

## —原著—

マイクロ RNA-17-92 は Bcl11b の発現を抑制し, アポトーシスを誘導する

西川 敦

新潟大学大学院医歯学総合研究科顎顔面口腔外科学分野  
(主任 高木 律男教授)Micro RNA-17-92 decreases Bcl11b expression and induces apoptosis in  
Jurkat cells

Atsushi Nishikawa

Division of Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Oral Health Science, Course for Oral Life Science, Niigata University Graduate School of Medical and  
Dental Sciences  
(Chief : Prof. Ritsuo Takagi)

平成 23 年 10 月 7 日受付 11 月 1 日受理

Key words : マイクロ RNA (microRNA), miR-17-92 クラスター (miR-17-92 cluster), Bcl11b (B cell leukemia/  
lymphoma-11b), アポトーシス (apoptosis)

**Abstract:** MicroRNAs (miRNAs) inhibit gene expression and some of them are known to act as oncogenes or tumor suppressor genes. miR-17-92 is a miRNA cluster having an oncogenic activity that is involved in the development of lymphomas and solid tumors. Bcl11b is a transcription factor that acts as a haploinsufficient tumor suppressor. Point mutations or decrease in Bcl11b expression were identified in human T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) and in mouse thymic lymphoma. Here we examined the effect of the miR-17-92 cluster comprising miR-20a and miR-92a-1 on Bcl11b expression. Overexpression of miR-20a or miR-92a-1 in Jurkat cells decreased the expression of Bcl11b, and this may be regulated at the translation level through binding of these miRNAs to 3' UTR of Bcl11b mRNA. Enhanced apoptosis was observed in Jurkat cells overexpressing miR-20a or miR-92a-1, accompanying decreases in the expression of Bcl-2, an antiapoptotic protein. These results suggest that the decrease of Bcl11b expression by miR-20a and miR-92a-1 expression might be associated with the genesis of human T-ALL and mouse thymic lymphoma.

抄録：遺伝子の発現を制御するマイクロ RNA (miRNA) にはがん抑制遺伝子として機能するものと、がん遺伝子として機能するものがある。miRNA の集合体である miR-17-92 クラスターはがん遺伝子として機能しており、リンパ腫などの発症に関与している。転写因子 Bcl11b はハプロ不全ながん抑制遺伝子であり、ヒト T 細胞急性リンパ性白血病やマウス胸腺リンパ腫で Bcl11b の発現低下や点変異が報告されている。そこで、我々は Bcl11b の発現が miR-17-92 クラスターによって抑制されるか否かを調べた。その結果、miR-17-92 クラスターに含まれる miR-20a と miR-92a-1 が、Bcl11b の発現を抑制することがわかった。この抑制は、miRNA が Bcl11b のメッセンジャー RNA の 3' 末端非翻訳領域に結合し、それによる翻訳レベルでの制御と考えられた。ヒト T 細胞リンパ腫系の Jurkat 細胞に miR-20a や miR-92a-1 を発現させると、アポトーシス細胞が増加し、アポトーシス抑制因子である Bcl-2 の発現低下が認められた。これらの結果は、miR-20a と miR-92a-1 が Bcl11b の発現を抑制することを示し、この抑制がヒト T 細胞急性リンパ性白血病やマウス胸腺リンパ腫の発症に関与する可能性を示唆するものである。

## 【緒 言】

マイクロRNA (miRNA) は18~24塩基のヌクレオチドから構成される小さなRNA分子であり、発生・分化や疾患の発症に関与している。miRNAの標的遺伝子はメッセンジャーRNA (mRNA) の3'末端非翻訳領域 (UTR) に6~8塩基の“シード配列”で規定されており不完全な相補的配列で結合する。この結合によりRISC (RNA-induced silencing complex) が形成され、タンパク質の発現をmRNAの翻訳レベルで抑制する<sup>1)</sup>。また、mRNAの安定性を低下させることでタンパク質の発現を抑制する場合もあることが知られている<sup>1)</sup>。

最近の研究から、miRNAはがん抑制遺伝子あるいはがん遺伝子の発現を調節することによって、がんの発症に関与していることが明らかになっている<sup>2)</sup>。がん遺伝子として機能するmiRNAの代表としてmiR-17-92クラスターがある。このクラスターは6つのmiRNA (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1とmiR-92a-1) をコードしている<sup>3)</sup>。このクラスターは遺伝子C13orf25の第3イントロンに位置しており、リンパ腫やその他の腫瘍の発症に関与していると報告されている<sup>4)</sup>。例えば、Mycで誘導してmiR-17-92クラスターを強制発現させたトランスジェニックマウスにおいて、リンパ腫の発症と進行を増強させる<sup>5, 6)</sup>。また、レトロウイルスを用いてmiR-17-92クラスターを強制発現させると、マウスの白血病を誘導することも報告されている<sup>7-10)</sup>。miR-17-92クラスターに含まれる6つのmiRNAは、シード配列によってmiR-17/20a, miR-18a, miR-19a/19bとmiR-92a-1の4つのファミリーに分類することができる。それぞれのファミリーは異なった遺伝子を標的とすることが予測されているが、miRNAがどのように発がんに関与するかについては、未だ不明な点が多い<sup>11)</sup>。

Bcl11b (B cell leukemia/lymphoma-11b) /CPIP2/Rit1 (以下Bcl11b)<sup>12, 13)</sup>はC2H2亜鉛フィンガー転写因子に属し、胸腺細胞<sup>14-17)</sup>、神経<sup>18,19)</sup>、皮膚<sup>20)</sup>や歯<sup>21)</sup>などさまざまな組織で発現しており、それぞれの組織の発生や分化で重要な働きを担っている。Bcl11bは転写活性抑制因子として同定されており<sup>22)</sup>、p21, p27やp57といった標的遺伝子のGC richな配列に直接結合して作用するか、もしくはNuRD (nucleosome remodeling and histone deacetylase) 複合体として作用すると考えられている<sup>23-25)</sup>。一方、Bcl11bはNF- $\kappa$ Bが標的とするIL2遺伝子の転写を活性化させることから、転写を抑制または活性化する両方向性の機能があることが示唆される<sup>26, 27)</sup>。Bcl11bのいくつかの標的遺伝子が同定されているものの、その詳細な転写の分子機構については明らかでない。

我々はBcl11b欠損ヘテロマウスでは胸腺リンパ腫の発症が増加することから、Bcl11bはその機能の欠損や減少が発症に寄与するハプロ不全ながん抑制遺伝子であると報告している<sup>28)</sup>。さらに、マウスのリンパ腫でBcl11bのアリルの喪失が70%と高い頻度で見つかり、片アリルの喪失が発症初期の萎縮胸腺でも高頻度に起きていることを認めている<sup>29, 30)</sup>。ヒトにおいて、染色体転座によってBcl11bが過剰に発現し、T細胞急性リンパ芽球性白血病 (T-ALL) といったリンパ増殖性障害が生じることから、Bcl11bがこれらの疾患に関与していることが示唆されている<sup>31, 32)</sup>。さらに最近の研究から、ヒトT-ALLでBcl11bの欠損もしくは点突然変異が16%の頻度で存在することが見つかった<sup>33)</sup>。がん抑制遺伝子のわずかな機能低下でもがん発症や進行に大きく影響をするという新しい仮説も提案されており<sup>34)</sup>、Bcl11bも転写後のmiRNAなどの調節によってわずかな発現低下が生じることで、がん発症に寄与することが示唆される。

今回我々はBcl11bの発現を調節するmiRNAを調べたところ、miR-17-92クラスターに存在するmiR-17, miR-20aとmiR-92a-1がBcl11bの発現を抑制することがわかった。これらのmiRNAはBcl11bの3'UTR標的配列に結合し、Bcl11bのタンパク質発現量を減少させる。miR-17-92クラスターがBcl11bの発現を調節することによってアポトーシスに影響を及ぼし、ヒトやマウスのリンパ腫発症に関与する可能性が示唆された。

## 【材料と方法】

### 1. 細胞培養およびトランスフェクション

ヒト胎生腎由来のHEK293とヒトT細胞性リンパ腫由来Jurkat細胞を、それぞれ10% FBS (Nitirei) を加えたDMEM (Sigma) とRPMI (Sigma) 培地で37°C、5% CO<sub>2</sub>存在下で培養を行った。トランスフェクションは、FuGENE 6 (Roche) を用いた。

miRNA (pcDNA-miR) をpc3.1DNAに組み込み、Jurkat細胞にトランスフェクトし、G418 (500  $\mu$ g/ml) を加えたPMRI培地で培養して安定導入細胞株を樹立した。

### 2. 発現ベクターDNAの作製

miR-17-92クラスターのBcl11b 3'UTR標的部位であるsite1 (213-219), site2 (658-664) とsite3 (1,376-1,382) をそれぞれ含む1,393bp (54-1,446), 672bp (54-725), 278bp (54-331), 248bp (478-725) および184bp (1,263-1,446) のDNA断片をJurkat細胞のゲノムDNAを鋳型にして、PCRにより増幅した。用いたプライマー配列は表1に示す。XbaIで制限酵素処理を行ったDNA断片をpmirGLOベクター (Promega) のホタル・ルシフェラーゼ遺伝子の下流に

位置する XbaI 部位に導入し、クローンを作製した。Bcl11b 3'UTR の変異体は、PrimeSTAR mutagenesis basal kit (Takara) を用いて作製した。miRNA 発現ベクターは、miR-17-92 クラスターを Jurkat 細胞のゲノム DNA を鋳型として PCR により増幅した後、pcDNA3.1 ベクターの EcoRI と HindIII 部位に組み込み作製した。用いたプライマー配列は表 1 に示す。pcDNA3.1-miR-17, pcDNA3.1-miR-20a および pcDNA3.1-miR-92a-1 発現ベクターは PrimeSTAR mutagenesis basal kit (Takara) を用いて pcDNA3.1-miR-17-92 から作製した。全てのクローン化した DNA 断片は、シーケンスによって塩基配列を確認した。

### 3. ルシフェラーゼアッセイ

トランスフェクションの 24 時間前に、12 ウェルマイクロプレートに HEK293 細胞を  $2 \times 10^5$  cells/well の密度で播き、miRNA 発現ベクター ( $0.4 \mu\text{g}/\text{well}$ ) と Bcl11b 3'UTR を組み込んだルシフェラーゼリポーターベクター pmirGLO (Promega) ( $0.01 \mu\text{g}/\text{well}$ ) を、Fugene6 を用いて共発現させた。40 時間後、細胞をルシフェラーゼ細胞溶解バッファー (Toyo Inki) を用いて溶解し、デュアルルシフェラーゼ活性測定システムを使用してルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ・リポーター測定の特異性効率は、ウミシイタケルシフェラーゼ活性によって標準化した。データはホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼ活性との比率を 4 回測定しその平均をとり、標準偏差 (s.d) を示している。

### 4. ウェスタンブロット

各条件下で培養した Jurkat 細胞を集め、PBS で遠心洗浄した後、SDS-PAGE のサンプル buffer で  $10^6$  細胞当たり  $100 \mu\text{l}$  に溶解した。10% ~ 15% SDS-PAGE ゲルで電気泳動後、PVDF 膜にタンパク質を電気泳動的に転移させた。膜を 1 次抗体と  $4^\circ\text{C}$  で一昼夜インキュベートした後、HRP で標識した 2 次抗体を室温で 1 時間反応させた。その後 Amersham の ECL ウェスタンブロット検出試薬キットを用いて化学発光させ、オートラジオグラフィーでタンパク質の検出を行った。

### 5. 抗体

用いた 1 次抗体は、Bcl11b<sup>35)</sup>、Actin (Santa Cruz sc-1615)、Bcl-2 (Santa Cruz sc-492)、Bcl-XL (Cell Signaling #2762) である。用いた 2 次抗体は HRP 結合抗 goat IgG (Santa Cruz sc-2020) と HRP 結合抗 rabbit IgG (Amersham NA934V) である。

### 6. RT-PCR

RNA は pcDNA3.1 と miRNA 発現ベクターを導入し

た Jurkat 細胞から RNeasy mini kit (Quiagen) を用いて抽出した。cDNA は  $3.7 \mu\text{g}$  の総 RNA から SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) を用いてオリゴ (dT) プライマーで合成した。10 倍希釈したサンプルを表 1 に示したプライマーを用いて PCR ( $94^\circ\text{C}$  で 1 分間のあと、 $94^\circ\text{C}$  で 30 秒、 $54^\circ\text{C}$  で 30 秒、 $72^\circ\text{C}$  で 1 分を 28 サイクル行い、 $72^\circ\text{C}$  で 5 分間の伸張反応) を行った。GAPDH を基準として、Multiplex PCR を行った。PCR 産物は 1% のアガロースゲルで電気泳動によって分離し、エチジウムブロマイドで染色し可視化した。

### 7. アポトーシスの測定

アポトーシス解析は Annexin V (BD Biosciences Clontech) を用いて FACS 分析 (Becton Dickinson) によって、また TUNEL 染色キット (Takara) を用いて共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss) によって解析した。

## 【結 果】

### 1. miR-17-92 クラスターは Bcl11b の mRNA を標的とする

我々はデータベース TargetScan を用いて Bcl11b の 3'UTR を標的とする miRNA の候補を検索した。その結果、miR-92b と miR-32 や miR-17-92 クラスター (図 1A) に含まれる miR-17, miR-20a, miR-92a-1 などが候補となった。miR-17-92 クラスターは腫瘍形成に関与していることがわかっていることから、我々はクラスターに含まれる miRNA に焦点を絞った<sup>3, 11)</sup>。miR-17-92 クラスターの標的配列は、Bcl11b 3'UTR の 3 つの部位 (site1, site2, site3) に認められた (図 1B)。これらの標的配列は、miR-17-92 クラスターに含まれる miRNA の 6 ~ 8bp のシード配列に規定された Bcl11b 3'UTR の site1, site2 および site3 に結合し (図 1B)、Bcl11b の発現を抑制することが予測された。これらシード配列はマウスとヒトの間で保存されている。

miR-17-92 クラスターが直接 Bcl11b の 3'UTR に結合して発現を抑制するか否かを、ルシフェラーゼ遺伝子の下流に Bcl11b の 3'UTR 配列を組み込み、ルシフェラーゼ活性を抑制するか否かで調べた。miR-17-92 クラスターを発現する pcDNA-miR-17-92 と、Bcl11b 3'UTR の site1 から site3 をルシフェラーゼ遺伝子の下流に組み込んだレポーター遺伝子 pmirGLO site 1-3 を HEK293 細胞に共発現させて、24 時間後に細胞抽出液を調製し、ルシフェラーゼの活性を測定した。その結果、コントロールベクター (pcDNA) の活性に対して、pcDNA-miR-17-92 ではルシフェラーゼ活性が 36% ( $P < 0.01$ ) の抑制が認められた。同様に、pcDNA-miR-17-92 と、

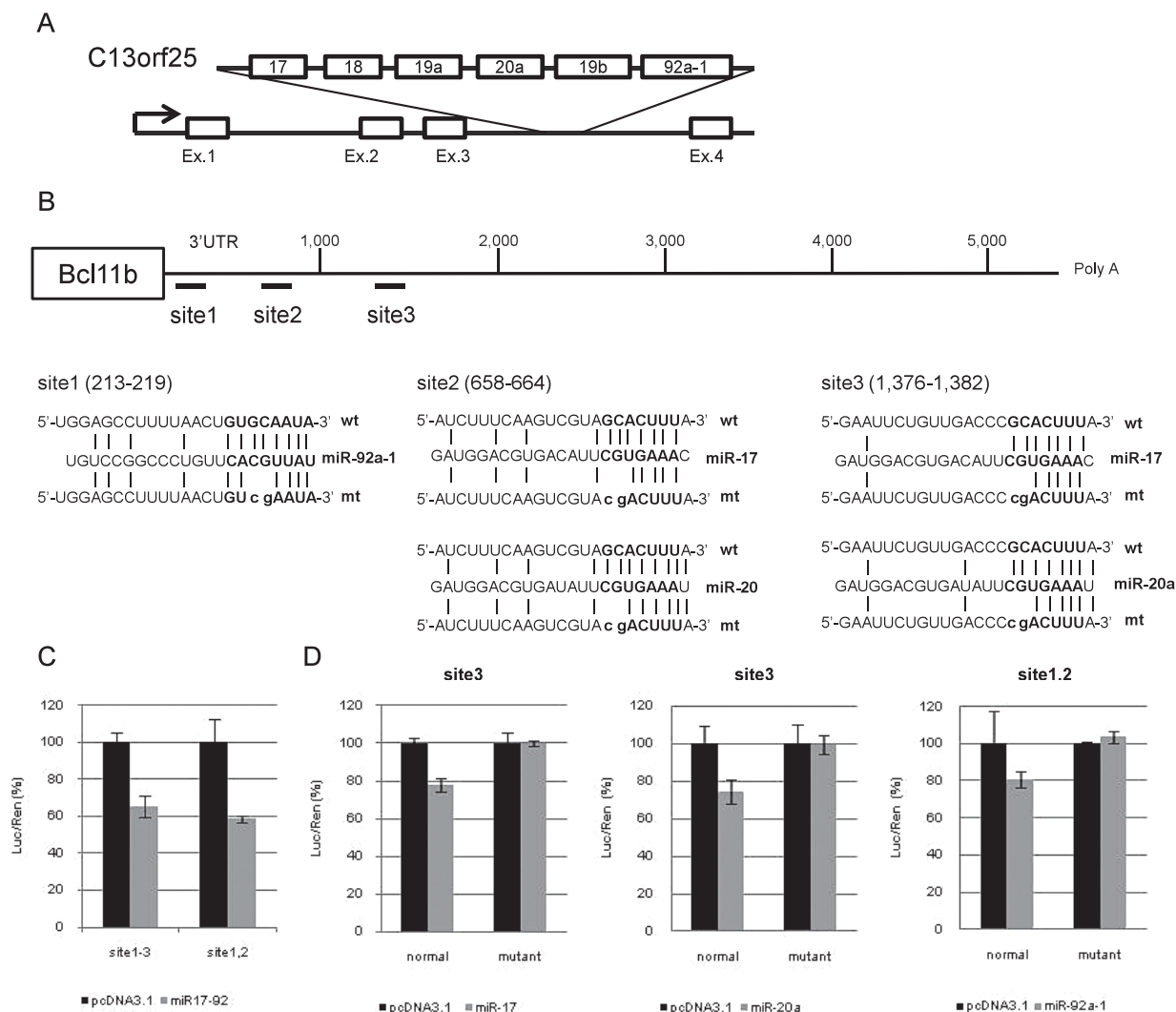


図1 : miR-17-92 クラスターは Bcl11b の発現を抑制する

(A) miR-17-92 クラスターの構成の模式図。ヒトでは C13orf25 遺伝子の第 3 イントロンに位置している。

(B) Bcl11b 3' UTR に存在する miR-17-92 クラスターの標的配列の位置と予測される塩基対合の模式図。一番上には標的部位的配列を示し、まん中には miRNA のシード配列を、一番下には標的部位に 2 塩基の突然変異 (小文字) を加えた配列を示している。miRNA のシード配列と塩基対合する標的配列を太文字で示している (site1, 213-219; site2, 658-664, site3; 1,376-1,382)。

(C) pcDNA-miR-17-92 による Bcl11b 3' UTR の標的配列を組み込んだルシフェラーゼレポーター遺伝子のルシフェラーゼ活性に対する影響。HEK293 細胞に Bcl11b 3' UTR (site 1 から site3 を含む領域と site1 と site2 を含む領域) を組み込んだルシフェラーゼ発現ベクターと、pcDNA3.1 と pcDNA-miR-17-92 を共発現させ、細胞抽出液を調製後、ルシフェラーゼ活性 (Luc) を測定した。測定値はウミシイタケルシフェラーゼ活性 (Ren) を内部対照として用い、コントロール (pcDNA) の Luc/Ren を 100 として表している。データはホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼの活性を 4 回測定し、その平均をとったものを示している。

(D) pcDNA-miR-17, pcDNA-miR-20a, pcDNA-miR-92a-1 による Bcl11b 3' UTR の標的配列 (野生型と変異型) を組み込んだルシフェラーゼレポーター遺伝子のルシフェラーゼ活性に対する影響。変異型は (A) に示した 2 塩基の変異を導入したレポータープラスミドを用いたときの測定を示している。(C) と同様の解析を行った結果を示している。

Bcl11b 3'UTR の site1 と site2 をルシフェラーゼ遺伝子の下流に組み込んだレポーター遺伝子 pmirGLO site 1,2 を用いて測定すると、42% ( $P < 0.01$ ) の抑制が認められた (図 1C)。一方、miR-32 と miR-92b では明らかなルシフェラーゼ活性の抑制は認められなかった (date not shown)。

次に、miR-17-92 クラスターに含まれる miR-17, miR-20a と miR-92a-1 を個々に発現するベクターを作製し、Bcl11b 3'UTR の標的配列に対する効果を調べた。pmirGLO site 1,2 もしくは Bcl11b 3'UTR の site3 の標的配列を含むレポーター遺伝子 pmirGLO site 3 と miRNA 発現ベクター (pcDNA-miR-17, pcDNA-miR-

20a および pcDNA-miR-92a-1) を用いて上記と同様にルシフェラーゼ活性を測定した。その結果, 図 1D に示すように miR-17 や miR-92a-1, miR-20a を発現させると約 25% の抑制が認められた。一方, Bcl11b 3'UTR の site1, site2, site3 に 2bp の突然変異 (GC → CG) を加えるとルシフェラーゼ活性の抑制は認められなくなった (図 1B, D)。これらの結果から, miR-17-92 クラスターに含まれる miR-17, miR-20a, miR-92a-1 が Bcl11b の mRNA を標的とすることが示唆された。

## 2. miR-20a と miR-92a-1 は Bcl11b の発現を翻訳レベルで抑制する

miR-17 と miR-20a は同じファミリーに属するため, miR-17-92 クラスター内の miR-20a と miR-92a-1 に照準を合わせ実験した。pcDNA-miR-20a および pcDNA-miR-92a-1 を安定に組み込んだ Jurkat 細胞系を樹立し (J 細胞 -miR-20a, J 細胞 -miR-92a-1), Bcl11b のタンパク質発現量と mRNA の量を調べた。図 2A に示すように, J 細胞 -miR-20a, J 細胞 -miR-92a-1 では, コントロール (pcDNA) 細胞系に比べて Bcl11b のスプライシングの異なる  $\alpha$ ,  $\beta$  型のタンパク質発現量の減少が見られた。一方, J 細胞 -miR-20a, J 細胞 -miR-92a-1 における Bcl11b の mRNA 発現量を濃度依存的条件下でコントロール (pcDNA) 細胞系と比較したとき, 有意に差は認められなかった (図 2B)。このことから, miR-17-92 クラスターに存在する miR-20a と miR-92a-1 は, Bcl11b の mRNA の安定性には影響を及ぼさず, Bcl11b の発現を翻訳レベルで抑制していることが示唆された。

## 3. miR-17-92 クラスターはアポトーシスを促進する

我々は以前, Jurkat 細胞に 2 つの異なる siRNA を導入して Bcl11b ノックダウン細胞を作製し, 細胞周期の抑止とアポトーシスが生じることを報告している<sup>35)</sup>。そこで, J 細胞 -miR-20a と J 細胞 -miR-92a-1 において, アポトーシスが誘導されるか否かを調べた。

図 3A に示すように, Annexin V 陽性細胞の割合が, コントロール (pcDNA) 細胞系で 2.91%, J 細胞 -miR-20a で 10.78%, J 細胞 -miR-92a-1 で 6.66% と, アポトーシスの誘導が認められた。また, TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling) 測定でも同様にアポトーシスが誘導されることが確認された (図 3B)。このアポトーシスの促進効果が, 何に起因するのかを調べるため, アポトーシス抑制に働く Bcl-2 ファミリータンパク質である Bcl-2 と Bcl-XL について, その発現レベルを調べてみた。その結果, Bcl-XL の発現量は明らかな変化を示さなかったものの, Bcl-2 のタンパク質レベルがコントロール (pcDNA) 細胞系に比べて J 細胞 -miR-20a と J 細胞 -

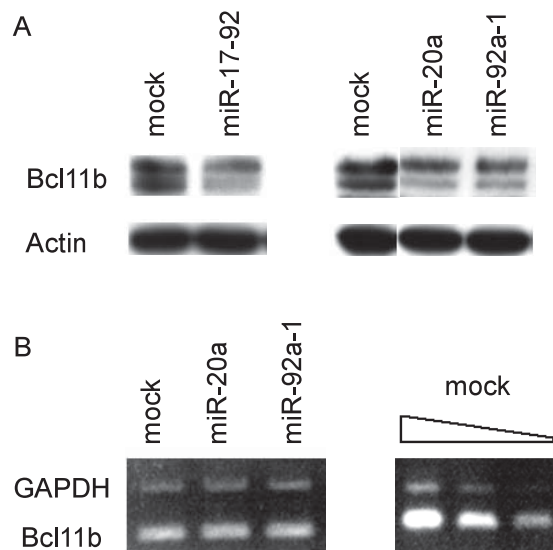


図 2 : Jurkat 細胞において miR-17-92 クラスターの miRNA は Bcl11b のタンパク発現量を翻訳のレベルで抑制するが, mRNA の安定性には影響を与えない

(A) Jurkat 細胞に pcDNA-miR-17-92, pcDNA-miR-20a, pcDNA-miR-92a-1 を導入し, 安定して発現する細胞系を樹立した。それぞれの細胞系から細胞抽出液を調製し, Bcl11b タンパク質の発現量を調べたもの。Bcl11b のバンドは  $\alpha$  型 (上) と  $\beta$  型 (下) が認められる。アンプルアプライ量の対照としてアクチンを示している。

(B) (A) で用いた細胞系で, Bcl11b の mRNA 量を RT-PCR で解析した結果を示している。GAPDH を対照として, 同じチューブ内で同時に Bcl11b と GAPDH の PCR 反応を行った。右の図は用いた mock (pcDNA を導入した細胞) から調整した鋳型量を 2, 1, 1/2 と変化させたときの RT-PCR の結果で, RT-PCR の反応は濃度依存性があることを示している。

miR-92a-1 でともに減少していた。これらの結果は siRNA で Bcl11b の発現を抑制したときの結果と同様に<sup>35)</sup>, miR-20a や miR-92a-1 によって Bcl11b の発現が抑制され, その結果 Bcl-2 の発現が抑制されることによってアポトーシスが誘導されることが示唆された。

## 【考 察】

今回の結果から, miR-17-92 クラスターの成分である miR-17, miR-20a, miR-92a-1 が, Bcl11b の mRNA の 3'UTR に直接作用し, その発現を抑制する負の調節因子であることが分かり, 初めての報告となった。また miR-20a と miR-92a-1 による Bcl11b の発現抑制により, アポトーシスの増加が認められた。

miR-17-92 クラスターの過剰発現によって腫瘍細胞や PC3 細胞のアポトーシスを抑制することを報告している知見<sup>36)</sup> とは相反するものである。しかし, siRNA によって Jurkat 細胞の Bcl11b の発現を阻害すると, 細胞周期が抑制され, アポトーシスを促進することが報告さ

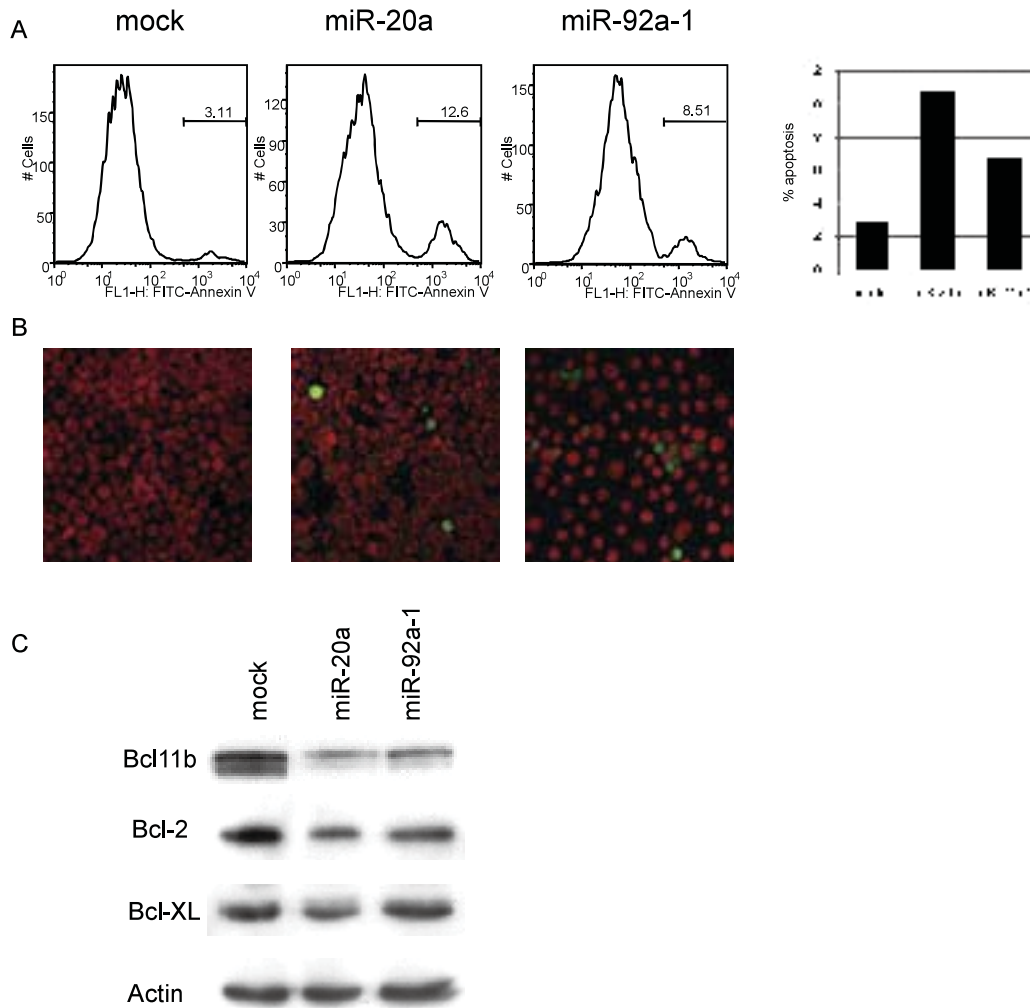


図3 : miR-20a と miR-92a-1 を導入した Jurkat 細胞ではアポトーシスが誘導される  
 (A) J 細胞 -miR-20a, J 細胞 -miR-92a-1 を Annexin V で染色した後, FACS 解析を行った結果を示している。Anexin V で染色された細胞の割合をアポトーシス細胞として算出した。2 回の解析結果の平均値をグラフに表している。  
 (B)(A) で用いた Jurkat 細胞系を TUNEL と DAPI 染色し, 共焦点レーザー顕微鏡で観察したもの。  
 (C)(A) で用いた Jurkat 細胞系から細胞抽出液を調製し, ウェスタンブロット法で Bcl-2 関連タンパク質の発現量を調べたもの。アンプルアプライ量の対照としてアクチンを示している。

れている<sup>35, 37)</sup>。また Grabarczk らは, RNA 干渉による Bcl11b の抑制は T 細胞でアポトーシスを誘導するが正常な成熟細胞が影響を受けないことから, Bcl11b の欠損によるアポトーシスは, 分化やトランスフォーム表現型に依存している可能性がある<sup>37)</sup>と報告している。miRNA によるアポトーシス細胞の増加 (コントロール 2.91% に対して J 細胞 -miR-20a, 10.78%, J 細胞 -miR-92a-1, 6.66%) は, siRNA による Bcl11b 発現をノックダウンした Jurkat 細胞のアポトーシス細胞の増加ほどの差は認められなかった (コントロール 1.57% に対して siRNA 11.1%)<sup>35)</sup>。これは, siRNA による Bcl11b の発現抑制がほぼ完全に近いのに対して, miRNA による Bcl11b の発現抑制は 50% 以下程度で完全に阻害しないことによるものと考えられる。miR-20a と miR-92a-1 に

よるアポトーシスの促進効果は, 図 3C に示すように, アポトーシス促進因子 Bcl-2 の減少による結果と考えられる。一方, siRNA による Bcl11b 発現抑制によってもたらされるアポトーシスの促進効果は, Bcl-2 の減少も認められているが, Bcl-XL の減少によるものが大きいと考察されている<sup>35, 37)</sup>。保存された 6 ~ 8 塩基のシード配列を含んでいる哺乳類の miRNA ファミリーは平均 300 の標的があると推定されている<sup>1)</sup>。miR-17-92 クラスターの標的遺伝子は, 他にも miR-17/20a は E2F (細胞周期調節装置転写因子)<sup>36)</sup> を, miR-92a-1 は Bim (アポトーシス促進因子)<sup>38)</sup> を, miR-19 は Pten (腫瘍抑制遺伝子) を標的としていることが報告されており<sup>11, 37, 40)</sup>, Bcl11b におけるアポトーシスはこれらの遺伝子と協同して作用する可能性がある。

我々は以前, Bcl11b + / - マウスに  $\gamma$  線照射を行うか, Bcl11b + / -  $\cdot$  p53 + / - マウスの非放射線照射において胸腺リンパ腫の発症が促進されることから, Bcl11b はハプロ不全ながん抑制遺伝子であると報告した<sup>28)</sup>。Alimonti らは, Pten の発現量が 80 % 程度である hypomorphic なマウス (Pten<sup>hy/+</sup>) で乳がんが高頻度で発症すると報告している<sup>34)</sup>。このことから, がん抑制遺伝子はある一定の濃度以上で正常に機能し, その有効閾値を下まわった場合に生物学的変化を起こすと提唱している。図 2 で示すように, miR-17-92 クラスターによる Bcl11b タンパク質レベルの抑制は 50% 以下程度であり, miRNA によって制御される Bcl11b の機能に及ぼす影響は, このモデルに当てはまる可能性を示唆している。

本研究において, 我々は miR-17-92 クラスターが Bcl11b の負の調節因子であることを示し, miR-17-92 クラスターによるアポトーシスへの影響がリンパ腫発症に寄与する可能性が示唆された。

### 【謝 辞】

稿を終えるにあたり, 御指導を賜りました分子生物学分野 三嶋行雄准教授, 木南 凌教授, 顎顔面口腔外科学分野 高木律男 教授に深謝いたします。また, 研究遂行にあたり, 分子生物学分野 小幡美貴教務職員, 郷梨江香特任助教にご協力いただきました。深く感謝いたします。

### 【引用文献】

- 1) Bartel D : MicroRNAs: target recognition and regulatory functions, *Cell*, 136 : 215-233, 2009.
- 2) Ventura A, Jacks T : MicroRNAs and Cancer: short RNAs go a long way, *Cell*, 136 : 586-591, 2009.
- 3) Mendell J : miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease, *Cell*, 133: 217-222, 2008.
- 4) Ota A, Tagawa H, Kaman S, et al : Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma, *Cancer Res*, 64 : 3087-3095, 2004.
- 5) O'Donnell K, Wentzel E, Zeller K : c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression, *Nature*, 435 : 839-843, 2005.
- 6) Chang T-C, Yu D, Lee Y-S : Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis, *Nature Genetics*, 40 : 43-50, 2008.
- 7) Xiao C, Srinivasan L, Calado D, et al : Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes, *Nat Immunology*, 9 : 405-414, 2008.
- 8) Wang C, Wang B, Bartha G, et al : Activation of an oncogenic microRNA cistron by provirus integration, *Proc Natl Acad Sci USA*, 103 : 18680-18684, 2006.
- 9) Cui L, Li Y, Sarkar A : Retroviral insertional activation of the Fli-3 locus in erythroleukemias encoding a cluster of microRNAs that convert Epo-induced differentiation to proliferation, *Blood*, 110 : 2631-2640, 2007.
- 10) Mi S, Li Z, Chen P, et al : Aberrant overexpression and function of the miR-17-92 cluster in MLL-rearranged acute leukemia, *Proc Nat Acad Sci USA*, 107 : 3710-3715, 2010.
- 11) van Haaften G, Agami R : Tumorigenicity of the miR-17-92 cluster distilled, *Genes & Development*, 24 : 1-4, 2010.
- 12) Shinbo T, Matsuki A, Matsumoto Y, et al, Allelic loss mapping and physical delineation of a region harboring a putative thymic lymphoma gene on chromosome 12, *Oncogene* 12: 4131-4136, 1999.
- 13) Wakabayashi Y, Inoue J, Takahashi Y et al : Homozygous deletions and point mutations of the Rit1/Bcl11b gene in gamma-ray induced mouse thymic lymphomas, *Biochem Biophys Res Commun*, 301 : 598-603, 2003.
- 14) Wakabayashi Y, Watanabe H, Inoue J et al : Bcl11b is required for differentiation and survival of alphabeta T lymphocytes, *Nat Immunol*, 4 : 533-539, 2003.
- 15) Li P, Burke SD, Wang J, et al : Reprogramming of T cells to natural killer-like cells upon Bcl11b deletion, *Science*, 329 : 85-89, 2010.
- 16) Li L, Leid M, Rothenberg E : An early T cell lineage commitment checkpoint dependent on the transcription factor Bcl11b, *Science*, 329 : 89-93, 2010.
- 17) Ikawa T, Hirose S, Matsuda K, et al : An essential developmental checkpoint for production of the T cell lineage, *Science*, 329 : 93-96, 2010.
- 18) Arlotta P, Molyneaux B, Chen J, et al : Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo, *Neuron*, 45 :

- 207-221, 2005.
- 19) Arlotta P, Molyneaux B, Jabaudon D, et al : Cpip2 controls the differentiation of medium spiny neurons and the establishment of the cellular architecture of the striatum, *J Neurosci*, 28 : 622-632, 2008.
  - 20) Golonzhka O, Liang X, Messaddeq N et al : Dual role of COUP-TF-interacting protein 2 in epidermal homeostasis and permeability barrier formation, *J Invest Dermatol*, 129 : 1459-1470, 2008.
  - 21) Golonzhka O, Metzger D, Bornert J, et al : Ctip2/Bcl11b controls ameloblast formation during mammalian odontogenesis, *Proc Natl Acad Sci USA*, 106 : 4278-4283, 2009.
  - 22) Avram D, Fields A, Senawong T, et al : COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor)-interacting protein 1 (CTIP1) is a sequence-specific DNA binding protein, *Biochem J*, 368 : 555-563, 2002.
  - 23) Cherrier T, Suzanne S, Redel L, et al : p21WAF1 gene promoter is epigenetically silenced by CTIP2 and SUVH1, *Oncogene*, 28 : 3380-3389, 2009.
  - 24) Topark-Ngarm A, Golonzhka O, Peterson V, et al : CTIP2 associates with the NuRD complex on the promoter of p57KIP2, a newly identified CTIP2 target gene, *J Biol Chem*, 281 : 32272-32283, 2006.
  - 25) Cismasiu V, Adamo K, J Gecewicz, et al : BCL11B functionally associates with the NuRD complex in T lymphocytes to repress targeted promoter, *Oncogene*, 24 : 6753-6764, 2005.
  - 26) Cismasiu V, Ghanta S, Duque J, et al : BCL11B participates in the activation of IL2 gene expression in CD4 + T lymphocytes, *Blood*, 108: 2695-2702, 2006.
  - 27) Cismasiu V, Duque J, Paskaleva E, et al : BCL11B enhances TCR/CD28-triggered NF- $\kappa$ B activation through up-regulation of Cot kinase gene expression in T-lymphocytes, *Biochem J*, 417 : 457-466, 2009.
  - 28) Kaminura K, Mishima Y, Ohi H, et al : Haploinsufficiency of Bcl11b for suppression of lymphomagenesis and thymocyte development, *Biochem Biophys Res Commun*, 355 : 538-542, 2007.
  - 29) J Sakata, Inoue J, Ohi H, et al : Involvement of V(D)J recombinase in the generation of intragenic deletions in the Bcl11b/Bcl11b tumor suppressor gene in gamma-ray-induced thymic lymphomas and in normal thymus of the mouse, *Carcinogenesis*, 25 : 1069-1075, 2004.
  - 30) Ohi H, Mishima Y, Kamimura, K, et al : Multi-step lymphomagenesis deduced from DNA changes in thymic lymphomas and atrophic thymuses at various times after gamma-irradiation, *Oncogene*, 26 : 5280-5289, 2007.
  - 31) Nagel S, Kaufmann M, Drexler H, et al : The cardiac homeobox gene NKX2-5 is deregulated by juxtaposition with BCL11B in pediatric T-ALL cell lines via a novel t (5;14) (q35.1;q32.2), *Cancer Res*, 63 : 5329-34, 2003.
  - 32) Przybylski G, Dik W, Wanzeck J, et al : Disruption of the BCL11B gene through inv(14) (q11.2q32.31) results in the expression of BCL11B-TRDC fusion transcripts and is associated with the absence of wild-type BCL11B transcripts in T-ALL, *Leukemia*, 19 : 201-208, 2009.
  - 33) De Keersmaecker K, Reak P, Gatta G, et al : The TLX1 oncogene drives aneuploidy in T cell transformation, *Nature Medicine*, 11 : 1231-12327, 2010.
  - 34) Alimonti A, Carracedo A, Clohessy J, et al : Subtle variations in Pten dose determine cancer susceptibility, *Nat Genet*, 42 : 454-458, 2010.
  - 35) Kaminura K, Mishima Y, Obata M, et al : Lack of Bcl11b tumor suppressor results in vulnerability to DNA replication stress and damages, *Oncogene*, 26 : 5840-5850, 2007.
  - 36) Sylvestre Y, DeGuire V, Querido E, et al : An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop, *J Biol Chem*, 282 : 2135-2143, 2007.
  - 37) Grabarczyk P, Przybylski G, Depke M, et al : Inhibition of BCL11B expression leads to apoptosis of malignant but not normal mature T cells, *Oncogene*, 26 : 3797-3810, 2007.
  - 38) Mu P, Han Y-C, Betel D, et al : Genetic dissection of the miR-17-92 cluster of microRNAs in Myc-induced B-cell lymphomas, *Genes & Dev*, 23 : 2808-2811, 2009.
  - 39) Mavrakis K, Wolfe A, Oricchio E, et al : Genome-wide RNA-mediated interference screen identifies miR-19 targets in Notch-induced T-cell acute lymphoblastic leukemia, *Nature Cell Biol*, 12 : 372-379, 2010.
  - 40) Olive Y, Bennett M, Walker J, et al : miR-19 is a key oncogenic component of mir-19-92, *Genes & Dev*, 23 : 2839-2849, 2009.