

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 12 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19557

研究課題名(和文) miR-155によるT-ALLの薬剤感受性制御機構の解明

研究課題名(英文) The mechanism of drug resistance regulated by miR-155 in T-ALL

研究代表者

小山 大輔 (Koyama, Daisuke)

自治医科大学・医学部・客員研究員

研究者番号：50741071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：T-ALLにおいて、bortezomibはNotch1の転写抑制を介して細胞死や化学療法感受性を増強させる。Notch1発現抑制は転写因子Sp1の分解によって引き起こされる。T-ALLでbortezomibによって誘導されるmicroRNAをリアルタイムPCRアレイによって抽出した。その中にSp1をターゲットとするmiR-155を見出した。CRISPR/Cas9でmiR-155をノックダウンするとbortezomibへの感受性が低下した。よってmiR-155はbortezomibに関する薬剤感受性のバイオマーカーとして使用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that bortezomib induces cell death and increases chemosensitivity via transcriptional repression of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. The down-regulation of Notch1 was caused by the degradation of Sp1. But the mechanism of Sp1 degradation is still unknown. We hypothesized that Sp1 is degraded by some microRNA. In order to find the microRNA targeting Sp1, we performed the microRNA array and identified that miR-155 was up-regulated by bortezomib. We confirmed it using CRISPR/Cas9 system. These results indicated that miR-155 could be the biomarker of the drug sensitivity for bortezomib.

研究分野：血液内科

キーワード：miR-155 bortezomib T-ALL 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

T細胞性急性リンパ性白血病 (T-cell acute lymphoblastic leukemia; T-ALL) は Tリンパ球由来の高悪性度な造血器悪性腫瘍の1つで、ALL 全体に占める割合は、小児例では15%、成人例では25%である。近年、集学的化学療法の進歩により治療成績は改善しつつあるが、初回完解導入療法不応例や再発例では未だに予後は不良である。現在、T-ALL に対して有効な分子標的治療薬に乏しいことから、分子病態の理解に立脚した新しい治療戦略を開発していくことは急務である。Notch1 は T-ALL 症例の50%以上で活性型変異が見られること、マウスで造血幹細胞に Notch1 を強発現させると T-ALL を発症することから、T-ALL の病態生理において最も重要な分子の1つと考えられている。また Notch1 はステロイド剤をはじめとする多くの抗がん剤の薬剤感受性に影響することが示されている (Real et al. Nat. Med. 15: 50, 2009)。T-ALL 細胞においてステロイド感受性と Notch1 の発現量は逆相関し (Cialfi et al, Leukemia 27: 485, 2013) 小児 ALL においてステロイド感受性と完解率・長期生存率が比例することから (Annino et al, Blood 99: 863, 2002) Notch1 活性の制御は臨床的にも重要な意義がある。

Notch1 受容体は Notch 受容体ファミリーの一員である。Notch 受容体ファミリーには4種類の受容体 (Notch1~4)、5種類のリガンド (Delta1, 3, 4, Jagged 1, 2) が存在する。Notch1 受容体は細胞外ドメイン (extracellular domain; ECD) と細胞内ドメイン (intracellular domain of Notch1; NICD) から構成され、heterodimerization domain (HD) により連結されている。Notch1 受容体にリガンドが結合すると、-secretase の作用により活性型である NICD が遊離し、核内に移行して細胞周期・細胞分化・アポトーシス関連遺伝子の転写を制御する。T-ALL において Notch1 の変異は、NICD の分解に関わる C 末端の PEST ドメインまたは HD のいずれか、あるいは両方で生じ、NICD の安定化ないしリガンド非依存性に NICD 遊離を促進することで恒常的な Notch シグナル活性化を引き起こす (論文1)。これらの知見に基づき、-secretase 阻害剤や Notch1 受容体阻害抗体が NICD の遊離を阻害し、Notch シグナルを抑制することで T-ALL に対する治療効果を発揮すると期待された。しかしながらほとんどの T-ALL 細胞とくに HD に変異を有するものでは、効果はきわめて限定的であった。また容量制限毒性として重篤な消化管出血があり、現時点では Notch シグナルを制御できる有効かつ安全な治療薬は存在せず、新たな分子標的治療薬の開発が必要である。そこで申請者は、すでに多発性骨髄腫の治療に広く使用され、安全性も確認されているプロテアソーム阻害剤に着目し、T-ALL に対する効果を研究した。

First-in-class の薬剤で、現在では多発性骨髄腫・マントル細胞リンパ腫に適応が認められている bortezomib と、bortezomib 耐性細胞にも有効な新規プロテアソーム阻害剤 K-7174 (論文2) を T-ALL に作用させたところ、骨髄腫細胞と同等ないしより低濃度で殺細胞効果を発揮した。そこで作用機序について解析を進め、bortezomib が Notch1 遺伝子の転写を抑制し、その結果、NICD の発現も減弱して、標的分子である Hes1・Runx3・NF-kB などが抑制されることを明らかにした。さらに Notch1 転写抑制のメカニズムについて研究を進め、T-ALL においては bortezomib が、Notch1 遺伝子の発現に必須の役割を果たす転写因子 Sp1 の発現を低下させて転写を抑制することを見出した。プロテアソーム阻害剤は転写レベルで Notch1 を抑制するため、HD に変異があっても有効性を示すことが、

-secretase 阻害剤などに比べて明らかに優位な点である。また Notch シグナルが抑制されることで、他の抗がん剤に対する感受性が著明に亢進した (論文1)。以上から、将来的にプロテアソーム阻害剤が T-ALL に対する分子標的薬として多剤併用療法に組み込まれ、治療成績の向上に貢献することが期待される。臨床応用を前提とした場合、プロテアソーム阻害剤による Notch1 抑制のメカニズムをさらに詳細に解析し、新規治療標的を同定すると共に、協調的に働く薬剤や感受性規定因子を同定することが重要な課題である。

2. 研究の目的

論文1に発表した研究の中で、未だに明らかにできていない点として、1) bortezomib によって Sp1 の発現が抑制される機序、2) Sp1 の低下が腫瘍選択的に細胞死を誘導する機序、3) NF- κ B シグナルの構成因子である p105/p50・p65 の発現が抑制されるメカニズムなどが挙げられる。申請者は論文1の研究を進める中で、T-ALL 細胞株に Sp1 を強発現させることによって、bortezomib による Notch1 および NF- κ B シグナルの抑制が rescue されることを証明しようと考えた。ところがレンチウイルスベクターを使用して Sp1 を強制発現させたところ、逆説的に Sp1 タンパク質の発現が低下し、実験が行えなかった。この際、Sp1 mRNA の発現は低下しておらず、Sp1 によって誘導される microRNA による自己翻訳抑制の可能性が考えられた。そこで microRNA アレイを用い、bortezomib によって T-ALL 細胞に誘導される microRNA をスクリーニングした。誘導された microRNA の中から、miR-base などのデータベースを使用し、Sp1 や NF- κ B 複合体の構成因子を標的とする microRNA を選択した。さらにリアルタイム PCR で T-ALL 細胞における発現と bortezomib による変化を調べたところ、miR-155 の発現量と bortezomib 感受性との逆相関が見いだされた。T-ALL 細

胞株に bortezomib を投与すると 12 時間後を peak として miR-155 が誘導される。またテトラサイクリン誘導発現系を使用して T-ALL 細胞株 Jurkat に miR-155 を強制発現させると、細胞死が誘導されることが明らかになった。以上から、miR-155 がプロテアソームによる Notch1 発現抑制のエフェクター分子の最有力候補と考えられた。2003 年、パーキットリンパ腫 (Burkitt lymphoma) で miR-155 の sequence を含む BIC と呼ばれる non-coding 遺伝子の過剰発現が報告され (Metzler et al., Genes Chromosomes Cancer 39: 167, 2004)、後に BIC 遺伝子が miR-155 の pri-miRNA であることが判明した。その発現異常がリンパ腫発症に関連していることが示唆されている (Elton et al., Gene 532:1, 2013)。しかし、制御対象となる遺伝子や臨床的意義については未だ不明が多く、特に T-ALL での報告はない。本研究課題においては、T-ALL において miR-155 が Notch シグナル・NF- κ B シグナルの制御にどのように関わっているかを明らかにし、プロテアソーム阻害剤などの治療薬剤に対する感受性規定因子である可能性を Sp1 発現に対する影響を明らかにする。

3. 研究の方法

プロテアソーム阻害剤による Notch1 転写および NF- κ B シグナル抑制のメカニズムを microRNA に着目して明らかにする。申請者はすでに bortezomib によって T-ALL に誘導される microRNA とその標的分子のスクリーニングを行い、miR-155 を候補として同定している。Notch1 活性型変異を有する T-ALL においては、miR-155 が誘導されると、細胞死が引き起こされる。本研究課題においては、テトラサイクリン誘導発現系を使用し、ドキシサイクリン存在下のみで miR-155 が発現される系を構築、miR-155 の標的遺伝子スクリーニングする。その中で薬剤感受性や細胞増殖・細胞死と関連する遺伝子を抽出し、T-ALL の病態生理における役割・機能を解明する。さらに臨床検体を用い、miR-155 が治療効果予測や微小残存病変の検出などバイオマーカーとして応用できるかを明らかにする。

4. 研究成果

申請者は、プロテアソーム阻害剤が Sp1 依存性に Notch1 転写を抑制すると共に、p65・p105/p50 発現を低下させて NF- κ B 活性を抑えることを見いだした。そのメカニズムとして microRNA の関与を考え、T-ALL 細胞に bortezomib を作用させた際の microRNA の発現変化をアレイにてスクリーニングした。Bortezomib によって誘導された microRNA の中から、Sp1 や p65・p105/p50 を標的とする microRNA を選択した。さらにリアルタイム PCR で T-ALL 細胞における発現と bortezomib による変化を調べたところ、

miR-155 の発現量と bortezomib 感受性が逆相関することがわかった。T-ALL 細胞株に bortezomib を投与すると 12 時間後を peak として miR-155 が誘導される。テトラサイクリン誘導発現系を使用して、T-ALL 細胞株 Jurkat に miR-155 を強制発現させると、細胞死が誘導された。

さらに CRISPR-Cas9 を用いて T-ALL の細胞株において miR-155 をノックダウンさせた際の bortezomib の効果を見るために Jurkat、MOLT4、CEM での stable transformant を作成した。これらの細胞株に bortezomib を作用させるとアポトーシス誘導効果が減弱した。よって miR-155 が誘導されることが T-ALL における bortezomib の細胞死誘導に重要な役割を担っていることが示唆された。

Notch1 はその代表的な標的遺伝子である Hes1 を介して NF- κ B シグナルに影響を及ぼすことが知られている。Hes1 は I κ B kinase 複合体 (IKK) を負に制御する脱ユビキチン化酵素 CYLD に対し、転写抑制因子として働く。T-ALL においては Notch シグナルの恒常的な活性化により Hes1 の発現が上昇し、CYLD が強く抑制される。すると脱抑制された IKK 複合体が I κ B のリン酸化を誘導し、I κ B がプロテアソーム依存性に分解されて NF- κ B が恒常的に活性化される (Espinosa et al., Cancer Cell 18: 268, 2010)。NF- κ B シグナルには canonical pathway と non-canonical pathway が存在し、それぞれ主として p105/p50・RelA(p65) と p100/p52・RelB で構成されている。Canonical pathway のエフェクターにはこれらに加えて c-Rel が存在する。申請者は、T-ALL においてどちらの pathway が主に利用されているかを明らかにするため、T-ALL の核と細胞質における各構成因子のタンパク質発現を検証した。すると p65・p50 は核・細胞質いずれにも発現が見られた。また c-Rel は細胞質のみに発現し、p52・RelB はいずれの分画にも発現が見られなかった。以上の結果から、T-ALL においては canonical pathway の活性化による p65/p50 複合体の核内移行が NF- κ B 活性化の主体と考えられた。T-ALL 細胞株に NICD を強制発現させると bortezomib による p65 発現抑制と NF- κ B 活性低下が rescue されることから、T-ALL において Notch1/Hes1/CYLD/NF- κ B axis が細胞増殖や薬剤耐性に重要な役割を果たしていると考えられた。最近、Notch シグナルと NF- κ B シグナルを関連付ける因子として microRNA が注目されている。miR-155 が NF- κ B シグナルに与える影響について詳細に検討しているところである。

引用文献

1) Koyama, D., Kikuchi, J., Hiraoka, N., Wada, T., Kurosawa, H., Chiba, S. and Furukawa, Y. Proteasome Inhibitors Exert Cytotoxicity and Increase

Chemosensitivity via Transcriptional Repression of Notch1 in T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. Leukemia 28: 1216-1226, 2014.

5) Kikuchi, J., Yamada, S., Koyama, D., Wada, T., Nobuyoshi, M., Izumi, T., Akutsu, M., Kano, Y. and Furukawa, Y. The Novel Orally Active Proteasome Inhibitor K-7174 Exerts Anti-myeloma Activity in Vitro and in Vivo by Down-regulating the Expression of Class I Histone Deacetylases. J. Biol. Chem. 288: 25593-25602, 2013.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計3件)

1) Kikuchi, J., Koyama, D., Wada, T., Izumi, T., Hofgaard, P.O., Bogen, B., and Furukawa, Y.: Phosphorylation-mediated EZH2 Inactivation Promotes Drug Resistance in Multiple Myeloma. J. Clin. Invest. (査読あり) 125: 4375-4390, 2015. DOI: 10.1172/JCI80325.

2) Wada, T., Koyama, D., Kikuchi, J., Honda, H. and Furukawa, Y.: Overexpression of the Shortest Isoform of Histone Demethylase LSD1 Primes Hematopoietic Stem Cells for Malignant Transformation. Blood. (査読あり) 125: 3731-3746, 2015. DOI: 10.1182/blood-2014-11-610907.

3) Koyama, D., Sato, Y., Aizawa, M., Maki, T., Kurosawa, M., Kuro-o, M. and Furukawa, Y.: Soluble aKlotho as a Candidate for the Biomarker of Aging. Biochem. Biophys. Res. Commun. 467: 1019-1025, 2015. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.10.018.

〔学会発表〕(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山 大輔 (KOYAMA Daisuke)

自治医科大学・分子病態治療研究センター

幹細胞制御研究部・客員研究員

研究者番号: 50741071