

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21003

研究課題名(和文)成人T細胞白血病細胞に合成致死を誘導するmicroRNAの同定

研究課題名(英文)Identification of miRNAs inducing synthetic lethality in ATL cells

研究代表者

原 敏文(Hara, Toshifumi)

愛知学院大学・薬学部・助教

研究者番号：80456219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：成人T細胞白血病(ATL)は、ヒトT細胞白血病ウイルス1型の感染を原因とする予後不良のリンパ系悪性腫瘍であり、これまで根治治療薬が開発されていない。我々はATL細胞を選択的に標的として作用を及ぼすマイクロRNA(miRNA)の探索を行った。ゲノムワイドスクリーニングとバイオインフォマティクスを用いた統合解析により、候補miRNAが得られた。miRNAの発現導入により、一部のmiRNAはHTLV-1感染細胞を増殖抑制し、HTLV-1非感染細胞では増殖に影響を与えないことが明らかとなった。以上より、miRNAはATLに対する新たな治療薬の候補分子となりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：Adult T-cell leukemia (ATL) is caused by the infection with Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1). The patients with ATL show a poor prognosis. Effective treatment of ATL has not been established yet. In this project, we attempted to identify the miRNAs selectively affecting the viability of ATL cells. First, we employed a bioinformatics analysis to predict the miRNA which dominantly target the genes required for the survival of HTLV-1-transformed cells. The results of the computational prediction were verified in HTLV-1-transformed cells and HTLV-1-negative human T cell lines. Overexpression of miRNAs reduces the viability of HTLV-1-transformed cells but not HTLV-1-negative cells. These results suggest that certain miRNAs might be a novel therapeutic agent against ATL.

研究分野：腫瘍学

キーワード：ATL miRNA HTLV-1

1. 研究開始当初の背景

(1) 合成致死は、それぞれ単独では致死性を示さない遺伝子の機能異常を同時に持つことによって初めて生じる細胞の致死反応である。癌細胞は、一般にその増殖と生存において特定の癌化シグナルに依存することが知られている。そのため、癌化シグナルと合成致死の関係にある遺伝子の発現やその活性を変動させることにより、理論上では正常細胞の生存には影響を与えずに癌細胞を選択的に死滅させることができる。この合成致死を用いた治療法が新たな癌の治療戦略として注目されている。研究代表者らは、複数の遺伝子の発現を抑制する非コード RNA の一つであるマイクロ RNA (miRNA) に着目し、恒常的活性化型 KRAS 遺伝子変異を発現する癌細胞株を選択的に合成致死へと誘導する miRNA 群を世界に先駆けて同定した (Hara et al. Oncotarget, 2014)。つまり、これまで治療抵抗性であった癌細胞を合成致死に誘導することによって、治療感受性にできることが示唆された。

(2) 成人 T 細胞白血病 (ATL) は、ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) の感染を原因とする予後不良のリンパ系悪性腫瘍である。乳児期に HTLV-1 に感染すると、感染細胞は徐々に宿主ゲノムに変異を蓄積し、およそ 50 年を経て ATL の発症に至る。日本は 110 万人以上の HTLV-1 感染者を抱えており、年間およそ 1,100 人が ATL により死亡している。世界的に見ても日本は ATL の最多発国であり、ATL の根治治療法の確立は日本が率先して進めていくべき重要課題である。しかし、長期潜伏期間に蓄積された様々な遺伝子変異は極めて多様なパターンを示しており、ATL 発症の分子機構に基づいた治療法の確立はこれまで困難を極めている。

2. 研究の目的

難治性悪性リンパ種である ATL は多彩な遺伝子変異を示す一方で、NF- κ B 経路や転写因子 AP-1 の恒常的な活性化、花弁状の核形成などが ATL 細胞では共通して認められる。興味深いことに、ATL で観察される細胞内遺伝子の発現異常は、HTLV-1 ゲノムからコードされる癌タンパク Tax を T 細胞に発現させた状態と類似している。そこで本研究は、ATL 特有のシグナル伝達経路を Tax で模倣した。Tax で活性化した細胞内シグナルと合成致死の関係にある miRNA を明らかにし、その作用機構を明らかにすることで、ATL の根治を目指した新しい治療原理の基盤を築くことを本研究の目的とした。

具体的には、以下の項目を明らかにすることを目的に研究を進めた。

- (1) T 細胞の形質転換に伴う miRNA の発現変動を明らかにする。
- (2) ATL 細胞の生存において重要な遺伝子を明らかにする。

- (3) ATL 細胞の増殖に影響を与える miRNA を予測する。
- (4) miRNA を HTLV-1 感染細胞と非感染細胞でそれぞれ発現させて、miRNA が HTLV-1 感染細胞選択的な作用があるかについて明らかにする。
- (5) ATL 細胞選択的に作用する miRNA の作用機構について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) T 細胞の腫瘍化に伴う miRNA の発現変動を明らかにする。

Tax は、T 細胞を形質転換することがこれまでの研究で明らかとなっている。そこで、ヒト末梢血より、HTLV-1 の標的である CD4 陽性 T 細胞を単離し、レンチウイルスを用いて Tax を発現導入した。Tax を導入した細胞より RNA を抽出し、miRNA の発現変動を、マイクロアレイ法で解析を行った。

(2) ATL 細胞の生存において重要な遺伝子を明らかにする。

CTLL-2 (親株) は、T 細胞増殖因子 (IL-2) に依存した増殖を示すのに対し、Tax を導入することで IL-2 非依存的に増殖する細胞に形質転換する。親株と Tax で形質転換した細胞株をそれぞれ、shRNA ライブラリーを用いて生存スクリーニングした。shRNA ライブラリーの処理直後と処理 5 日後の 2 点において、細胞で発現する shRNA を解析した。ATL 細胞の生存に必要な遺伝子は、shRNA の処理 5 日後の細胞生存率が低下すると考え、処理直後と処理 3 日後の shRNA 発現の比較から、ATL 細胞の生存に必要な遺伝子群を網羅的に明らかにした。

(3) ATL 細胞の増殖に影響を与える miRNA を予測する。

上記スクリーニングの結果から、親株では増殖に影響せず、Tax を強制発現させた T 細胞でのみ増殖に影響を与える遺伝子を選出し、これら遺伝子を標的とする miRNA をバイオインフォマティクスツールにより、予測解析した。

(4) miRNA を HTLV-1 感染細胞と非感染細胞でそれぞれ発現させて、miRNA が HTLV-1 感染細胞選択的な作用があるかについて明らかにする。

バイオインフォマティクスで予測された miRNA を HTLV-1 感染細胞と非感染細胞でそれぞれ強制発現させて、細胞の増殖能が変化するかについて、CCK-8 (Dojindo) を用いて解析した。

(5) ATL 選択的に作用する miRNA の作用機構について明らかにする。

miRNA が作用する遺伝子について、改めて情報解析し、細胞内機能を予測した。予測された細胞内機能について、miRNA を発現させた

後に、フローサイトメトリーを用いてその変動について解析を行った。
本研究計画は、新潟大学医学部倫理委員会で承認の下、ヒトサンプルを用いて実施された。

4. 研究成果

(1) T細胞の形質転換に伴う miRNA の発現変動解析

成人末梢血より CD4 陽性 T 細胞を単離し、以下の 4 サンプルを用意した。未刺激状態 anti-CD3/CD28 抗体を用いて活性化させたもの(正常活性化状態) 活性化後に、コントロールのレンチウイルスを感染させたもの(感染コントロール) 活性化後に Tax を発現するレンチウイルスを感染させたもの(Tax による形質転換状態)。これらサンプルより低分画 RNA を抽出した。4 つの RNA サンプルを用いて、マイクロアレイ法により、miRNA の発現変動を解析した。正常活性化状態と Tax による形質転換状態では、miRNA 発現に大きな差があることが分かった(図 1)。

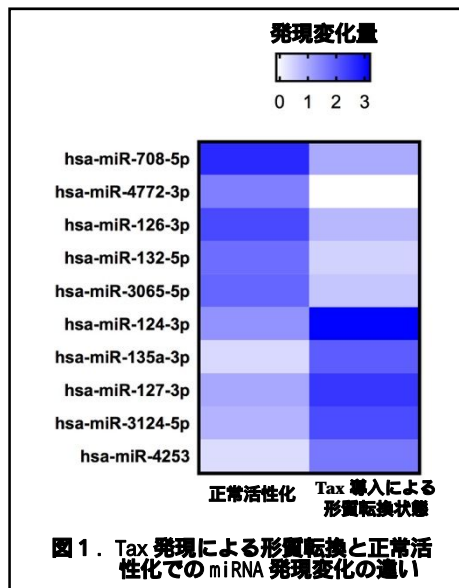


図 1. Tax 発現による形質転換と正常活性化での miRNA 発現変化の違い

つまり、T 細胞では正常活性化シグナルと Tax による形質転換シグナルでは、異なる細胞シグナルパスウェイが活性化していることが示唆され、通常の活性化には影響を与えず、ATL 選択的なシグナルを標的とできる可能性を見出した。

(2) ATL 細胞の生存において重要な遺伝子を明らかにする。

ATL の生存で重要な働きをする遺伝子群を明らかにするため、shRNA ライブラリーを用いて生存スクリーニングアッセイを行った(図 2)。

図 2 の A で示すように、shRNA を用いた遺伝子抑制は、親細胞と Tax による形質転換細胞で作用の差異は認められなかった。しかし、図 2 の B で示される shRNA は、親細胞の増殖に影響を与えない一方で、Tax で形質転換した細胞の増殖を抑制している。つまり、これら shRNA に対応する遺伝子は、ATL 細胞の生

存で選択的に重要な遺伝子であることを示唆している。

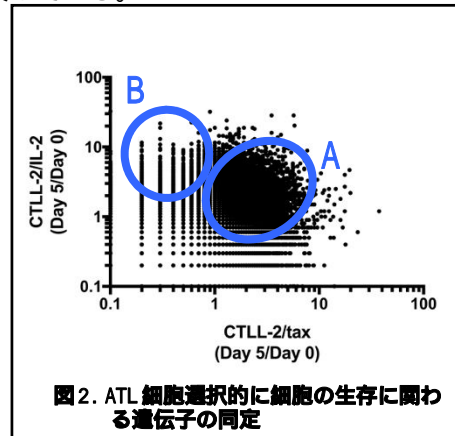


図 2. ATL 細胞選択的に細胞の生存に関わる遺伝子の同定

(3) ATL 細胞の増殖に影響を与える miRNA を予測する。

図 2 の B に含まれる上位 200 遺伝子を対象にして、これら遺伝子を標的とする miRNA について、バイオインフォマティクスツール(miRWalk2.0:

<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/>)を用いて予測解析した。その結果、3 つの miRNA が 200 遺伝子のうち 20 遺伝子以上を標的とすることが予測された。また、10 遺伝子以上を標的とする 10 種類の miRNA が予測された。つまり、これら miRNA を ATL 細胞に発現させると、ATL の増殖や生存に影響を与えることが予想される。

(4) miRNA を HTLV-1 感染細胞と非感染細胞でそれぞれ発現させて、miRNA が HTLV-1 感染細胞選択的な作用があるかについて明らかにする。

ATL の増殖や生存に影響を与えることが予想された miRNA を HTLV-1 非感染 T 細胞株 Jurkat と HTLV-1 感染細胞株 MT-4 でそれぞれ強制発現させて、細胞の増殖能を調べた(図 3)。効果を調べた 7 つの miRNA のうち、1 つの miRNA(論文発表前のため miRNA-X とする)が、HTLV-1 感染細胞選択的かつ優位に細胞の増

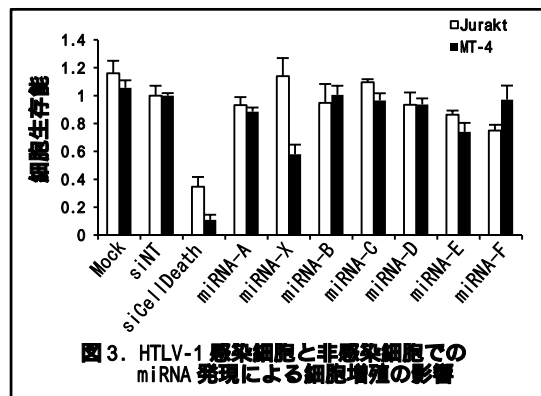


図 3. HTLV-1 感染細胞と非感染細胞での miRNA 発現による細胞増殖の影響

殖を抑制することが分かった。2 つの miRNA(miRNA-C、miRNA-E)も HTLV-1 感染細胞を選択的に増殖抑制する傾向はあったものの、その効果は弱かったため、miRNA-X を注目すべき miRNA として、その作用機構につい

て解析を進めた。

(5) ATL 選択的に作用する miRNA の作用機構について明らかにする。

ATL 細胞に対する miRNA-X の作用を調べるため、細胞のアポトーシス状態と細胞周期の状態をフローサイトメトリー法により解析した。興味深いことに、miRNA-X の発現は MT-4 にアポトーシスを誘導していなかった。しかしながら、miRNA- を発現させた細胞では細胞周期が休止期に誘導されていた。つまり、miRNA-X の発現は MT-4 の細胞周期に影響を与えることで、MT-4 の増殖を抑制していることが明らかとなった。また、ATL 細胞の生存に関わる遺伝子のうち、miRNA-X の標的遺伝子として予測された 20 遺伝子のオントロジー解析をした結果、これら遺伝子が細胞周期関連遺伝子として機能することが示唆された。つまり、miRNA-X の細胞内機能の解析結果は、情報学的解析により裏付けられた。

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Higuchi M, Kawamura H, Matsuki H, Hara T, Takahashi M, Saito S, Saito K, Jiang S, Naito M, Kiyonari H, Fujii M. USP10 Is an Essential Deubiquitinase for Hematopoiesis and Inhibits Apoptosis of Long-Term Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 7; 1116-1129 (2016) 査読有, DOI: 10.1016/j.stemcr.2016.11.003.
2. Mizuguchi M, Sasaki Y, Hara T, Higuchi M, Tanaka Y, Funato N, Tanaka N, Fujii M, Nakamura M. Induction of Cell Death in Growing Human T-Cells and Cell Survival in Resting Cells in Response to the Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax. *PLoS One*, 11: e0148217 (2016) 査読有, DOI: 10.1371/journal.pone.0148217.
3. Motai Y, Takahashi M, Takachi T, Higuchi M, Hara T, Mizuguchi M, Aoyagi Y, Terai S, Tanaka Y, Fujii M. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax1 oncoprotein but not HTLV-2 Tax2 induces the expression of OX40 ligand by interacting with p52/p100 and RelB. *Virus Genes*, 52: 4-13 (2016) 査読有, DOI: 10.1007/s11262-015-1277-7.
4. Hara T, Mizuguchi M, Fujii M, Nakamura M. Krüppel-like factor 2 represses transcription of the telomerase catalytic subunit human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in human T cells. *J Biol Chem*, 294: 8758-8763 (2015) 査読有, DOI: 10.1074/jbc.M114.610386.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Hara T, Mizuguchi M, Fujii M, Nakamura M. Dynamic regulation of telomerase gene expression through the transcription factor KLF2 in human T cells. EMBL Symposia 2016 -The Complex Life of mRNA-, 2016 年 10 月 5 日-8 日、EMBL Heidelberg(ドイツ・ハイデルベルグ)
2. Mizuguchi M, Hara T, Yoshita-Takahashi M, Tanaka Y, Fukushima T, Nakamura M. DNA methylation of the Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) Promoter in Human T-cell Leukemia Virus Type-1 (HTLV-1) Infected T-cells. The 5th JCA-AACR Special Joint Conference, 2016 年 7 月 13 日-15 日、東京ベイ舞浜ホテルクラブリゾート(千葉県・浦安市)
3. Hara T, Fujii M. Identification of miRNAs inducing synthetic lethality in ATL cells. 第 41 回内藤コンフェレンス、2016 年 7 月 5 日-8 日、シャトレーゼガトーキングダムサッポロ(北海道・札幌市)
4. 藤井雅寛、罇陽介、原敏文、樋口雅也、高橋雅彦. HTLV-1 の Tax1 は HTLV-2 の Tax2 とは異なる細胞遺伝子の発現を NF-κB2 を介して誘導する。第 2 回日本 HTLV-1 学会 学術集会、2015 年 8 月 21 日-23 日、東京大学医科学研究所 講堂(東京都・港区)
5. 原 敏文、Ashish Lal. miR-126 は変異型 KRAS 細胞を選択的に増殖抑制する。第 17 回日本 RNA 学会年会、2015 年 7 月 15 日-17 日、ホテルライフオーツ札幌(北海道・札幌市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)
取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 敏文(Hara, Toshifumi)
愛知学院大学・薬学部・助教
研究者番号: 80456219