGT <b>G</b> -3' |
| miR-142-KO-F | 5'-GGGAAGAAGGTTACAAAGAGG-3'        |
| miR-142-R    | 5'-TGAGAGATGCTCACCTGTTTC-3'        |

WT アレル検出は、miR-142-WT-F と miR-142-R を用いて、アニーリング温度 65°C で 30 サイクルの PCR 条件で行った。Mut アレル検出は、miR-142-G-

F と miR-142-R を用いて、アニーリング温度 66°C で 30 サイクルの PCR 条件で行った。

#### 第4節. RNA を用いた解析

##### 第1項. total RNA 抽出

各マウスの骨髓細胞、造血細胞を ISOGEN (NIPPON GENE) 1 mL 加えた 1.5 mL tube で分取した後に、クロロホルム 0.2 ml を加えて Vortex を 30 秒以上行いよく攪拌した。遠心 (12,000 rpm, 4°C, 20 分) し、水層 550~600  $\mu$ L を新たな 1.5 mL tube に移し、クロロホルム 0.2 mL を加え攪拌し遠心 (12,000 rpm, 4°C, 20 分) した。水層 500~520  $\mu$ L をさらに新たな 1.5 mL tube に移し、エタ沈メイト (NIPPON GENE) 3  $\mu$ L を加えて pipetting で攪拌した。イソプロパノール 600  $\mu$ L を加え pipetting で攪拌後、遠心 (15,000 rpm, 4°C, 60 分) した。得られたペレットを 80%エタノール 1 mL で洗浄し遠心 (15,000 rpm, 4°C, 10 分) し、上清を 900  $\mu$ L 取り除いた後に再度遠心 (15,000 rpm, 4°C, 5 秒) した。残りの上清を 200  $\mu$ L チップで取り除き風乾後, Nuclease Free Water で溶解した。得られた total RNA の収量と純度は NanoVuePlus (GE Healthcare(Japan)) 用いて測定した。OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比が 2.0 以上であり、高純度の RNA であることを確認し、各実験に用いた。

##### 第2項. miR-142 の発現量の定量

マウスを安楽死させて骨髓細胞を分取し、ISOGEN を用いて total RNA を抽出した。cDNA の合成は、TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), TaqMan MicroRNA (miR-142-3p or 5p) Assay (Applied Biosystems) を用いて行った (Figure 5)。0.2 mL 8 連 tube に total RNA 10 ng, 5 $\times$ RT Primer 3  $\mu$ L と RT マスターミックスを混合して 15  $\mu$ L の溶液に調整し、氷上で 5 分間静置した。その後逆転写反応 (16°C 30 分, 42°C 30 分, 85°C 5 分) を行い、得られたサンプルを TaqMan Universal PCR Master Mix, no

UNG (Applied Biosystems) , 20×Taqman miR142-3p or 5p Assay と混合し、20  $\mu$ L の溶液に調整し、PCR 反応 (95°C 10 分 1 サイクル, 95°C 15 秒及び 60°C 60 秒 40 サイクル) を行った。各反応について同一サンプルを 3 ウェルで行った。なお、internal control として同じサンプルを用いた Actb/ $\beta$ -actin のリアルタイム RT-qPCR を行い補正した。標的産物の定量は Comparative CT 法 ( $\Delta\Delta$ CT 法) により行った。

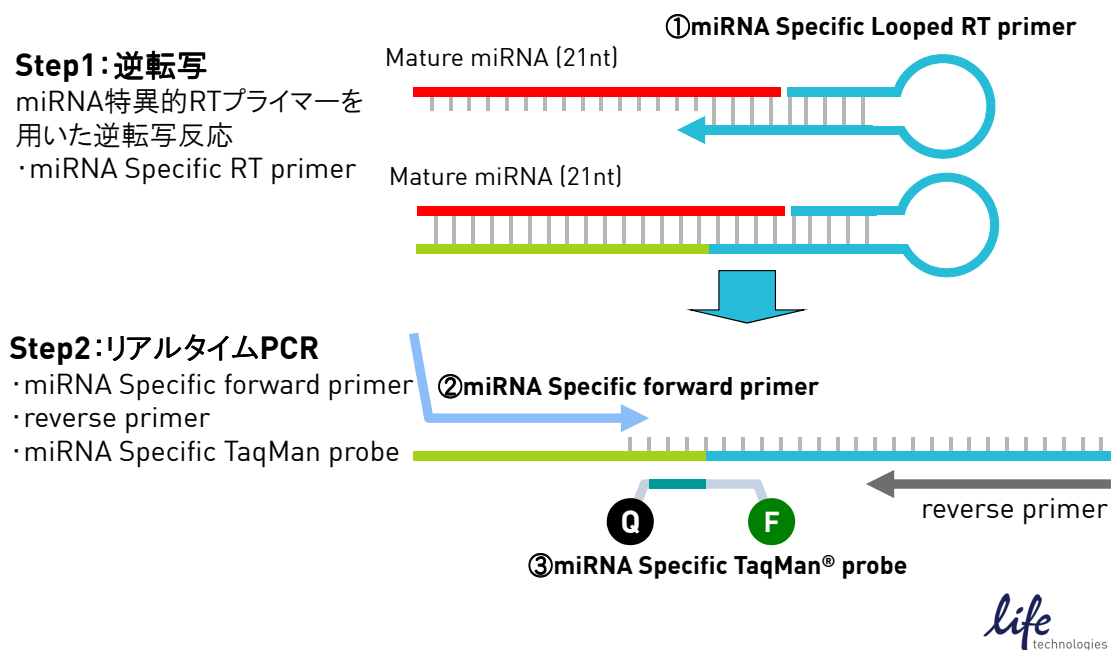


Figure 5. Taqman miRNA assay の原理 (Thermo Fisher Scientific – JP より引用)

### 第3項. RNA sequencing

RNA は各マウスを安楽死させ、Lineage<sup>-</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, c-Kit<sup>+</sup> (LSK) 細胞, CD8<sup>+</sup>T 細胞を分取して ISOGEN を用いて total RNA を抽出した。RNA sequencing は熊本大学リエゾンラボラトリー研究推進センター (LILA) に受託解析を依頼した。NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module と Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina を用いてライブラリー cDNA を調製し、Nextseq 500 / 550 High Output v2.5 Kit (Illumina) により Illumina NextSeq 500 (Illumina) で配列を解析しシングルエンド 75 nt リードを獲得した。得られたリードを STAR ver.2.6.0a を用いてマウスゲノム UCSC mm10 に調整し、アダプター配列や低品質の末端を除去するために Trim Galore! V0.5.0 (cutadapt v1.16)を用いてアダプター配列や低品質の末端を除去した後、STAR ver.2.6.0a を用いて調整した。遺伝子発現量は Count として測定し、TPM は RSEM v1.3.1 によって決定した。Gene Ontology 解析は、クラスタープロファイルパッケージ ver.4.1.0 の GSEA を使用して行った。GSEA ソフトは Broad Institute (<http://software.broadinstitute.org/gsea/downloads.jsp>)のウェブサイトからダウンロードした。

### 第4項. Quantitative RT-PCR 法

各サンプルの骨髄から抽出した total RNA を用いて Real-time RT-PCR (Thermal Cycler Dice TP800 Real-Time PCR system (TaKaRa)) を行った。Real-time RT-PCR には RT 反応用に PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) を、PCR 反応用に TB Green Premix Ex Taq II (TaKaRa) を用いた。以下にその概略を示す。マウスの骨髄から抽出した total RNA 500 ng を



鋳型とし、Oligo dT primer を用いて逆転写反応 (42°C 30 分, 95°C 5 分) を行った。その後各遺伝子 mRNA 増幅用の 5'-primer および 3'-primer を用いて PCR 反応 (95°C 2 分 1 サイクル, 95°C 30 秒及び 60°C 30 秒 40 サイクル) を行った。なお、internal control として同じサンプルの Actb/ $\beta$ -actin により補正した。標的産物の定量は Comparative CT 法 ( $\Delta\Delta$ CT 法) により行った。PCR 反応における各標的遺伝子に対するプライマーの配列を Table 5. に示す。

**Table 5. The list of PCR primers used in qRT-PCR**

| Gene           | Sense                       | Antisense                   |
|----------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <i>Rheb</i>    | 5'-TGAAGAAGGAAAGGCTTTGGC-3' | 5'-TCACATCACCGAGCACGAAG-3'  |
| <i>Rras</i>    | 5'-GCAAGCTCTTCACACAGATCC-3' | 5'-CTGCTCAAATGCCTCATCGAC-3' |
| <i>Camk1d</i>  | 5'-ACAGTCAAGACGAGGAGTCC-3'  | 5'-AGCAGTCCACAGCTTTGCTG-3'  |
| <i>Parp1</i>   | 5'-AAATGCAGCGAGAGTATTCCC-3' | 5'-TTGACCTTCTGCTGATCATCC-3' |
| <i>Zfp3612</i> | 5'-CCCGTTATTCATCTTGGTTCG-3' | 5'-AGGTTTGCCAGGGATTTCTCC-3' |

## 第5節. 骨髄移植実験

CD45.2+抗原を持つドナーマウスの骨髄 ( $5 \times 10^6$  個) を、放射線照射した CD45.1+抗原を持つレシピエントマウスの尾静脈に注入した。放射線は X 線照射器を用いて 8.5Gy を照射した。二次移植実験の際の白血病モデルには、白血病化したマウスの骨髄 ( $1 \times 10^6$  個) を正規の約半分相当量を照射 (5.5Gy) した CD45.1+レシピエントマウスに注入した。移植後にドナー細胞の生着がみられないマウスはその後の解析から除外した。白血球数が異常増加し肉眼的に痩せていたり、行動が鈍く動けなくなったマウスは安楽死させ、解析のために組織を採取した。

## 第6節. フローサイトメトリー (FACS) 解析

### 第1項. 末梢血解析

骨髄移植後に1ヶ月に1回各マウスの尾静脈から70~100  $\mu$ Lの血液をヘマトクリット毛細管へパリン (HIRSCHMANN) で採取した。その後10  $\mu$ LをCelltac  $\alpha$  MEK-6450 (NIHON KOHDEN) を用いて全血球計算 (CBC) を行い、残りの血液を溶血 Buffer (160 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 16 mM EDTA  $\cdot$  2Na, 12 mM  $\text{NaHCO}_3$ ) 1 mL 加えて軽く浸透した。遠心 (2,000 rpm, 4°C, 5分) し、上清を取り除いたら再度溶血 Buffer 1 mL 加えて再度遠心 (2,000 rpm, 4°C, 5分) し、上清を取り除いて残りの溶液を100  $\mu$ L程度にした。その後抗体と混合し、遮光して30分静置した後にFACS解析を行った。FACS解析の際に用いた抗体はTable 6.に示す。

### 第2項. 骨髄・臓器解析

マウスを安楽死させ、大腿骨、脛骨、背骨、胸骨を取り出し、紫外線消毒した陶器に骨と2% FBS入りPBS (SM) を入れて磨り潰した。70  $\mu$ m cell strainerを通して50 mL tubeで回収し、遠心 (1,500 rpm, 4°C, 5分) した。上清を捨ててペレットをタッピングし、SM 5 mLを加えて再度遠心 (1,500 rpm, 4°C, 5分) し、上清と取り除いた後にSM 1 mLで懸濁した。脾臓、胸腺等の臓器は3~4 mm切断し、70  $\mu$ m cell strainerを通して50 mL tubeで回収した。遠心 (1,500 rpm, 4°C, 5分) した後に上清を取り除き、ペレットを懸濁して溶血 Buffer で溶血した。再度遠心 (1,500 rpm, 4°C, 5分) し、上清と取り除いた後にSM 1 mLで懸濁した。細胞数 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 個を調整し、抗体と混合した。FACS解析の際に用いた抗体はTable 6.に示す。第1項、第2項で行ったFACS解析はすべてFACSVerseまたはFACSCantoII (BD Biosciences) で行った。

### 第3項. 細胞分取

各マウスを安楽死させ、骨髄を採取した。細胞数を数えて、c-Kit-APC 2B8 (0.5  $\mu$ L /  $10^7$  細胞数)と混合し、遮光して4°Cで30分静置した。静置した30分のうち10分に1回はTappingして細胞と抗体を攪拌させた。SM 5 mLで懸濁し遠心(1,500 rpm, 4°C, 5分)し上清を捨て、Anti-APC beads (Miltenyi Biotec Inc.) (0.2  $\mu$ L /  $10^7$  細胞数)と混合した。遮光して4°Cで30分静置し、SM 5~10 mLで2回洗浄した。40  $\mu$ m cell strainerで洗浄した骨髄を回収した後、MACS LS Column (Miltenyi Biotec Inc.)を通した。磁気により分離を行い、SM 3 mLでカラムを3回洗浄しLSK細胞を精製した。Lineage mixture (Gr1, B220, CD4, CD8  $\alpha$ , Ter119 と IL-7R  $\alpha$ )を加えた後に遮光して4°Cで30分静置した。染色されたサンプルを遠心(1,500 rpm, 4°C, 5分)し上清を捨て、各抗体と混合して遮光して4°Cで1~2時間静置して染色した。細胞を分取する際にはFACS Aria II (BD Biosciences)を用いて行った。

**Table 6. The list of antibodies for flow cytometric analysis**

| Name         | Clone        | Vender    |
|--------------|--------------|-----------|
| CD45.2       | 104          | BioLegend |
| CD45.1       | A20          | BioLegend |
| CD4          | RM4-5        | BioLegend |
| CD8          | 53-6.7       | BioLegend |
| CD3e         | 145-2C11     | BioLegend |
| TCRb         | H57-597      | BioLegend |
| TCRgd        | UC713D5      | BioLegend |
| Gr1          | RB6-8C5      | BioLegend |
| CD11b/Mac1   | M1/70        | BioLegend |
| B220         | RA3-6B2      | BioLegend |
| CD117/c-Kit  | 2B8          | BioLegend |
| Sca1         | D7           | BioLegend |
| CD34         | RAM34        | Invitrgen |
| Streptavidin | B327465      | BioLegend |
| CD150        | TC15-12E12.2 | BioLegend |

#### 第7節. サイトスピンおよびメイギムザ染色

マウスを安楽死させて採取した骨髄  $10^5$  細胞数/ SM  $100 \mu\text{L}$  を遠心 (1,000 rpm,  $4^\circ\text{C}$ , 3分) し風乾した。風乾した後のスライドを May-Grünwald solution (Sigma-Aldrich) で5分間染色し、水で軽く洗浄した後に Giemsa solution (Sigma-Aldrich) で20分間染色した。染色後のスライドを蒸留水で洗浄し、自然乾燥させて顕微鏡で観察した。

## 第8節. 組織学的解析

マウスを安楽死させて臓器を摘出した。その後臓器を 15%ホルマリン中性緩衝液 (Wako) で固定し、4  $\mu$ m の厚さのパラフィン包埋切片を作製した。hematoxylin solution (Fujifilm) と Eosin Alcohol Solution, acid extract (Fujifilm) を用いて Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を行い、BX53 顕微鏡 (Olympus) で観察した。

## 第9節. 統計解析

すべての統計学的検定は Graph Pad Prism version 9 (GraphPad Software) を用いた。それぞれの有意差は Student's t-test または Mann-Whitney non-parametric 検定によって測定した。0.05 未満の P 値は有意であるとみなした。

### 第3章. 実験結果

#### 第1節. miRNA-142-55A>G, KO の表現型解析

##### 第1項. CRISPR-Cas9 による miRNA-142 55A>G, KO マウスの作製

本研究では miR-142 の一塩基変異が白血病発症にどのように関わるのかを調べるため、AML の患者で最も高頻度にみられた変異である miRNA-142-55A>G をマウスに導入した<sup>10, 11</sup>。ヒトとマウスでは *Mir142* 遺伝子は同じ配列を持つ。6NK-7ES 細胞(C57BL/6N)を用いた最初のゲノム編集では目的 55A>G マウスを得ることができなかったが、8 塩基や 142 塩基等、いくつかの塩基が欠損したマウスを獲得した。その中で 142 塩基欠損したマウスは miR-142-5p を含む *Mir142* 遺伝子の前半部分が欠損されていたことから、miR-142 がクリップ構造を形成せず miRNA としての機能が失うことが考えられるため miR-142-KO マウスとした。次に、8 塩基欠損マウスの配列に基づき gRNA を設計しゲノム編集を行ったところ目的の miR-142-55A>G マウスを作製することに成功した(Figure 6a, 6b)。以下、miR-142-55A>G を miR-142-mutant-Knock in (Ki) マウスとして報告を行う。

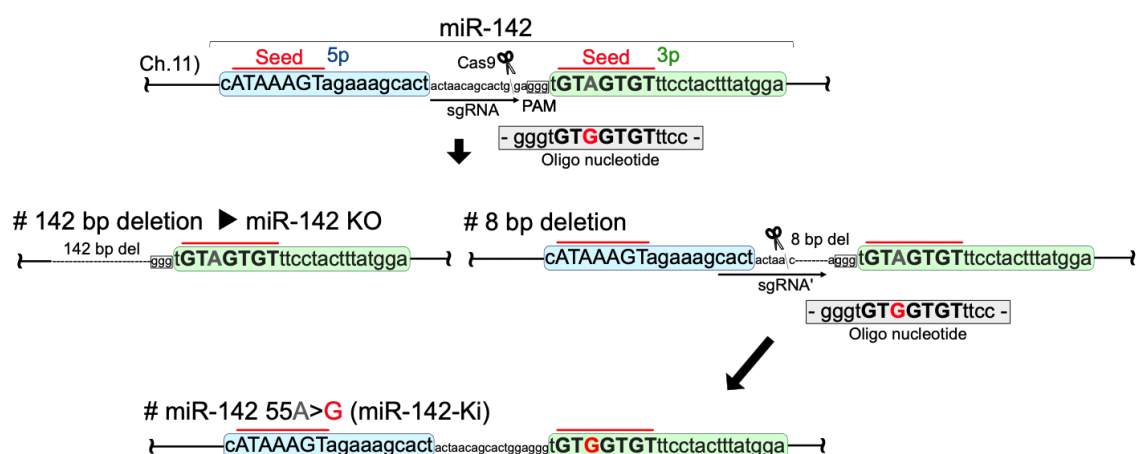


Figure 6. Genome editing system to produce miRNA-142-55A>G, KO

(Continue to the next page)

miR142-30-8 ▶ miR-142-55A>G

Red character : miR-142

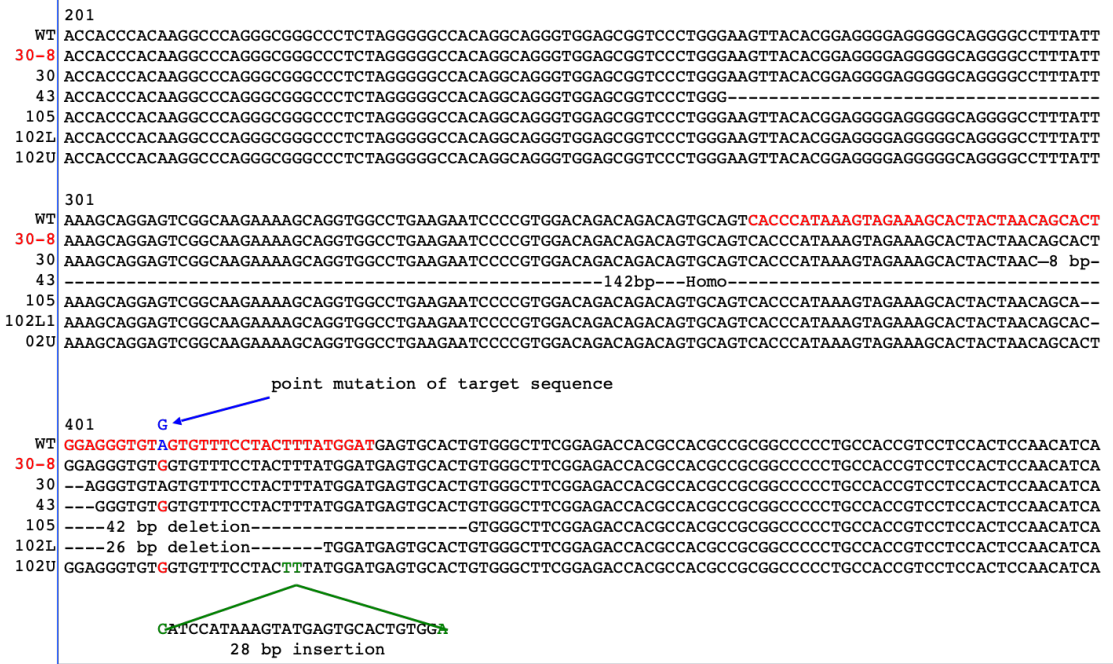


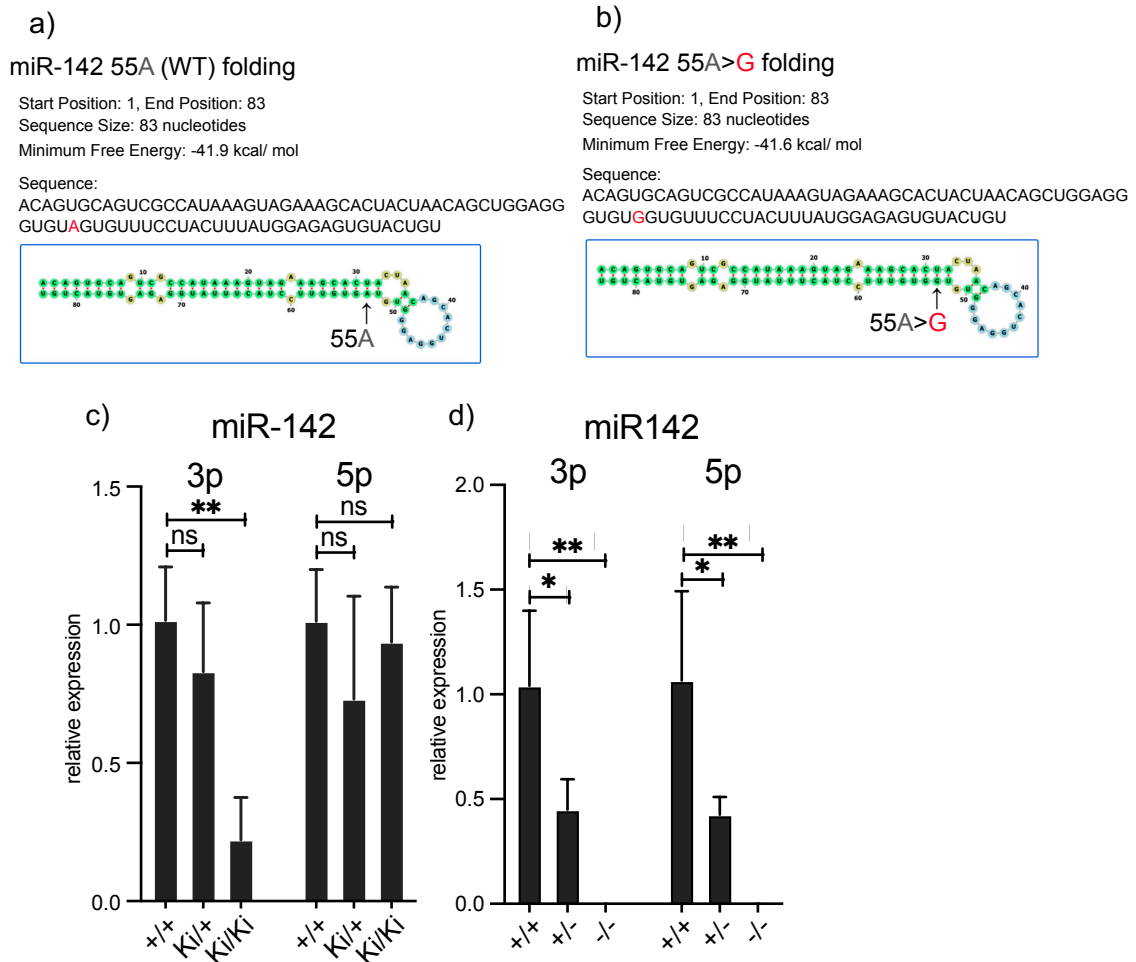
Figure 6. Genome editing system to produce miRNA-142-55A>G, KO

- a) Strategy for the CRISPR-Cas9 system in conjunction with miR-142-3p.
- b) The sequence of mice generated by the genome editing system.



## 第2項. miRNA-142 一塩基変異置換の確認、発現量の比較

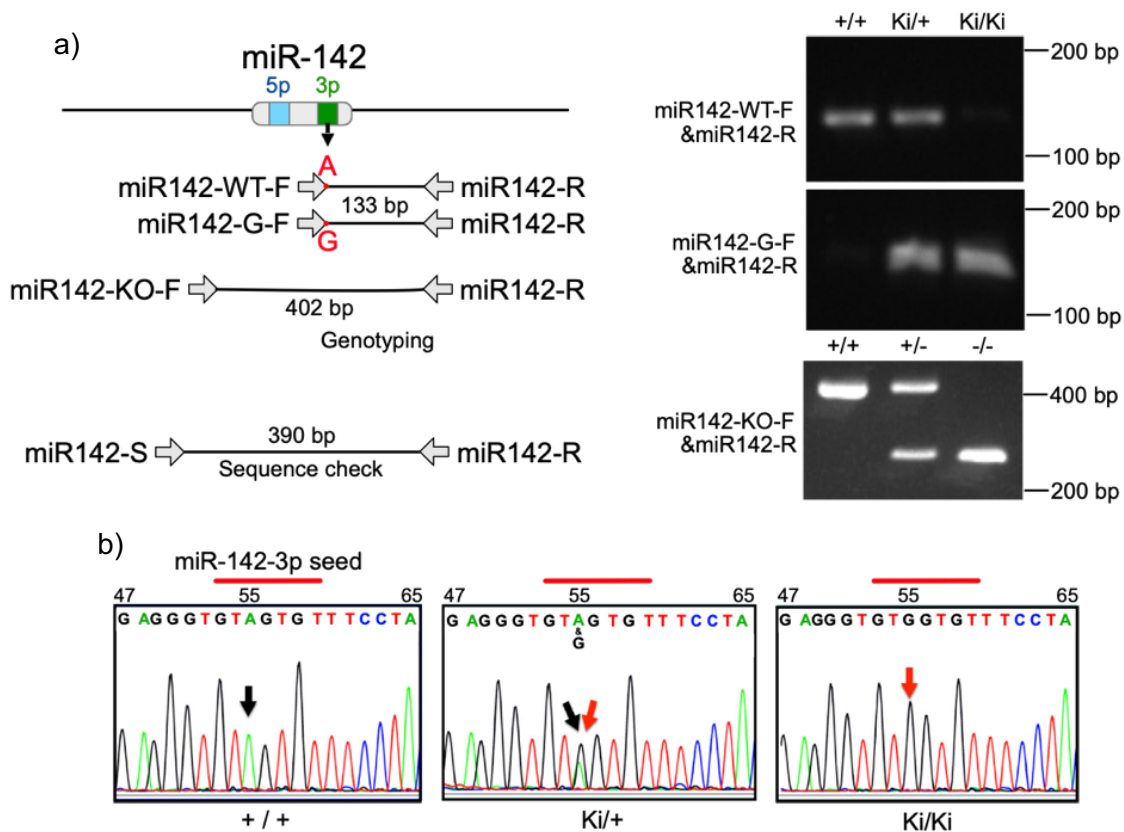
miRNA に一塩基変異が挿入されても野生型と同様にヘアピン構造を構築するのかを判別するため、miRNAFold というゲノム中の miRNA ヘアピン構造を構築するのかを予測するウェブサーバーを用いて検討したところ、miR-142-55A>G 変異の挿入でも WT と同等の効率でヘアピン構造を形成することが予測された (Figure 7a, b)<sup>23, 24</sup>。次に、実際の miR-142 の発現量を測定するため Taqman miRNA assay を行った。このアッセイでは、miR-142-55A>G 変異により miR-142-3p キットでは正確に評価できなかつたため、miR-142-5p キットを miR-142 発現量として評価したところ、miR-142-55A>G ではヘテロ接合体、ホモ接合体共に WT 有意差はなく同等の mRNA 発現レベルであることが確認された (Figure 7c)。miR-142-KO についても同様の解析を行ったところ、ヘテロ接合体、ホモ接合体では miR-142-3p, 5p が共に減少することから、miR-142-KO では miR-142 が消失していることが証明された (Figure 7c)。次に、一塩基変異が挿入されたポイントに Forward primer の 3'側がくるように primer 配列を設計し、ジェノタイピングを行った結果、miR-142 に一塩基変異が挿入されていることを確認した (Figure 8a)。miR-142-55A>G マウスのジェノタイピングで確認した一塩基変異は Sanger sequence で確認され (Figure 8b)、目的の一塩基変異のみを有することが証明された。



**Figure 7. miRNA expression**

a, b) miRNAFold is the identification of large-scale microRNA precursors in the genome and quickly and sensitively predicts microRNA hairpin structures. The hairpin structure for the miR-142-55A sequence is shown in (a) and the miR-142-55A>G sequence in (b).

c, d) miR-142-3p or 5p expression in bone marrow of 2-month-old mice (n = 3-4). miR-142-55A>G groups is shown in (c) and miR-142-KO groups is shown in (d).



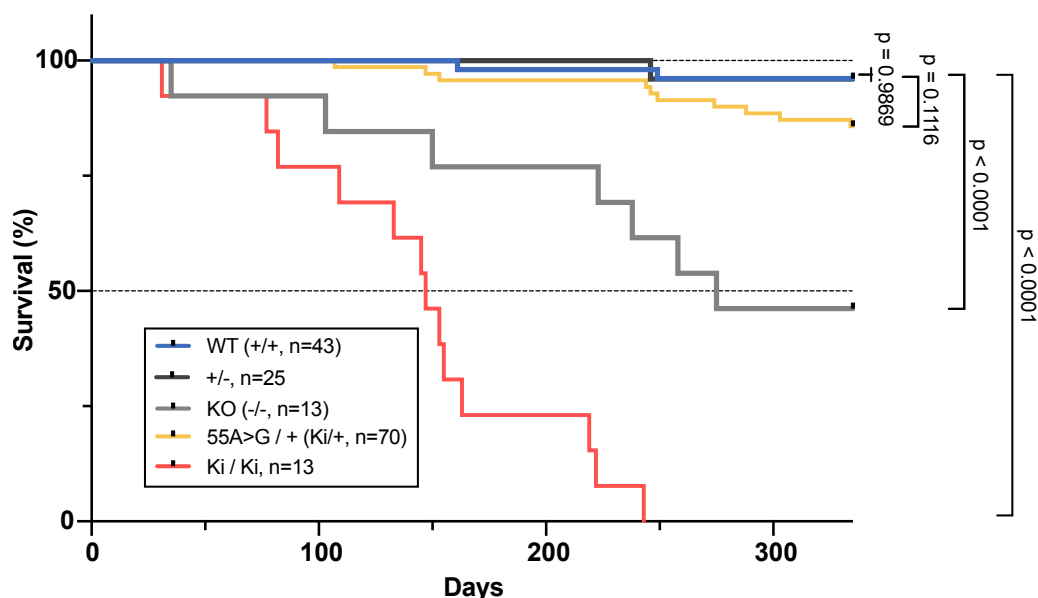
**Figure 8. miR-142 single nucleotide mutation check**

a) Verification of the introduced mutation using genotyping and a sequence analysis. The position of each primer is shown. The primer sequences were designed for the WT (A) and Ki (G) by aligning the right end of the forward primer (miR142-WT-F, miR142-G-F) with the position where the single nucleotide mutation was inserted. For miR-142-KO, primers were designed 3' from the sequence position where the deletion occurred.

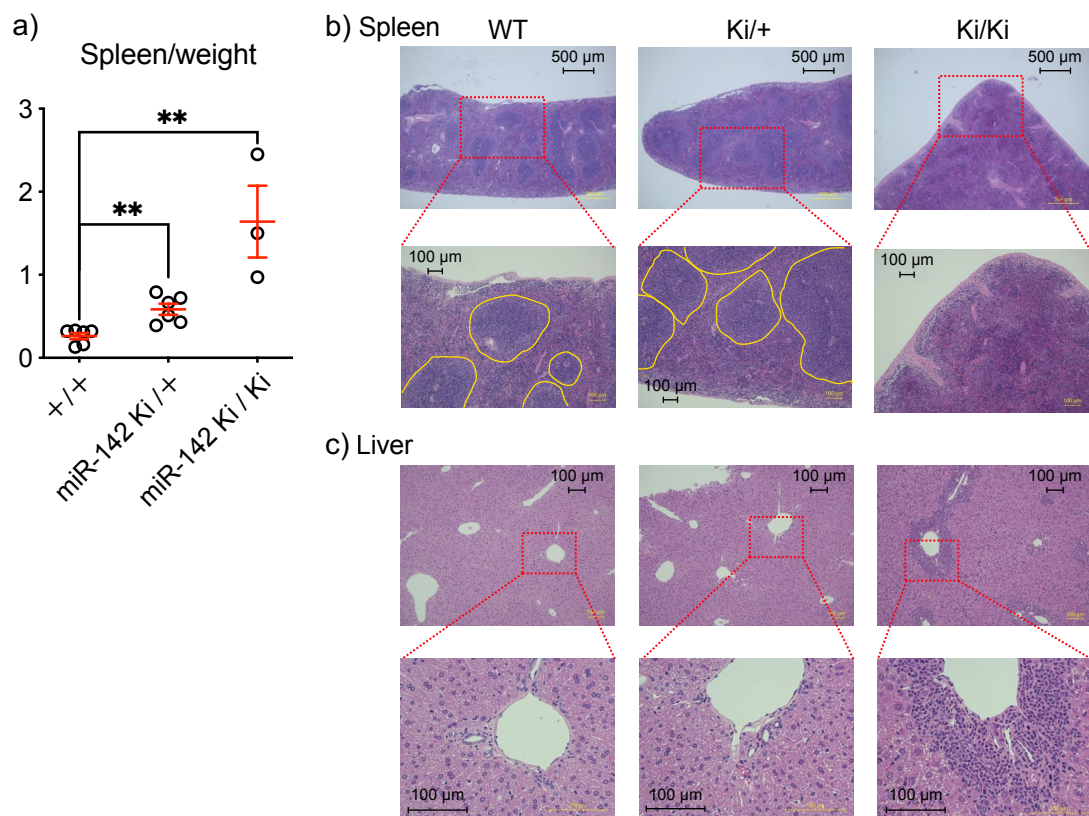
b) Sequence analysis confirmed the mutation of miR-142-3p (nucleotides in the seed sequence are marked with red). The correct nucleotide is indicated by a black arrow and the mutated nucleotide is indicated by a red arrow.

第3項. miR-142 55A>Gの方がmiR-142 KOより生存率が低い

今回得られたmiR-142-KO, miR-142-Kiマウスの生存曲線を確認したところ、miR-142-KOホモ接合体と比べmiR-142-Kiホモ接合体の方が早めに死亡し、生後150日目までに半数が死亡することが観察された。また、miR-142-Kiヘテロ接合体はmiR-142-KOヘテロ接合体と異なり、生後150日目あたりから死亡する個体も複数みられた (Figure 9a)。miR-142-55A>Gによって与えられる影響を評価するために生後150日目のマウスの臓器解析を行った結果、主に脾臓においてmiR-142-Kiヘテロ接合体、ホモ接合体で肥大していた (Figure 10a)。本結果は先行研究で行われたmiR-142-KOホモ接合体と同様の結果となる<sup>16</sup>。組織学的解析を行ったところmiR-142-55A>Gヘテロ接合体では脾臓の白脾髄が増加経向にあり、miR-142-55A>Gホモ接合体では組織崩壊していた (Figure 10b)。また、ホモ接合体では異常な細胞が肝臓においても浸潤していることが観察された (Figure 10c)。



**Figure 9.** Kaplan–Meier analysis of the survival of mice with WT (blue, n = 43), +/- (black, n=25). -/- (KO) (gray, n=13), Ki/+ (yellow, n = 70), or Mir142 Ki/Ki (red, n = 13). Statical significance values between WT and other groups were calculated using a log-rank test.



**Figure 10. Histological analysis of miR-142-Ki mice**

- a) Relative weight of the spleen of +/+, Ki/+ mice (n = 6), and Ki/Ki mice (n=3) of 150 days old mice.
- b, c) Histologic features of the spleen (b), and liver (c) in miR-142-WT, Ki/+, Ki/Ki of 150 days old mice by HE staining.

第4項. miR-142 55A>G/+において T細胞の分化に影響を及ぼす

miR-142-55A>G によりヘテロ接合体においても脾臓の肥大が見られていたことから、miR-142-55A>G ヘテロ接合体の末梢血の Flow cytometry 解析による血球分化能を比較した。その結果、miR142-Ki/+では顆粒球が増加傾向にあり (Figure 11a)、リンパ球系では CD4<sup>+</sup>T 細胞が減少傾向にあり、CD8<sup>+</sup>T 細胞がゆるやかに増加する個体もいた (Figure 11b)。この結果から、miR-142-55A>G によりヘテロ接合体においても末梢血の T 細胞分化に影響を及ぼしていることが示唆された。

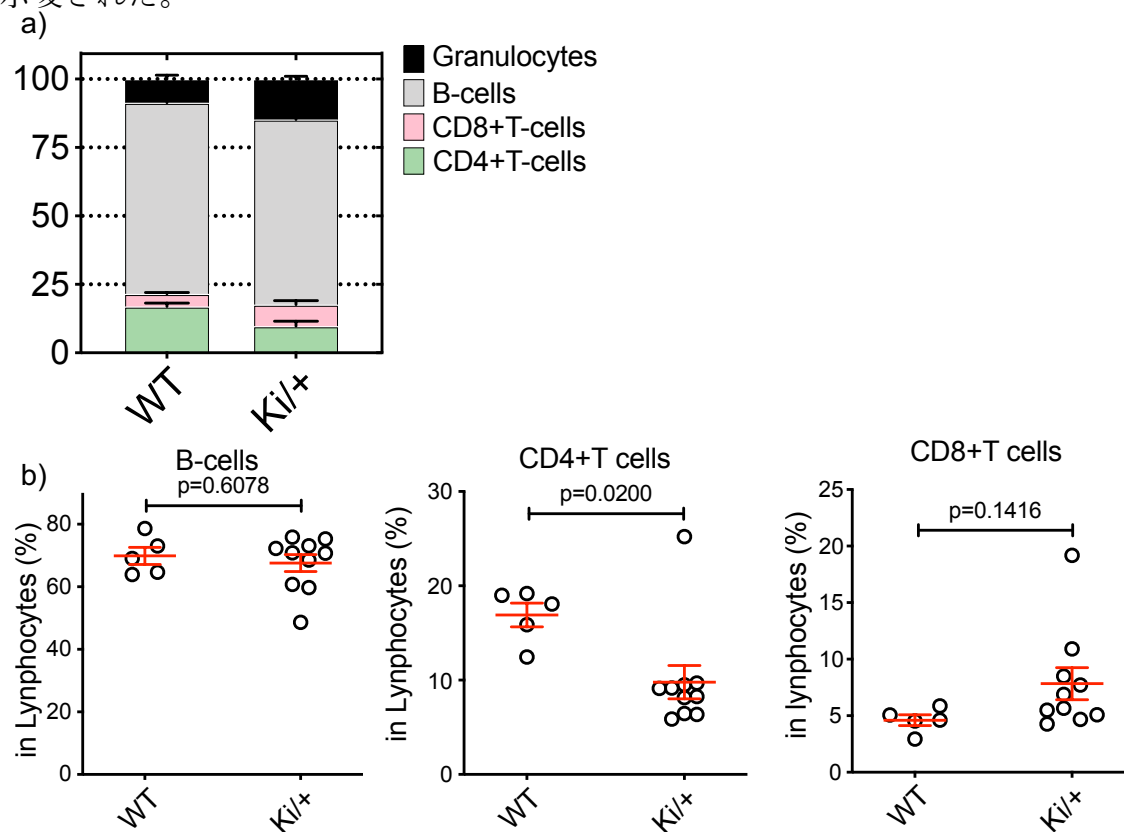


Figure 11. Hematopoietic differentiation of miR-142-Ki/+

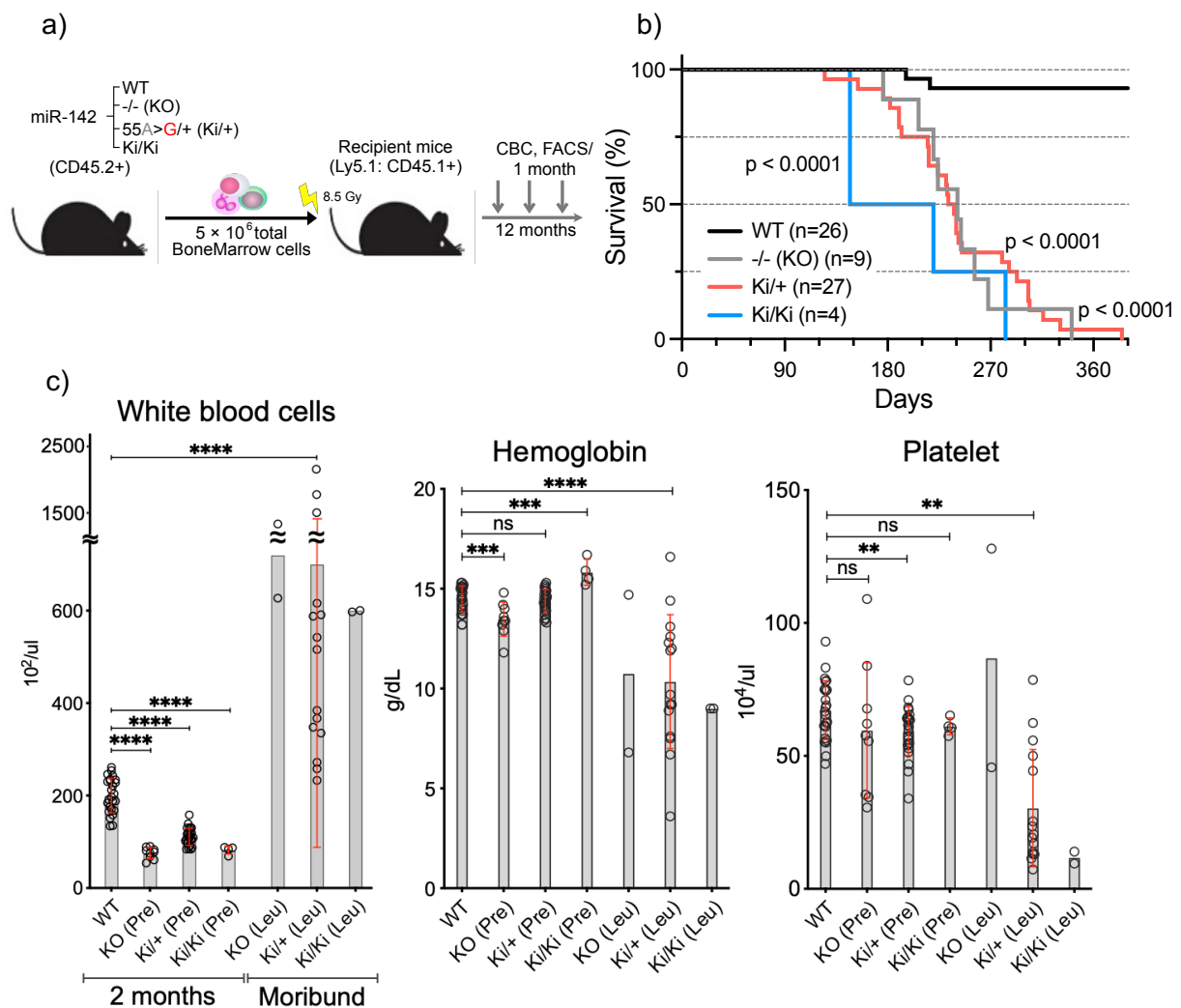
a) Granulocytes, B-cell, CD4+T-cell, and CD8+T-cells proportions from the FACS sorted cells in the peripheral blood of miR-142-WT, Ki/+, Ki/Ki of 150 days old mice.

b) Proportion of B-cells, CD4+T-cells, and CD8+ T-cells in Lymphoid cells in the peripheral blood. In Ki/+, CD4+ T cells are tending toward CD8+ T cells

## 第2節. 骨髄移植実験による miRNA-142 KO, 55A>G 変異の及ぼす表現型

第1項. miR-142-55A>G, KO で白血球数の異常増加、分化の偏りが起こる

miR-142-55A>G マウスの観察から miR-142 をノックアウトした際よりも表現型が大きいことが確認でき、血球分化に障害を起こすことが観察された。次に、血球細胞内において miR-142-55A>G 変異が白血病発症を促進させるのかを解明するため、WT (+/+), KO ホモ接合体 (-/-), miR-142-Ki ヘテロ接合体 (Ki/+), miR-142-Ki ホモ接合体 (Ki/Ki) マウスから採取した骨髄細胞を致死量の放射線照射した Ly5.1+マウスに移植し、毎月 CBC による血球数測定と FACS 解析による血球分化能の評価を行った (Figure 12a)。その結果、miR-142-KO, Ki/+, Ki/Ki マウスは全て移植後1年以内に死亡することがわかった (生存期間中央値 KO: 241 日, Ki/+: 238 日, Ki/Ki: 147 日) (Figure 12b)。CBC 解析により、miR-142-KO, Ki/+, Ki/Ki は移植2ヶ月後ではどれも白血球数 (WBC) が低下しており、以前の報告にあった miR-142-KO と同様の表現型である造血障害を示した<sup>20, 24</sup>。その後観察を続けたところ、移植5ヶ月後以降に WBC が異常に増加し、それに伴いヘモグロビン、血小板数の減少が認められた (Figure 12c)。白血球の異常増加を確認されたマウスはその後数日で死亡することから、白血病を発症していることが予測された。以降の報告では、移植後2ヶ月目の KO, Ki/+, Ki/Ki マウスを KO (Pre), Ki/+ (Pre), Ki/Ki (Pre) とし、白血球が異常に増加した病的なマウスをそれぞれ KO (Leu), Ki/+ (Leu), Ki/Ki (Leu) として行う。



**Figure 12. Bone marrow transplantation and phenotype**

a) Diagram of bone marrow (BM) generation. WT, miR-142 55A>G / + (Ki/+), or miR-142 55A>G / 55A>G (Ki/Ki) BM cells were transplanted into lethally irradiated WT (CD45.1+) hosts. The resulting mice were analyzed 12 months post-transplantation.

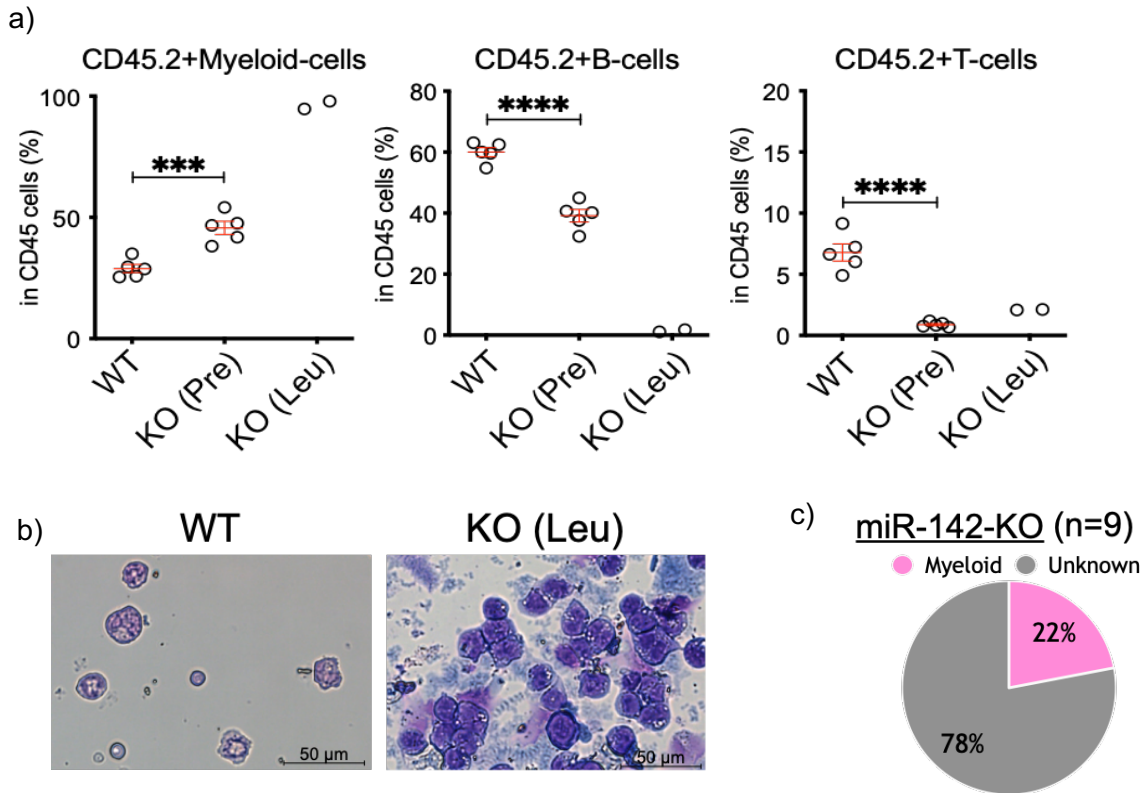
b) Kaplan–Meier analysis of the survival of mice transplanted with WT (black, n = 26), Ki/+ (red, n = 27), or Mir142 Ki/Ki (blue, n = 4). Statistical significance values between WT and other groups were calculated using a log-rank test.

c) Complete blood count (CBC) counts in the peripheral blood (PB) of WT, Ki/+, and Ki/Ki mice (n = 4–27) at 2 months post-transplantation, moribund Ki/+ mice (n = 15), and moribund Ki/Ki mice (n = 2).



第2項, miR-142-KO では未成熟な骨髄系細胞が増殖する個体が存在する

第1項で述べた miR-142 マウスの中で、まずは miR-142-KO マウスの結果を報告する。miR-142 を KO した先行研究では、miR-142 を KO することで白血病発症を誘導しないが骨髄において骨髄芽球に分化が偏り、リンパ球系細胞の減少から免疫不全を発症する報告がある<sup>16, 20</sup>。Flow cytometry 解析により、miR-142-KO (Pre) では骨髄系細胞が増加しリンパ球系細胞が減少することが判明した。このことから先行研究と同じくリンパ球系細胞が増殖せず、免疫不全を発症する表現型であることが予想される。白血球数が異常増加した9匹中2匹の KO (Leu) ではより骨髄系細胞へ偏っていた (Figure 13a)。骨髄をサイトスピンドで分取し、染色を行ったところ未成熟な芽球細胞がみられたことから、miR-142-KO (Leu) に関しては AML が発症している可能性が示唆された (Figure 13b)。しかしながら今回の白血球数の異常増殖を白血病の条件にした場合は9匹中2匹であり (Figure 13c)、再現性が低いため、今後の更なる追加実験が必要となる。



**Figure 13. Phenotype of miR-142-KO**

- Proportion of CD45.2+ cells in myeloid cells, B-cells, and CD4+/CD8+ T-cells in the peripheral blood. Hematopoietic differentiation is biased toward Myeloid cells in KO (Leu).
- Cytopsin preparation of the bone marrow from Ki/+ (Leu) mice, observed using May-Grünwald-Giemsa staining.
- Disease types of hematologic malignancies identified in miR-142-KO mice (n = 9). Data are combined from two independent experiments.

第3項. miR-142-55A>G では Killer (CD8+) T 細胞性白血病が発症する  
 本研究で着目した、AML の患者でみつかった miR-142 の一塩基変異は全てヘテロ接合状態であることから、以降の報告では Ki/+ の実験結果を本論文に示す。Flow cytometry 解析により、Ki/+ (Pre) では血球分化に大きな表現型はないが、Ki/+ (Leu) では WT と比較して T 細胞が異常に増加し、それに伴い骨髄系細胞、B 細胞が減少していた (Figure 14a)。Ki/+ (Leu) は骨髄においても未成熟な T 細胞が増加していることが確認でき (Figure 14b)、脾臓においても同様の結果がみられたことから (Figure 14c)、Ki/+ (Leu) では未成熟な T 細胞性の白血病を発症することが予想された。また、T 細胞の成熟器官である胸腺を比較したところ、Ki/+ (Leu) では胸腺の重量が増加し肥大化しており (Figure 14d)、flow cytometry 解析により CD8<sup>+</sup>T 細胞に分化の偏りがみられる個体が多く存在することが明らかになった (Figure 14e, 14f)。

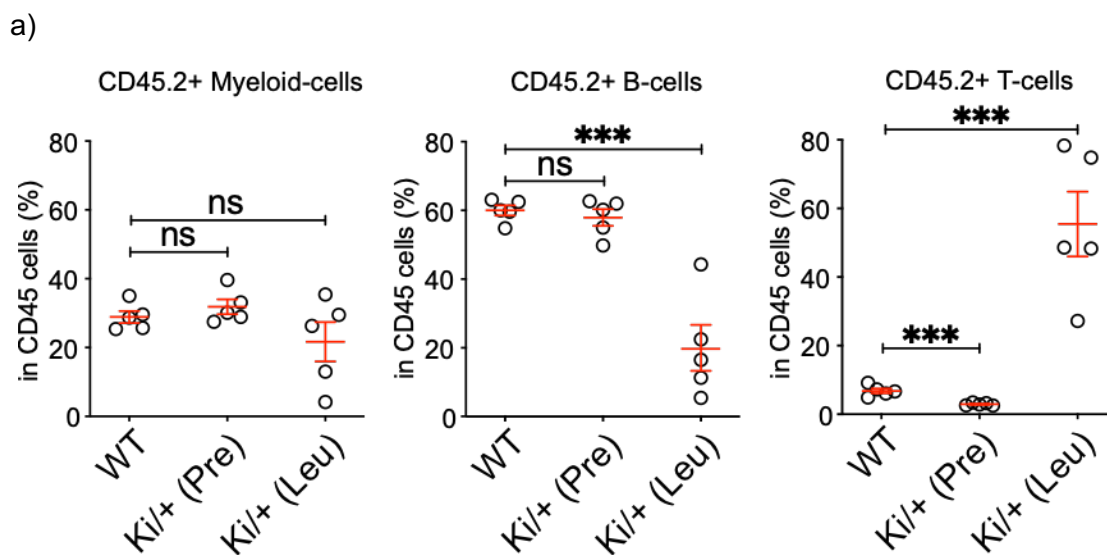
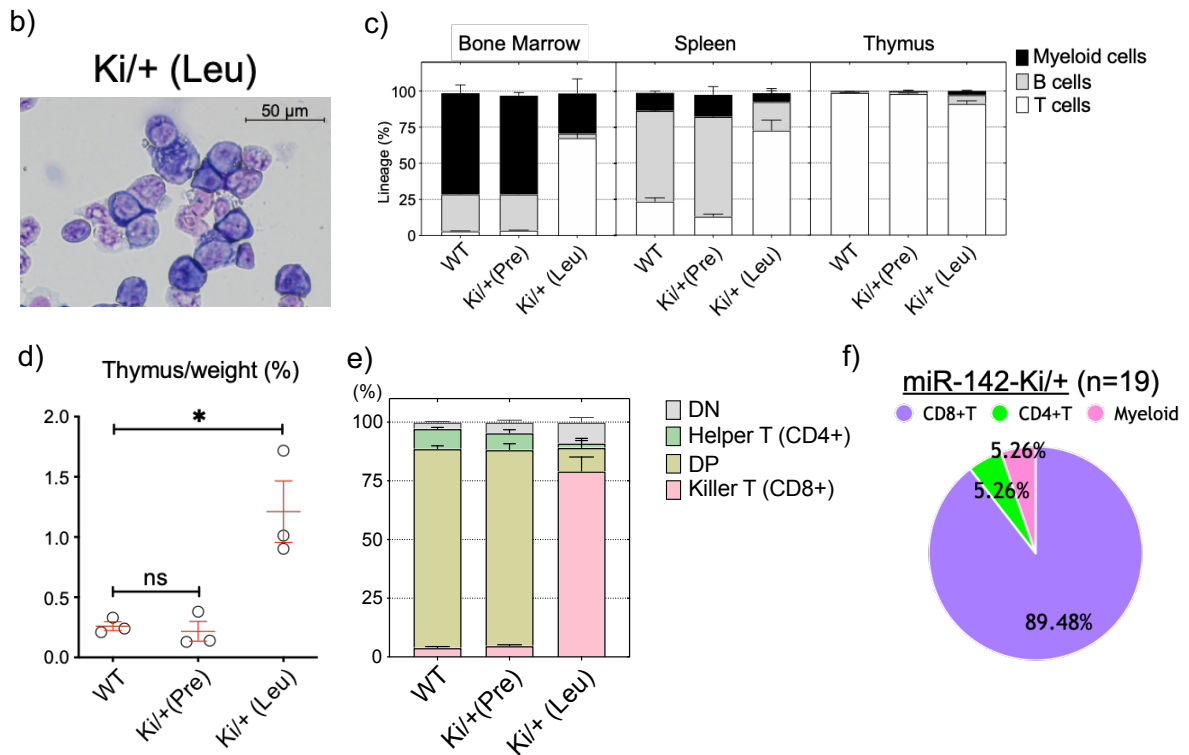


Figure 14. Phenotype of miR-142-Ki/+

(Continue to the next page)



**Figure 14. Phenotype of miR-142-Ki/+**

- a) Proportion of CD45.2+ cells in myeloid cells, B-cells, and CD4+/CD8+ T-cells in the PB. Hematopoietic differentiation is biased toward T cells in Ki/+ (Leu)
- b) Cytospin preparation of the bone marrow from Ki/+ (Leu) mice, observed using May-Grünwald–Giemsa staining.
- c) Myeloid-, B-, and T-cell proportions from the FACS sorted BM, thymus, and spleen. Pooled data shown from 3–5 independent experiments (WT: n=3, Ki/+ (Pre): n=3, Ki/+ (Leu): n=5).
- d) Relative thymus weight of the WT, Ki/+ (Pre), (n = 3) mice 2 months after transplantation, and of the moribund primary transplantation Ki/+ (Leu) (n = 3) mice at the time of sacrifice.
- e) Percentage of CD4+ as helper T-cells and CD8+ as killer T-cells, respectively, among the thymus of WT, Ki/+ (Pre) mice (n = 3) 2 months after transplantation and moribund Ki/+ (Leu) mice (n = 4) at the time of sacrifice. Data are shown as the mean ± SEM.
- f) Disease types of hematologic malignancies identified in miR-142-Ki/+ mice (n = 19). Data are combined from four independent experiments.

### 第3節. miR-142-55A>G/+の白血病化の証明実験

第1項. 2次移植実験によって持続的な細胞増殖をする

第2節では、骨髄移植実験の結果、miR-142-55A>Gヘテロ接合体のレシピエントマウスでT細胞性白血病を発症していたことから、Ki/+ (Leu)マウスの骨髄を分取し他のレシピエントマウスに再度移植する2次移植実験を行い、白血病細胞の自己複製能を評価した (Figure 15a)。2匹のマウスから5匹ずつに2次移植実験を行い、全てのマウスが移植後2ヶ月程で死亡した (Figure 15b)。Flow cytometry解析により2次移植マウスでは一次移植マウスと比較して、T細胞性白血病細胞へ血球分化が偏ることが観察された (Figure 15c)。2次移植マウスでは胸腺の重量は増加せず、脾臓や肝臓の重量は一次移植の時より著しく増加していた (Figure 15d-f)。組織学的な解析の結果、二次移植マウスでは非リンパ器官においても白血病細胞が大きく浸潤していることがわかった (Figure 15g, 15h)。以上の結果から、miR-142-55A>Gによる白血病細胞は持続した自己増殖能により2次移植した先でも自己複製を繰り返すことが証明された。

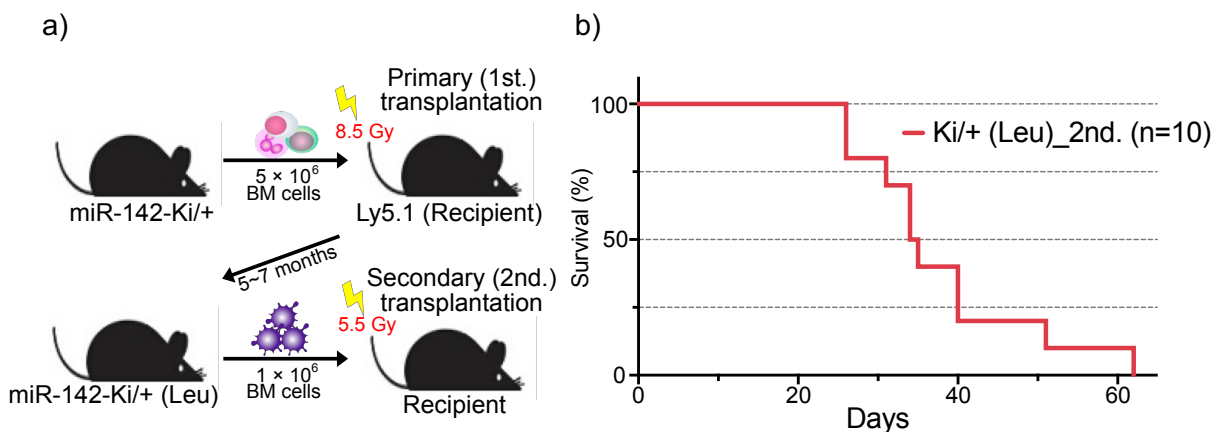
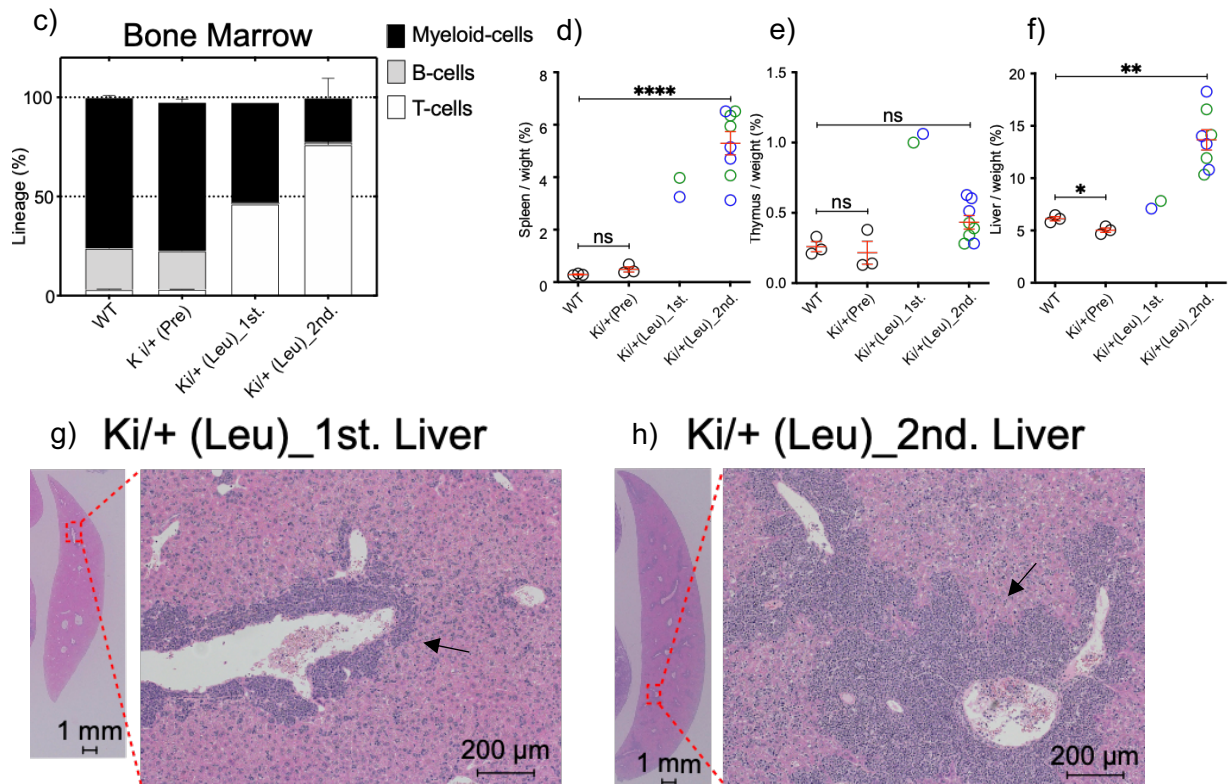


Figure 15. Secondary transplantation by miR-142-55A>G

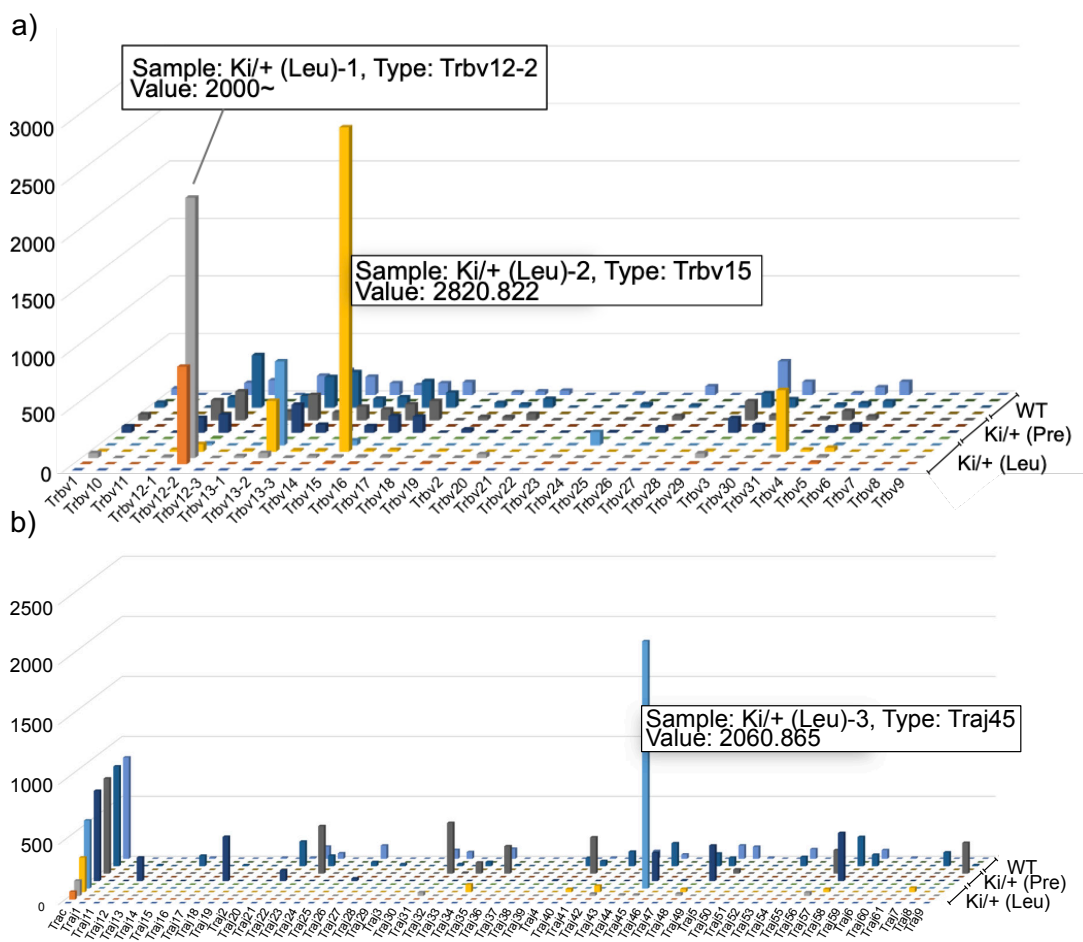
(Continue to the next page)



**Figure 15. Secondary transplantation by miR-142-55A>G**

- a) Diagram of the 2nd bone marrow (BM) transplantation. Ki/+ (Leu) (CD45.2+) BM cells were transplanted into anti-fractionally lethally irradiated Ly5.1 (CD45.1+) hosts. The resulting mice were analyzed 1–2 months post-transplantation.
- b) Kaplan–Meier analysis of the survival of 2nd transplantation mice transplanted with Ki/+ (Leu) transplantation (red, n = 10).
- c) Myeloid-, B-, and T-cell proportions from the FACS sorted cells in the BM of WT and Ki/+ (Pre) mice (n = 3) 2 months after transplantation, moribund primary transplantation Ki/+ (Leu) (1st., n = 2) mice, and moribund secondary transplantation Ki/+ (Leu) (2nd., n = 4) mice at the time of sacrifice.
- d-f) Relative weight of the spleen, thymus, and liver of +/+, Ki/+ (Pre) mice (n = 3) 2 months after transplantation, moribund primary transplantation Ki/+ (Leu) (1st., n = 2) mice, and moribund secondary transplantation Ki/+ (Leu) (2nd., n = 8) mice at the time of sacrifice.
- g, h) Histologic features of the liver with leukemia infiltration in the primary (g) or secondary (h) transplants.

第2項. miR-142-55A>G/+ (Leu)マウスの T 細胞はクロナリティ増殖する miR-142-55A>G による白血病化の更なる評価のため、TCR レパトア解析を行った。TCR レパトア解析では T 細胞受容体 (TCR) の構成成分である各遺伝子群の発現状況を比較できる。miR-142-Ki/+ (Leu) の造血幹前駆細胞である HSPC と白血病化 T 細胞を分取し WT, Ki/± (Pre) と共に解析を行ったところ、得られた 3 匹の Ki/+ (Leu) 全てが TCR の構成遺伝子が単一的に増殖していることがわかった (Figure 16a, b)。以上の結果から、miR-142-55A>G Ki/+マウスでは白血病化していることが証明された。



**Figure 16. TCR Repertoire analysis of miR-142-55A>G**

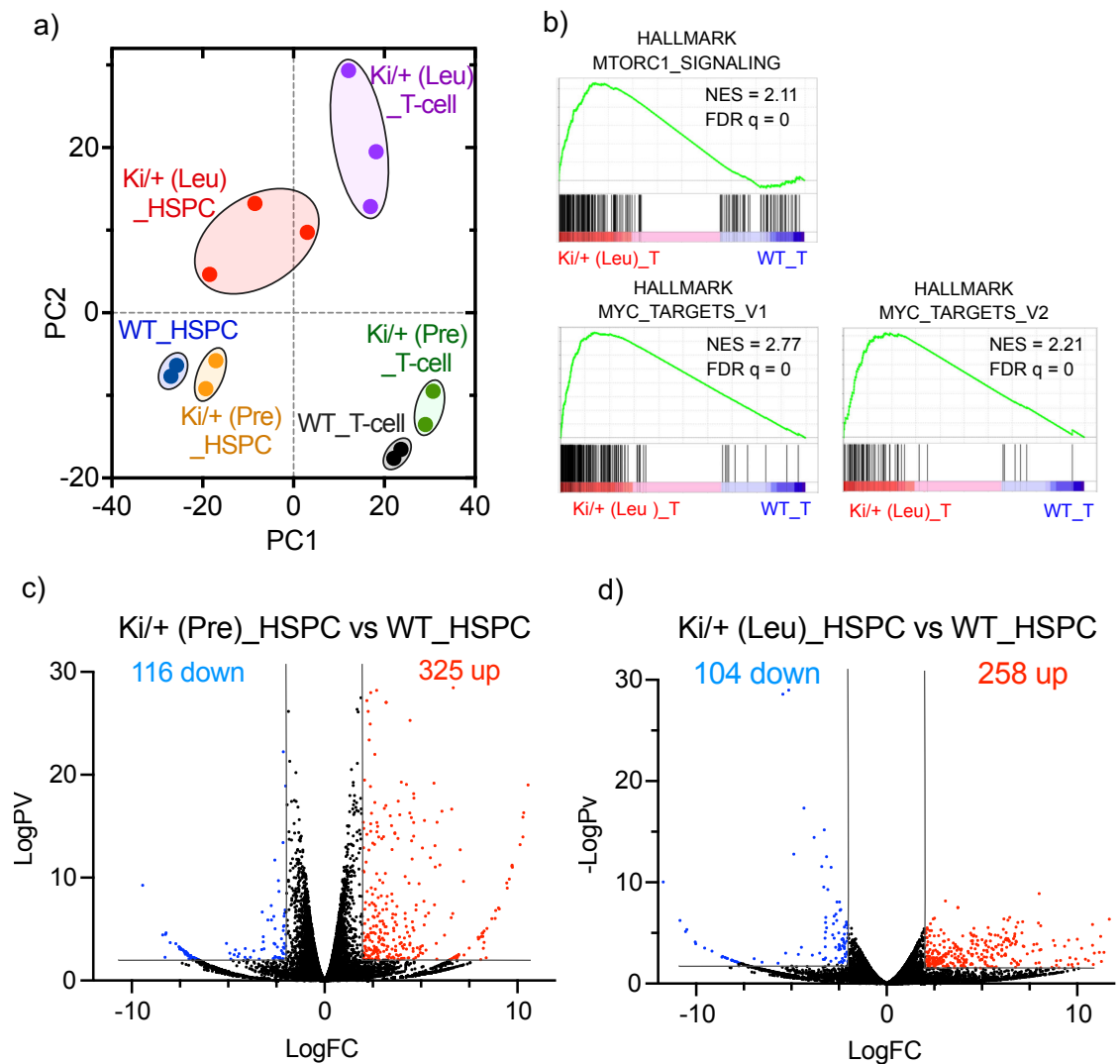
a, b) Skyscraper plots showing Vβ/Vα and matching Jβ/Jα in WT (n = 2), Ki/+ (Pre) (n = 2), and Ki/+ (Leu) (n = 3).

#### 第4節. RNA sequence 解析による miR-142-55A>G 白血病化の網羅的な解析

第1項. miR-142-55A>G/+ (Leu) では Myc, mTORC1 と関連して細胞が増殖する

第3節では、miR-142-55A>G Ki によって白血病化することが証明された。次に、miR-142 の変異体がどのようにして白血病化を誘導するのかを明らかにするため、WT (n=2) と白血病発症前の移植後 2 ヶ月目の Ki/+ (Pre) (n=2), WBC が異常増加し白血病化がみられた Ki/+ (Leu) (n=3) から HSPC と CD8+T 細胞 (T-cell) について RNA-sequencing を行った。主成分分析 (PCA) により WT と Ki/+ (Pre) マウスの HSPC, T-cell は共に近い位置に存在していたが、Ki/+ (Leu) の HSPC, T-cell は WT, Ki/+ (Pre) とはかけ離れた位置に存在していた (Figure 17a)。この結果から、白血病が発症したことにより様々な遺伝子の転写が変化したことが考えられる。GSEA を行った結果 Ki/+ (Leu) の白血病化した T-cell では WT の T-cell と比較して Myc や mTORC1 経路等のがん増殖と関わる遺伝子が多く濃縮されていることが明らかになった (Figure 14b)。得られたサンプルで二群間の有意差検定を行ったところ、Ki/+ (Pre), Ki/+ (Leu) の HSPC と Ki/+ (Pre), Ki/+ (Leu) の T-cell でそれぞれ 325、258、35、468 個のアップレギュレーション遺伝子と 115、104、167、377 個のダウンレギュレーション遺伝子を同定した (Figure 17c, d, 18a, b)。





**Figure 17. RNA-sequence analysis of miR-142-55A>G**

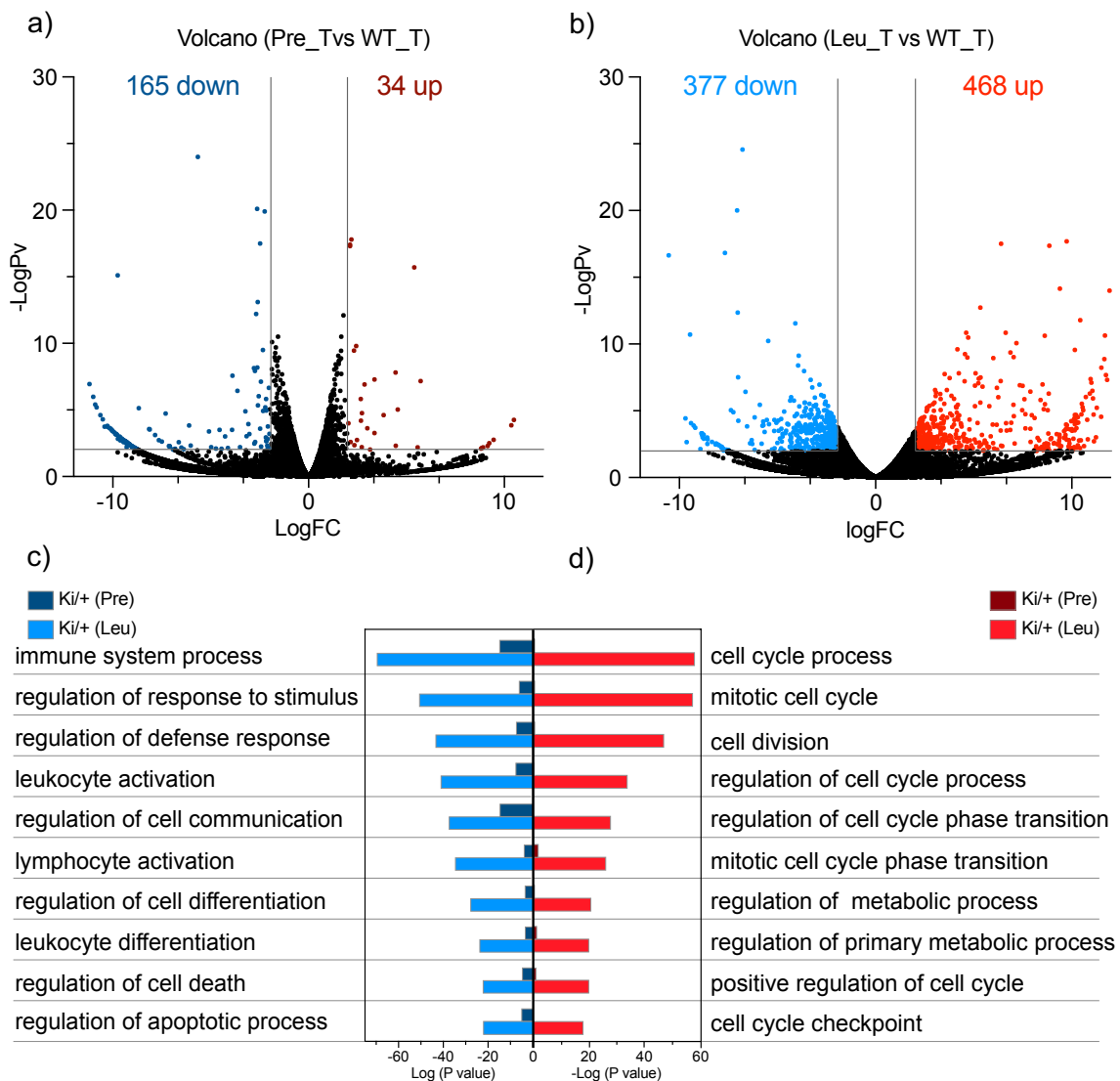
a) Principal component analysis based on the gene expression of HSPCs and T-cells isolated from WT (n = 2), Ki/+ (Pre) (n = 2), and Ki/+ (Leu) (n = 3) mice.

b) GSEA for Myc hallmark genes, and mTORC1 hallmark pathway genes in the Ki/+ (Leu)\_T-cells.

c, d) Volcano plot showing differentially expressed genes (DEGs) in Ki/+ (Pre)\_HSPCs versus WT\_HSPCs (c) and Ki/+ (Leu)\_HSPCs versus WT\_HSPCs (d)

第2項. miR-142-55A>G/+ (Leu) は T 細胞としての機能を失い、自己増殖能が上昇する

第1項で確認された二郡間の有意差検定の結果、Ki/+ (Pre) マウスの T-cell は WT マウスと比べて発現が上昇した遺伝子群よりも下降した遺伝子群の方が多ことがわかった。また白血病化した Ki/+ (Leu) マウスの T-cell では発現が上昇した遺伝子も下降した遺伝子も多く存在していた。実際に、遺伝子オントロジー (GO) 解析の結果、白血病化した T-cell で発現が上昇した遺伝子群は細胞周期や代謝プロセスと関わる GO タームが頻繁に濃縮されていた (Figure 18c) これらは Ki/+ (Pre) マウスの T-cell では有意差がほぼみられないことから、Ki/+ (Leu) の T-cell で発現が上昇した遺伝子群は白血病化が原因で上昇したことが考えられる。一方で Ki/+ (Leu) の T-cell の両方で発現が低下した遺伝子群は、白血球の分化や正常な T 細胞としての免疫機能に関わる GO タームが濃縮されていた (Figure 18d)。これらのタームは Ki/+ (Pre) の T-cell でも有意差がみられたものもあることから、Ki/+ マウスでは白血病化する前の段階から T 細胞の機能やアポトーシスが抑制されていることが考えられた。以上の結果から、miR-142-55A>G Ki マウスでは T 細胞としての分化と関わる転写プログラムが抑制され、白血病化した際に白血病細胞の増殖を促進する遺伝子群の発現が活性化することが示唆された。



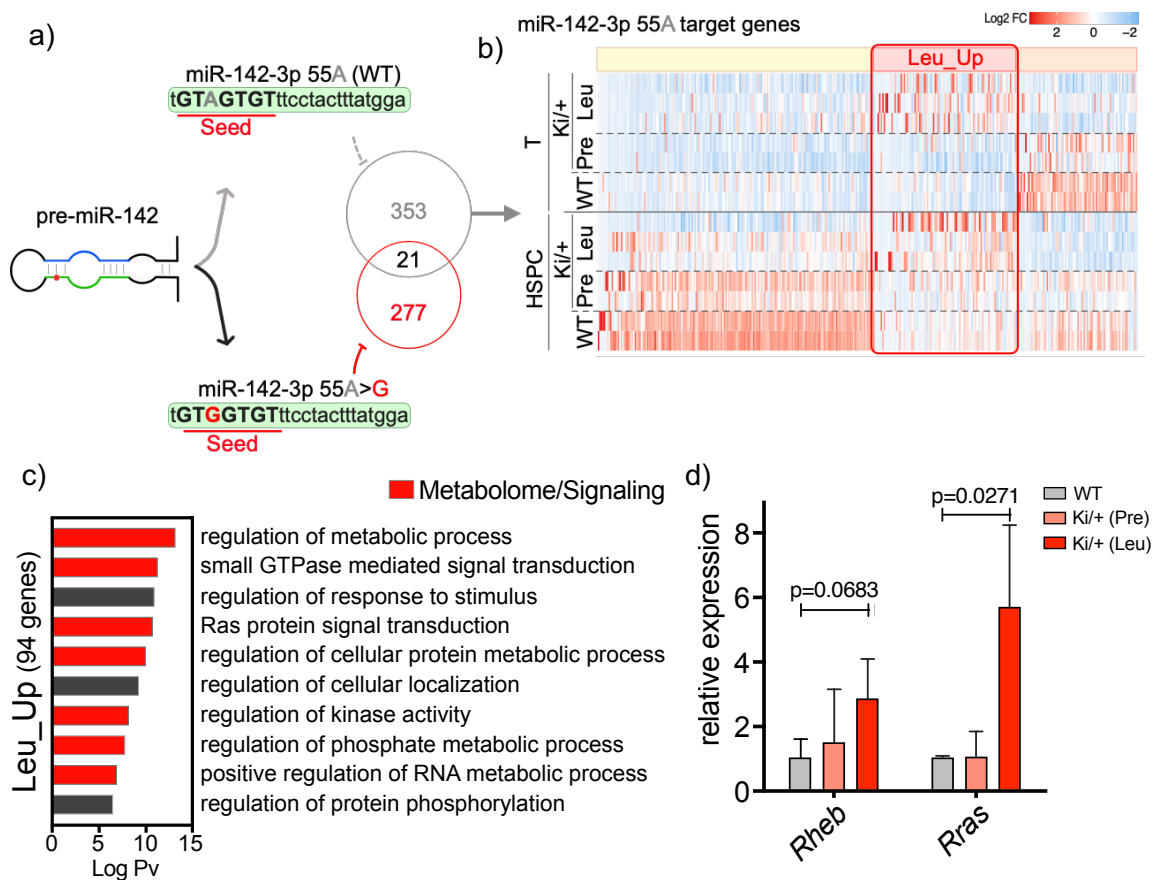
**Figure 18. Assessment of genes with altered expression in miR-142-55A>G/+ (Leu).**

a, b) Volcano plot showing differentially expressed genes (DEGs) in Ki/+ (Pre)\_T-cells versus the WT\_T-cells and Ki/+ (Leu)\_T-cells versus the WT\_T-cells ( $P < 0.05$  colored dots, WT  $n = 2$ , Ki/+ (Pre)  $n = 2$ , Ki/+ (Leu)  $n = 3$ ).

c, d) GO analysis of the up- and down-regulated genes in Ki/+ (Leu)\_T-cells detected in (a).

第5節. miR-142-55A>G 変異は機能損失と機能獲得の両方により白血病が発症する

第1項. miR-142-55A (WT) の標的遺伝子の抑制が緩和され発現が上昇する  
ここまでの節で、miR-142-55A>G 変異による T 細胞性白血病化について論じてきた。次に、miR-142 の一塩基変異が miRNA としての機能にどのように関与するのか、そして白血病細胞においてどのようにして直接的に制御しているのかを明らかにするため、miRDB というオンラインデータベースを用いて miRNA の標的遺伝子を予測した<sup>25, 26</sup>。miR-142-55A>G の予測された標的遺伝子である 298 個は miR-142-WT の予測された標的遺伝子 374 個とは大きく異なっていた (Figure 19a)。まずは miR-142-3p (WT) の標的遺伝子 374 個について発現量を各 WT, Ki/+ (Pre), Ki/+ (Leu) の HSPC, T-cell で比較したところ、多くの遺伝子が HSPC 上で高発現していたが、興味深いことに白血病発症後の miR-142-3p 55A>G/+ では HSPC, T-cell 上で共に同じ遺伝子が発現上昇していた (Figure 19b)。発現が上昇していた遺伝子群は Table 7. に示す。それらの遺伝子群の GO 解析の結果から、代謝のプロセスや低分子 GTPase シグナル等のシグナル伝達と関わる GO タームが濃縮されており (Figure 19c)、白血病化した miR-142-55A>G Ki/+ マウスは野生型 miR-142-3p の標的遺伝子抑制の機能を失い、標的遺伝子として予測された *Rheb* や *Rras* などの遺伝子の転写活性化や mTORC1 のような細胞増殖シグナル伝達を活性化させるような遺伝子の発現が増加していることがわかった (Figure 19d)<sup>27-30</sup>。実際に qRT-PCR を行ったところ、WT の HSPC と比較して Ki/+(Leu) HSPC では *Rheb* や *Rras* の発現レベルが増加したことが確認された (Figure 19d)。



**Figure 19. Variation in expression of target genes in WT miR-142-3p**

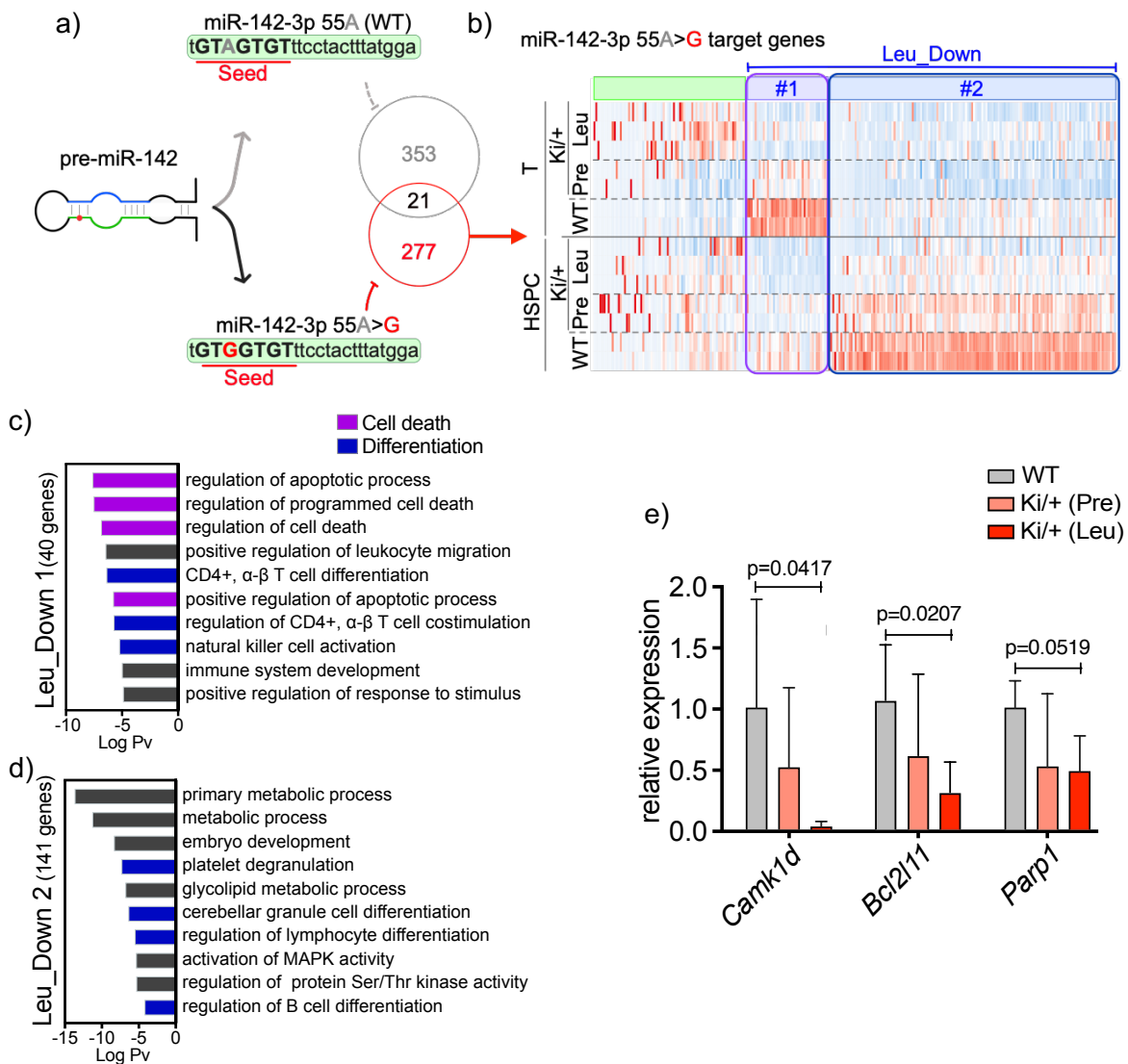
- a) Diagram showing the variation in target genes due to single nucleotide mutations in miR-142-seeded sequences.
- b) Heatmap showing expression changes of the representative genes with predicted miR-142-55A target sites. Red boxes in (b) show up-regulated genes in Ki/+ (Leu)\_HSPCs and T-cells,
- c) GO analysis of the up-regulated genes in the Ki/+ (Leu)\_ HSPCs and T-cells detected in the red square in (b).
- d) Expression levels of the representative genes in mTORC1 activators.

| miR-142-3p 55A (WT) target genes,<br>Leu_Up |             |              |               |
|---|-------------|--------------|---------------|
| Target Score                                | Gene Symbol | Target Score | Gene Symbol   |
| 99  | Egfl6       | 78           | Spns1         |
| 98  | Rab2a       | 77           | Amotl1        |
| 96  | Kif5b       | 77           | Prlr          |
| 96  | Rab12       | 77           | Snx16         |
| 95  | Rab23       | 76           | Trpc3         |
| 95  | Kdelr2      | 75           | Aff2          |
| 95  | Bod1        | 75           | Tead1         |
| 94  | Rac1        | 74           | Clta          |
| 94  | Fmn1        | 74           | Xkr6          |
| 93  | Tgfr1       | 74           | Dbx2          |
| 92  | Tardbp      | 74           | Sh3glb1       |
| 91  | Tor1aip2    | 74           | Tfpi          |
| 90  | Hgs         | 73           | A630001G21Rik |
| 89  | Rras        | 73           | Dusp16        |
| 89  | Fabp4       | 72           | Dcun1d4       |
| 88  | Stx12       | 71           | Gnb2          |
| 87  | Elovl4      | 71           | Atp8b1        |
| 87  | Epn1        | 71           | Cdc25c        |
| 87  | Cask        | 70           | Fam222a       |
| 86  | Nr3c1       | 69           | Mospd1        |
| 86  | Morf4l2     | 69           | Rbx1          |
| 86  | Rheb        | 69           | Gfi1          |
| 85  | D1Pas1      | 69           | Mob4          |
| 85  | Sptssb      | 68           | Serpib2       |
| 85  | Baz1a       | 68           | Pafah1b2      |
| 85  | Slc35f6     | 68           | Zdhhc12       |
| 84  | Dnah11      | 67           | Eny2          |
| 84  | Cd2ap       | 67           | Mtus1         |
| 83  | Myh10       | 66           | Patz1         |
| 83  | Tsen34      | 66           | Cxadr         |
| 82  | Rbm47       | 65           | 1110059E24Rik |
| 80  | Slc1a3      |              |               |
| 80  | Arhgap42    |              |               |
|   |             | 65           | Rag1          |
|   |             | 65           | Nampt         |
|   |             | 64           | Sowahc        |
|   |             | 64           | Gnb1l         |
|   |             | 63           | Xpo1          |
|   |             | 63           | Rab11a        |
|   |             | 61           | Mttr11        |
|   |             | 60           | Edaradd       |
|   |             | 60           | Hectd2        |
|   |             | 59           | Atf2          |
|   |             | 59           | Npsr1         |
|   |             | 59           | Ddr2          |
|   |             | 58           | 4930452B06Rik |
|   |             | 58           | Pik3r6        |
|   |             | 58           | Hip1          |
|   |             | 57           | Wnk2          |
|   |             | 57           | Rab39         |
|   |             | 56           | Dcakd         |
|   |             | 56           | Ifih1         |
|   |             | 56           | Zfp365        |
|   |             | 56           | Psip1         |
|   |             | 55           | Onecut2       |
|   |             | 54           | Trp53inp2     |
|   |             | 53           | Gbp3          |
|   |             | 53           | Rbfox3        |
|   |             | 53           | Zfp708        |
|   |             | 52           | Nucks1        |
|   |             | 51           | Ncl           |
|   |             | 50           | Cnep1r1       |
|   |             | 50           | Hmgb1         |

Table 7. miR-142-55A (WT) target genes upregulated in leukemic mice

## 第2項. miR-142-55A>Gにより新たな標的遺伝子が抑制され mTORC1 が活性化

次に、miR-142-55A>Gにより新しく予測された標的遺伝子を比較したところ (Figure 20a)、WT マウスの HSPC や T-cell で高発現していた遺伝子群が Ki/+ (Leu) マウスの HSPC や T-cell で発現が減少し、2つのクラスターを形成することが確認された (Figure 20b)。発現が減少していた遺伝子群は Table 8. に示す。これらの遺伝子群は白血病発症前の Ki/+ (Pre) から Ki/+ (Leu) になるにつれて順々に発現が低下されていた。GO 解析の結果、クラスター#1はおもに Ki/+ T-cell で発現が低下しており、アポトーシスや T 細胞としての分化や機能を多く含むことが明らかになった (Figure 20c)。一方、クラスター#2の遺伝子は主に Ki/+ HSPC で発現が低下しており血球の分化や代謝プロセスと多く関わる事が判明した (Figure 20d)。miR-142 に変異が入ることによって、Akt-mTOR 経路を阻害する遺伝子として挙げられる *Camk1d* や *Bcl2l11*, *Parp1* が直接阻害し、血球分化やアポトーシスの誘導が起こらず T 細胞性の白血病発症を誘導することが示唆された<sup>31-35</sup>(Figure 20e, f)。qRT-PCR の結果より、WT HSPC と比較して Ki/+ (Leu) ではこれらの遺伝子群が減少傾向にあることが確認された (Figure 20g)。従って、miR-142-3p 55A>G 変異が入ることで、元々の miR-142-3p の標的遺伝子は抑制が緩和される機能損失と、seed 配列が変わったことにより新たに獲得した標的遺伝子を抑制する機能獲得の2つの現象が相乗的に働き、白血病を発症させるようにみられた。



**Figure 20. Variation in expression of target genes in miR-142-3p-55A>G**

- a) Diagram showing the variation in target genes due to single nucleotide mutations in miR-142-seeded sequences.
- b.) Heatmap showing expression changes of the representative genes with predicted miR-142-55A>G target sites. purple boxes in (b) show gradually down-regulated genes in HSPCs and T-cells of Ki/+ (Pre) and Ki/+ (Leu), and indigo blue boxes in (b) show gradually down-regulated genes, especially in HSPCs of Ki/+ (Pre) and Ki/+ (Leu).
- c, d) GO analysis of the down-regulated genes in the Ki/+ (Leu)\_ HSPCs and T-cells; (c) detected in purple squares in (b), and Ki/+ (Leu)\_HSPCs (d) detected in indigo blue squares in (b).
- e) Expression levels of the representative genes in Akt-mTOR inhibitors mRNA in HSPCs (n = 3–4).



| miR-142-3p 55A>G target genes,<br>Leu_Down #1 |             |              |             |
|---|-------------|--------------|-------------|
| Target Score                                  | Gene Symbol | Target Score | Gene Symbol |
| 93  | 6-Sep       | 62           | Il2rb       |
| 90  | Polk        | 62           | Kctd18      |
| 86  | Hnrnpul2    | 61           | Dhrs9       |
| 84  | Ncor1       | 60           | Lnx2        |
| 82  | Cd160       | 59           | Bcl2l11     |
| 80  | Zswim6      | 59           | Entpd6      |
| 80  | Napepld     | 58           | Gimap8      |
| 78  | Mctp2       | 57           | Slc16a6     |
| 77  | Sntb1       | 56           | Cyp2s1      |
| 75  | Foxk1       | 55           | Lcn2        |
| 72  | Pitpnm1     | 55           | Sh2d2a      |
| 72  | Epb4.1      | 54           | Aak1        |
| 71  | Tcf20       | 54           | Stk4        |
| 71  | Creb3       | 52           | Clcf1       |
| 69  | Camsap2     | 52           | Itga4       |
| 66  | Dnajb7      | 52           | Gpatch11    |
| 65  | Afmid       | 51           | Zfp318      |
| 64  | Kmt2c       | 50           | Cep162      |
| 63  | Il18r1      | 50           | Sbk3        |
| 63  | Unc5a       | 50           | Camk1d      |

| miR-142-3p 55A>G target genes,<br>Leu_Down #2 |               |              |             |              |             |              |             |    |        |
|---|---------------|--------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|----|--------|
| Target Score                                  | Gene Symbol   | Target Score | Gene Symbol | Target Score | Gene Symbol | Target Score | Gene Symbol |    |        |
| 97  | Tmem47        | 77           | Pice1       | 66           | Canx        | 59           | Pigv        | 53 | Srprb  |
| 97  | Tanc2         | 77           | Pdk1        | 66           | Vasn        | 58           | Rprd1b      | 53 | Dusp3  |
| 95  | Proser3       | 76           | Lpp         | 65           | Nfix        | 58           | Mbnl2       | 53 | Shb    |
| 94  | Mlxip         | 76           | Triobp      | 65           | Nfkbia      | 58           | Fam149b     | 53 | Trmt2a |
| 90  | Rscan18       | 75           | Brd3        | 65           | Igln5       | 58           | Rin3        | 53 | Opa1   |
| 90  | Carns1        | 75           | Hnrnpf      | 65           | Zfp386      | 58           | Fbxo34      | 52 | Zmiz1  |
| 89  | 1110051M20Rik | 75           | Tecpr2      | 64           | Rffl        | 58           | Usp6nl      | 52 | Mfge8  |
| 88  | Drg1          | 74           | Setd1a      | 64           | Fam210a     | 57           | Zfp146      | 52 | Mfap3  |
| 88  | Prepl         | 73           | Zfp523      | 63           | Ppp1r2      | 57           | Aptx        | 52 | Luzp2  |
| 88  | Rock2         | 73           | Plek        | 63           | Synpo2      | 57           | Col17a1     | 51 | Sesn2  |
| 88  | Loxl3         | 73           | Acot2       | 63           | Thsd4       | 56           | Slc8a1      | 51 | Gnptab |
| 86  | Dcun1d1       | 73           | Bace1       | 62           | Hoxa10      | 56           | Map3k12     | 51 | Scd3   |
| 84  | Mcmbp         | 73           | Grin3a      | 62           | Pdzd8       | 56           | Pcyt1b      | 50 | Ccl28  |
| 84  | Tshz3         | 71           | Ptgr2       | 61           | Edc4        | 56           | Slx1b       | 50 | Ggcx   |
| 83  | Phf3          | 70           | Parp1       | 61           | Ece1        | 56           | Brwd3       |    |        |
| 83  | Tbc1d19       | 70           | Trim44      | 61           | Usp15       | 56           | Heatr5a     |    |        |
| 82  | Spata2        | 70           | Lmbr1       | 61           | Nxpe5       | 55           | Tmtc1       |    |        |
| 81  | Atp5s         | 70           | St8sia2     | 61           | Gtf3c4      | 55           | Atp11a      |    |        |
| 81  | Igdcc4        | 70           | Ears2       | 61           | Qk          | 55           | Vash2       |    |        |
| 81  | Dzip3         | 69           | Pex11b      | 61           | Mcur1       | 55           | Zfp36l2     |    |        |
| 80  | Fam32a        | 69           | Ino80d      | 60           | Zfp442      | 54           | Sh3rf2      |    |        |
| 80  | Spred1        | 69           | Rgs8        | 60           | Coro2b      | 54           | Atl3        |    |        |
| 80  | Kpnb1         | 69           | Ophn1       | 60           | Elov16      | 54           | Trim33      |    |        |
| 79  | Nufip2        | 68           | Zfp870      | 60           | Pign        | 54           | Vsnl1       |    |        |
| 79  | Hlf           | 68           | Slc43a2     | 60           | Sufu        | 54           | Rabgap1     |    |        |
| 79  | 9130023H24Rik | 68           | Kctd1       | 60           | Rad51d      | 54           | Fbxo21      |    |        |
| 78  | Ireb2         | 68           | Ptges       | 59           | Tkbp1       | 54           | Erg         |    |        |
| 78  | Kcnq5         | 68           | Syk         | 59           | Vamp5       | 54           | St6galnac3  |    |        |
| 78  | Cfc1          | 67           | Nceh1       | 59           | Cul4b       | 54           | Sox6        |    |        |
| 77  | Man1c1        | 67           | Fam196b     | 59           | Cerk        | 54           | Myo5c       |    |        |
|   |               | 66           | Spag9       | 59           | P4ha1       | 53           | Arhgef17    |    |        |
|   |               | 66           | Nup98       | 59           | Xpo7        | 53           | Ttc28       |    |        |

Table 8. miR-142-55A>G target gene down-regulated in leukemic mice. Cluster #1(top table) and cluster #2 (bottom table)

## 第4章. 考察

### 第1節. miR-142-55A>G 変異による白血病化について

序章で述べたように、miR-142 の一塩基変異は AML, MDS を含む様々な白血病患者において多く発見されている<sup>10,11,50</sup>。miR-142 は血球細胞に多く、特に T 細胞の機能や分化においてその役割を果たしている<sup>15-18</sup>。miR-142 の変異体については機能損失型変異として扱われており、miR-142 のノックアウトマウスでは骨髄系の芽球に分化が偏るが悪性腫瘍とはならず、血球細胞が産生されないことから免疫不全を発症すると報告があった<sup>20</sup>。しかしながら、近年の研究による miR-142 の変異体の評価は全て培養細胞系における in Vitro であり in Vivo による解析は行われていない<sup>19</sup>。

我々は CRISPR-Cas9 によるゲノム編集を二段階で行うことで、miR-142-KO マウスと、患者で最も頻繁にみられた miR-142-55A>G 変異マウスを獲得した。その表現型解析から、miR-142-KO のホモ接合体、ヘテロ接合体と比べて miR-142-55A>G ホモ接合体、ヘテロ接合体の方が低い生存率であることが観察された。miR-142-55A>G 変異によって機能を獲得することで、miR-142 が損失した際より表現型が大きいことが考えられる。miR-142-55A>G マウスの生後 150 日目の解析から、ホモ接合体に異常がみられ、ヘテロ接合体においても T 細胞の血球分化に影響を与えていることが明らかになった。miR-142-55A>G 変異ではヘテロ接合体においても血球細胞に異常をきたす機能を獲得していることが予想される。次に、miR-142-55A>G 変異が与える血球細胞への影響を評価するために骨髄移植実験を行った。その解析から、miR-142-55A>G ヘテロ接合体では骨髄移植後 150 日目以降に CD8<sup>+</sup>T 細胞に血球分化が偏り異常増殖し、各臓器に浸潤することが観察された。異常増殖がみられた T 細胞に対して、二次移植実験、TCR レパトア解析による細胞のがん化の証明実

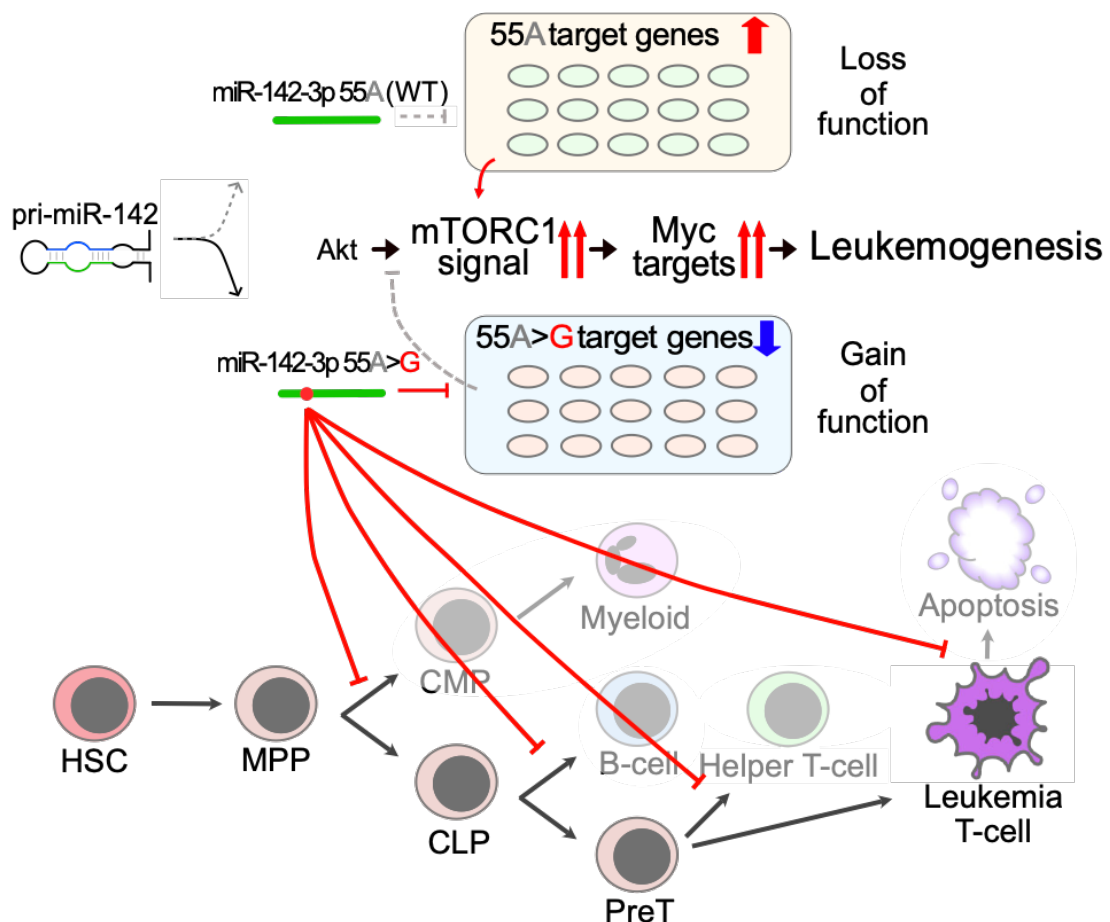
験を行った。二次移植実験とは、白血病細胞  $10^6$  個を一次移植時の半分量の放射線を当てたレシピエントマウスに再度移植することで二次移植したマウスにおいても白血病細胞でみられる無限増殖能を有するのかを評価する実験である。二次移植実験の結果より、白血病化 T 細胞は二次移植先でも自己増殖能を有し、非リンパ器官にまで白血病細胞が浸潤していることが確認された。TCR レパートア解析とは、T 細胞受容体 (TCR) の構成に用いられる遺伝子サブタイプを同定することができる解析である。T 細胞の TCR 遺伝子は各複数個存在する V (64-67 個), D, J (14 個) の遺伝子断片から構築され、各抗原に合わせてそれら遺伝子が再構成することで多様性に富んだ免疫能を獲得する。T 細胞性白血病では TCR レパートリーの多様性が喪失されていることがわかっており<sup>36</sup>、今回の白血病性 T 細胞においても同様に TCR 遺伝子が単一的に、そして特異的に増加することがわかった。これらの解析結果により miR-142-55A>G 変異により T 細胞性白血病の発症することが証明された。したがって、miR-142-55A>G 変異では iR-142-KO とは異なり、T 細胞性白血病発症へと誘導する遺伝子と関係していると考えられる。

## 第2節. miR-142-55A>G は機能損失能と機能獲得能の両方を併せ持つ

miR-142-55A>G 変異ではどのようにして白血病発症を誘導するのかを明らかにするため、造血幹前駆細胞である HSPC と今回着目した CD8<sup>+</sup>T 細胞 (T-cell) を RNA-sequence を行ったところ、白血病化した T 細胞では癌細胞の増殖に関与する Myc や mTORC1 経路と関連する遺伝子群の発現が上昇することで、細胞の増殖や代謝過程が大きく進行していることが確認された。mTOR 複合体と Myc との関係性は様々な研究で着目されており<sup>37-39</sup>、mTOR の上流に位置する Akt が活性化することが mTOR シグナルの活性化に繋がることが知られている。mTORC1 の活性が白血病の分化や増殖に重要であると示唆している研究機関の報告もある<sup>40-42</sup>。

次に、miR-142-55A>G 変異によりどのような遺伝子を標的とするのかを予測するため、研究者らが入力した配列に合わせて標的遺伝子を予測できる miRDB を用いた。その結果、予測された標的遺伝子は miR-142-3p (WT) と miR-142-3p-55A>G では大きく異なり、HSPC, Tcell 上でそれらの発現量を比較すると WT, 白血病発症前の 55A>G/+, 発症後の 55A>G/+ で大きく変動していた。従って miR-142 の seed 配列に変異が入ることでその標的遺伝子群の発現を変動させていると考えている。まずは miR-142-3p (WT) の標的遺伝子 374 個について発現量を比較したところ、*Rheb*, *Rras* のような mTORC1 の活性化と関与する遺伝子群の発現が上昇していた。今回 miR-142-55A>G 変異が導入されたことで白血病発症後に野生型の miR-142-3p の量が減少し、機能損失することでその標的遺伝子への抑制が緩和され発現が上昇したと考えている。一方で、miR-142-3p-55A>G 変異により新たに予測された標的遺伝子で、WT と比べて白血病発症前の 55A>G/+, 発症後の 55A>G/+ で徐々に発現が低下していた遺伝子はアポトーシス、血球の分化と関わるものが多く、変異型

miR-142-3p によって新しく標的となることで発現が抑制され、アポトーシスの阻害や血球分化が抑制されていたことがわかった。また、mTORC1 の上流にある Akt-mTORC1 経路を阻害する遺伝子である *Camk1d*, *Bcl2l11*, *Parp1* 等の遺伝子群も抑制傾向にあった。定量的 RT-PCR 解析により、miR-142-3p WT, または miR-142-3p 55A>G の標的遺伝子群の発現は白血病発症前の 55A>G/+ から発症後の 55A>G/+ にかけて変動していたことから、miR-142-55A>G 変異を導入することで野生型 miR-142-3p の標的遺伝子の抑制が緩和される機能損失と、miR-142-3p 55A>G による新たな標的遺伝子を抑制する機能獲得の両方により白血病を発症することが示唆された (Figure 17)。



**Figure 17.** The schematic diagram for leukemia pathogenesis mechanism resulting from heterozygous miR-142-55A>G.

今回の研究目的は、AML 患者でみつかった遺伝子変異による影響を評価しており、本結果はマウスにおいて AML ではなく CD8+T 細胞性白血病を発症していることが一つの課題である。AML を含む白血病においては、多段階の遺伝子異常が蓄積することで発症することから、今後は他の遺伝子変異についても着目し、miR-142-55A>G と同時に変異を挿入することを検討している。先に述べた TCGA の論文では、miR-142 に変異を持つ 4 人の患者のうち 3 人は IDH2-R140Q 変異も併せ持っていることが報告された。現在 miR-142-55A>G と IDH2-R140Q の二重変異マウスについても計画を進めており、今後の解析が期待される。

### 第3節. miR-142-KO による病型について

miR-142-55A>G を作製する際に、副産物として miR-142 の前の配列が除去され miR-142-3p, 5p が共に発現しない miR-142-KO マウスを獲得した。その解析により miR-142-KO は他の研究者と同じく血球増殖能が低く、特にリンパ球系が減少する傾向にあることから免疫不全を発症し死亡していることが推測される。しかしながら、本結果から個体によっては骨髄系芽球が異常増殖することもあり、miR-142 が損失した際の表現型については、今後の更なる検討が必要である。

### 第4節. miRNA の標的遺伝子に関して、本研究の限界について

第3章の第5節で記載した様に、今回 miR-142-3p (WT) と miR-142-3p 55A>G の標的となる遺伝子を miRDB というオンライン上のデータベースを用いて予測した。miRDB は培養細胞系によって miRNA を過剰発現させてダウンレギュレーションした転写産物のデータと、miRNA と結合する遺伝子を同定する CLIP-seq のデータを統合して組み立てたデータベースで、さらにサポートベクターマシンの「MirTarget」を掛け合わせたことによって使用者が指定した miRNA の遺伝子配列に合わせた標的遺伝子を予測することが可能である。miRDB を用いることで今回重要だと着目した標的遺伝子を同定し、実際にその発現量を確認することができた。しかしながら、今回の標的遺伝子は全て予測された標的遺伝子であり、実際に野生型の miR142-3p や miR-142-3p 55A>G と標的遺伝子が結合しているかは確定ではない。今までで miRNA が機能獲得型の変異であると報告は一つであるが、そちらでは miRNA の変異体に対し CLIP-seq を行うことで実際に miRNA と結合する標的遺伝子を特定している<sup>47</sup>。今後の研究課題として、実際に miR-142-55A>G と標的となる遺伝子

が結合しているかを明らかにする必要がある。また、mTORC1による白血病発症が誘導されることを今回論じているが、本論文の結果はマウスでの解析結果であるため実際に他の証明実験が必要となる。今後は miR-142-55A>G を培養細胞系において過剰発現させ、標的遺伝子と予測された遺伝子群の発現の確認する必要がある。また細胞系においても白血病化するのか、またラパマイシン等の mTOR 阻害薬を投与することで白血病化を抑制するのかを解析する必要があると考える。



## 第5章. 総括

一つの miRNA は、その seed 配列の並びによって 100 以上の遺伝子の制御に関わっている。本研究では白血病の患者で最も多く検出された miR-142-55A>G 変異の解析から、miRNA の seed 配列の変異が新たな機能を獲得する可能性が示唆された。今回の実験では miR-142-55A>G ヘテロ接合体による表現型を解析したため、予想される全ての miR-142-3p の標的だった遺伝子あるいは新規標的となった遺伝子の発現を変動させたとは言い難い。今後は miR-142-55A>G ホモ接合体による同様な解析をすることで、より明確な分子メカニズムの解明に繋がると考えている。しかし、変異のみ見つかった患者の状態は全てヘテロ接合体であることから今回の知見はヒトにおいても起こりうることを期待し、白血病の原因・病態解明の一案となることを望む。

miRNA の異常発現はがんを含む多くの疾患で観察されている。miRNA の一塩基変異は機能損失型変異であるという報告も多いが<sup>43-46</sup>、ヒトの疾患における機能獲得型変異の報告は、骨系統疾患で認められた miR-140 の seed 配列の一塩基変異があり<sup>47</sup>、最近では癌促進因子の miRNA と結合する領域に変異が入ることで発現の抑制を逃れ、がん発症が促進される報告もある<sup>48,49</sup>。今回の miRNA-142 の一塩基変異によって機能損失、機能獲得の両方による白血病発症という結果ががんの世界における新たな考え方になることを期待し、今後多くの方によって miRNA に関する更なる研究が行われることを祈念する。

## 第 6 章. 参考文献

1. The FANTOM Consortium and the RIKEN Genome Exploration Research Group Phase I & II Team. Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. *Nature* 420, 563–573 (2002).
2. Calin, GA., Liu, CG., Sevignani, C., Ferracin, M., Felli, N., Dumitru, CD., Shimizu, M., Cimmino, A., Zupo, S., Dono, M., et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(32):11755-11760.
3. Voorhoeve, PM., le Sage, C., Schrier, M., Gillis, AJ., Stoop, H., Nagel, R., Liu, YP., van Duijse, J., Drost, J., Griekspoor, A., et al. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell.* 2006 Mar 24;124(6):1169-1181.
4. Markou, A., Tsaroucha, EG., Kaklamanis, L., Fotinou, M., Georgoulas, V., Lianidou, ES. Prognostic value of mature microRNA-21 and microRNA-205 overexpression in non-small cell lung cancer by quantitative real-time RT-PCR. *Clin Chem.* 2008;54(10):1696-1704.
5. Schepeler, T., Reinert, JT., Ostensfeld, MS., Christensen, LL., Silahatoglu, AN., Dyrskjöt, L., Wiuf, C., Sørensen, FJ., Kruhøffer, M., Laurberg, S., et al. Diagnostic and prognostic microRNAs in stage II colon cancer. *Cancer Res.* 2008; 68(15):6416-6424.
6. Lu, L., Katsaros, D., de la Longrais, IA., Sochirca, O., Yu, H. Hypermethylation of let-7a-3 in epithelial ovarian cancer is associated with low insulin-like growth factor-II expression and favorable prognosis. *Cancer Res.* 2007;67(21):10117-10122.
7. Yu, SL., Chen, HY., Chang, GC., Chen, CY., Chen, HW., Singh, S., Cheng, CL., Yu, CJ., Lee, YC., Chen, HS., et al. MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer. *Cancer Cell.* 2008;13(1):48-57.
8. Saito, Y., Liang, G., Egger, G., Friedman, JM., Chuang, JC., Coetzee, GA., Jones, PA. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell.* 2006;9(6):435-443.
9. Lujambio, A., Ropero, S., Ballestar, E., Fraga, MF., Cerrato, C., Setién, F., Casado, S., Suarez-Gauthier, A., Sanchez-Cespedes, M., Git, A., et al.

- Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res.* 2007;67(4):1424-1429.
10. The Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2013;368(22):2059-2074.
  11. Thol, F., Scherr, M., Kirchner, A., Shahswar, R., Battmer, K., Kade, S., Chaturvedi, A., Koenecke, C., Stadler, M., Platzbecker, U., et al. Clinical and functional implications of microRNA mutations in a cohort of 935 patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2015;100(4): e122-124.
  12. Chapnik, E., Rivkin, N., Mildner, A., Beck, G., Pasvolsky, R., Metzler-Raz, E., Birger, Y., Amir, G., Tirosh, I., Porat, Z., et al. miR-142 orchestrates a network of actin cytoskeleton regulators during megakaryopoiesis. *Elife.* 2014;3: e01964.
  13. Rivkin, N., Chapnik, E., Mildner, A., Barshtein, G., Porat, Z., Kartvelishvily, E., Dadosh, T., Birger, Y., Amir, G., Yedgar, S., et al. Erythrocyte survival is controlled by microRNA-142. *Haematologica.* 2017;102(4):676-685.
  14. Rivkin, N., Chapnik, E., Mildner, A., Yona, S., Kim, KW., Aycheck, T., Varol, D., Beck, G., Itzhaki, ZB., Feldmesser, E., et al. Mononuclear phagocyte miRNome analysis identifies miR-142 as critical regulator of murine dendritic cell homeostasis. *Blood.* 2013;121(6):1016-1027.
  15. Sun, Y., Oravec-Wilson, K., Mathewson, N., Wang, Y., McEachin, R., Liu, C., Toubai, T., Wu, J., Rossi, C., Braun, T., et al. Mature T cell responses are controlled by microRNA-142. *J Clin Invest.* 2015;125(7):2825-2840.
  16. Kramer, NJ., Wang, WL., Reyes, EY., Kumar, B., Chen, CC., Ramakrishna, C., Cantin, EM., Vonderfecht, SL., Taganov, KD., Chau, N., Boldin, MP., Altered lymphopoiesis and immunodeficiency in miR-142 null mice. *Blood.* 2015;125(24):3720-3730.
  17. Mildner, A., Chapnik, E., Varol, D., Aycheck, T., Lampl, N., Rivkin, N., Bringmann, A., Paul, F., Boura-Halfon, S., Hayoun, YS., et al. MicroRNA-142 controls thymocyte proliferation. *Eur J Immunol.* 2017;47(7):1142-1152.
  18. Anandagoda, N., Willis, JC., Hertweck, A., Roberts, LB., Jackson, I., Gökmen, MR., Jenner, RG., Howard, JK., Lord, GM. microRNA-142-

- mediated repression of phosphodiesterase 3B critically regulates peripheral immune tolerance. *J Clin Invest.* 2019;129(3):1257-1271.
19. Trissal, MC., Wong, TN., Yao, JC., Ramaswamy, R., Iris Kuo, I., Baty, J., Sun, Y., Jih, G., Parikh, N., Berrien-Elliott, MM., MIR142 Loss-of-Function Mutations Derepress ASH1L to Increase HOXA Gene Expression and Promote Leukemogenesis. *Cancer Res.* 2018;78(13):3510-3521.
  20. Marshall, A., Kasturiarachchi, J., Datta, P., Guo, Y., Deltcheva, E., James, C., Brown, J., May, G., Anandagoda N, Jackson I, et al. Mir142 loss unlocks IDH2R140-dependent leukemogenesis through antagonistic regulation of HOX genes. *Sci Rep.* 2020;10(1):19390.
  21. Oka, K., Fujioka, S., Kawamura, Y., Chujo, T., Sekiguchi, K., Yamamura, Y., Oiwa, Y., Omamiuda-Ishikawa, N., Komaki, S., et al. Resistance to chemical carcinogenesis induction via a dampened inflammatory response in naked mole-rats. *Commun Biol.* 2022;5(1):287.
  22. Tempel, S., Tahi, F. A fast ab-initio method for predicting miRNA precursors in genomes. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(11): e80.
  23. Tav, C., Tempel, S., Poligny, L., Tahi, F. miRNAFold: a web server for fast miRNA precursor prediction in genomes. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(W1): W181-W184.
  24. Shrestha, A., Carraro, G., El, Agha E., Mukhametshina, R., Chao, CM., Rizvanov, A., Barreto, G., Bellusci, S. Generation and Validation of miR-142 Knock Out Mice. *PLoS One.* 2015;10(9): e0136913.
  25. Chen, Y., Wang, X. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(D1): D127-D131.
  26. Liu, W., Wang, X. Prediction of functional microRNA targets by integrative modeling of microRNA binding and target expression data. *Genome Biol.* 2019;20(1):18.
  27. Long, X., Lin, Y., Ortiz-Vega, S., Yonezawa, K., Avruch, J. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr Biol.* 2005;15(8):702-713.
  28. Babcock, JT., Quilliam, LA. Rheb/mTOR activation and regulation in cancer: novel treatment strategies beyond rapamycin. *Curr Drug Targets.* 2011;12(8):1223-1231.

29. Deng, L., Chen, L., Zhao, L., Xu, Y., Peng, X., Wang, X., Ding, L., Jin, J., Teng, H., Wang, Y. Ubiquitination of Rheb governs growth factor-induced mTORC1 activation. *Cell Res.* 2019;29(2):136-150.
30. Alcover-Sanchez, B., Garcia-Martin, G., Wandosell, F., Cubelos, B. R-Ras GTPases Signaling Role in Myelin Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci.* 2020;21(16):5911.
31. Jin, Q., Zhao, J., Zhao, Z., Zhang, S., Zhimin Sun, Z., Shi, Y., Yan, H., Wang, Y., Liu, L., Zhao, Z. CAMK1D Inhibits Glioma Through the PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway. *Front Oncol.* 2022;12: 845036.
32. Hodson, DJ., Janas, ML., Galloway, A., Bell, SE., Andrews, S., Li, CM., Pannell, R., Siebel, CW., MacDonald, HR., De Keersmaecker, K., et al. Deletion of the RNA-binding proteins ZFP36L1 and ZFP36L2 leads to perturbed thymic development and T lymphoblastic leukemia. *Nat Immunol.* 2010;11(8):717-724.
33. Suk, FM., Chang, CC., Lin, RJ., Lin, SY., Liu, SC., Jau, CF., Liang, YC. ZFP36L1 and ZFP36L2 inhibit cell proliferation in a cyclin D-dependent and p53-independent manner. *Sci Rep.* 2018;8(1):2742.
34. Tapodi, A., Bogнар, Z., Szabo, C., Gallyas, F., Sumegi, B., Hocsak, E. PARP inhibition induces Akt-mediated cytoprotective effects through the formation of a mitochondria-targeted phospho-ATM-NEMO-Akt-mTOR signalosome. *Biochem Pharmacol.* 2019; 162:98-108.
35. Vara-Ciruelos, D., Dandapani, M., Russell, FM., Grzes, KM., Atrih, A., Foretz, M., Viollet, B., Lamont, DJ., Cantrell, DA., Hardie, DG. Phenformin, But Not Metformin, Delays Development of T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma via Cell-Autonomous AMPK Activation. *Cell Rep.* 2019;27(3):690-698.e4.
36. Gao, S., Wu, Z., Arnold, B., Diamond, C., Batchu, S., Giudice, V., Alemu, L., Raffo, DQ., Feng, X., Kajigaya, S., et al. Single-cell RNA sequencing coupled to TCR profiling of large granular lymphocyte leukemia T cells. *Nat Commun.* 2022; 13(1):1982.
37. Kwanhian, W., Lenze, D., Alles, J., Motsch, N., Barth, S., Döll, C., Imig, J., Hummel, M., Tinguely, M., Trivedi, P., et al. MicroRNA-142 is mutated in about 20% of diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Med.* 2012;1(2):141-155.
38. Ben-Sahra, I., Manning, BD. mTORC1 signaling and the metabolic control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol.* 2017; 45:72-82.

39. Hsin, IL., Shen, HP., Chang, HY., Jiunn-Liang Ko, JL., Wang, PH. Suppression of PI3K/Akt/mTOR/c-Myc/mtp53 Positive Feedback Loop Induces Cell Cycle Arrest by Dual PI3K/mTOR Inhibitor PQR309 in Endometrial Cancer Cell Lines. *Cells*. 2021;10(11):2916.
40. Liu, P., Ge, M., Hu, J., Li, X., Che, L., Sun, K., Cheng, L., Huang, Y., Pilo, MG., Cigliano, A., et al. A functional mammalian target of rapamycin complex 1 signaling is indispensable for c-Myc-driven hepatocarcinogenesis. *Hepatology*. 2017;66(1):167-181.
41. Hoshii, T., Tadokoro, Y., Naka, K., Ooshio, T., Muraguchi, T., Sugiyama, N., Soga, T., Araki, K., Yamamura, K., Hirao, A. mTORC1 is essential for leukemia propagation but not stem cell self-renewal. *J Clin Invest*. 2012;122(6):2114-2129.
42. Simioni, C., Martelli, AM., Zauli, G., Melloni, E., Neri, LM. Targeting mTOR in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cells*. 2019;8(2):190.
43. Mencía, A., Modamio-Høybjør, S., Redshaw, N., Morín, M., Mayo-Merino, F., Olavarrieta, L., Aguirre, LA., del Castillo, I., Steel, KP., Dalmay, T., et al. Mutations in the seed region of human miR-96 are responsible for nonsyndromic progressive hearing loss. *Nat Genet*. 2009;41(5):609-613.
44. Soldà, G., Robusto, M., Primignani, P., Castorina, P., Benzoni, E., Cesarani, A., Ambrosetti, U., Asselta, R., Duga, S. A novel mutation within the MIR96 gene causes non-syndromic inherited hearing loss in an Italian family by altering pre-miRNA processing. *Hum Mol Genet*. 2012;21(3):577-585.
45. Hughes, AE., Bradley, DT., Campbell, M., Lechner, J., Dash, DP., Simpson, DA., Willoughby, CE. Mutation altering the miR-184 seed region causes familial keratoconus with cataract. *Am J Hum Genet*. 2011;89(5):628-633.
46. Iliff, BW., Riazuddin, SA., Gottsch, JD. A single-base substitution in the seed region of miR-184 causes EDICT syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(1):348-353.
47. Grigelioniene, G., Suzuki, HI., Taylan, F., Mirzamohammadi, F., Borochowitz, ZU., Ayturk, UM., Tzur, S., Horemuzova, E., Lindstrand, A., Weis, MA., et al. Gain-of-function mutation of microRNA-140 in human skeletal dysplasia. *Nat Med*. 2019;25(4):583-590.

48. Bagheri, F., Mesrian, Tanha H., Mojtavavi, Naeini M., Ghaedi, K., Azadeh, M. Tumor-promoting function of single nucleotide polymorphism rs1836724 (C3388T) alters multiple potential legitimate microRNA binding sites at the 3'-untranslated region of ErbB4 in breast cancer. *Mol Med Rep.* 2016;13(5):4494-4498.
49. Shasttiri, A., Rostamian Delavar, M., Baghi, M., Dehghani Ashkezari, M., Ghaedi, K. SNP rs10800708 within the KIF14 miRNA binding site is linked with breast cancer. *Br J Biomed Sci.* 2019;76(1):46-48.
50. Galka-Marciniak, P., Kanduła, Z., Tire, A., Wegorek, W., Gwozdz-Bak, K., Handschuh, L., Giefing, M., Lewandowski, K., Kozłowski, P. Mutations in the miR-142 gene are not common in myeloproliferative neoplasms. *Scientific Reports.* 2022; 12(1):10924.

## 第7章. 謝辞

稿を終えるにあたり、終始御指導と御鞭撻を賜り、本稿作成にあたり 多大なる御教示、御援助を戴きました 熊本大学 生命資源・支援センター ゲノム機能分野 荒木 正健 准教授、吉信 公美子 助教に心から厚く感謝の意を表します。

本研究ならびに本論文作成に際し、多くの面で貴重な御指南を戴き、英文校正において多大な御援助を戴きました 熊本大学 国際先端医学研究拠点機構 白血病転写制御研究室 指田 吾郎 特別招聘教授に心から厚く感謝の意を表します。

本論文の審査にあたり、有益なる御助言と御校閲を賜りました熊本大学生命資源研究部 南 敬 教授、中村 輝 教授、塩田 倫史 教授、熊本大学生命科学研究部 松井 啓隆に厚く御礼申し上げます。

本研究の動物実験に際し、動物の作成を含め本研究の御指南を戴きました 熊本大学 生命資源・支援センター 疾患モデル分野 荒木 喜美 教授に深謝致します。

本研究ならびに本論文作成に際し、貴重なご協力を戴きました 筑波大学 解剖学発生学研究室 高橋 智 教授、吉原 雅大 助教、国立成育研究センター ゲノム医療研究部 要 匡 部長に感謝の意を表します。



本研究に際し、共同研究者として日夜多大なる御協力を戴きました白 潔 博士をはじめ、熊本大学 国際先端医学研究拠点機構 白血病転写制御研究室の諸氏に深く感謝致します。

本研究に際し、研究室配属から共同研究者として御協力を戴きました古河 いまり 学士、立石 圭冴 氏をはじめ、熊本大学 生命資源研究・支援センター ゲノム機能分野、疾患モデル分野、生殖機能学分野の諸氏に心から感謝致します。

最後に、今日まで御指導、御支援を戴きました数多くの方々や良き友人達、そして私を育て上げてくれた両親、姉、兄、親戚諸氏に深く感謝申し上げます。