

令和 3 年 6 月 19 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09914

研究課題名(和文)リンパ腫におけるcircRNA/miRNAの病態関与

研究課題名(英文)Functional analysis of circ/miRNA in malignant lymphoma

研究代表者

田川 博之(TAGAWA, HIROYUKI)

秋田大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：30373492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：CircRNAは環状のnon coding RNAであり、miRNAを相補配列に吸着して発現異常をおこさせる。我々は、腫瘍細胞維持に必要ないくつかのcircRNA候補を同定しその下流miRNAの変化を検討しB細胞リンパ腫で発現が低下するcircRNAとして、circ-MT01を同定した。circ-MT01はがん遺伝子であるmiR-17、miR-20を吸着する。したがって同circRNAの発現低下は、miR-17、miR-20の異常な発現上昇を引き起こすとして、miR-17、20の発現上昇の伴い、その標的蛋白であるがん抑制遺伝子PTENの発現が低下することが推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の研究はcircRNAのがん生物学的な意義を初めて明らかにする試みであり、がんとcircRNAに関する新分野を開拓できる。そのことにより従来の解析法では一部未知であったリンパ腫をはじめとするがんの病態解明に大きな前進を与える。本研究課題は、新しい治療法や診断法の開発のシーズとして産業的、経済的に大きな潜在性を有しており、また機序の解明は社会的に大きなインパクトを与えることができる。

研究成果の概要(英文)：Circular RNA is a circular non-coding RNA that adsorbs miRNA to complementary sequences and causes abnormal expression. We identified several circRNA candidates required for tumor cell maintenance, examined changes in their downstream miRNAs, and identified circ-MT01 as a circRNA whose expression is reduced in B-cell lymphoma. circ-MT01 adsorbs the oncogenes miR-17 and miR-20. Therefore, It was speculated that the decreased expression of the circRNA causes an abnormal increase in the expression of miR-17 and miR-20, with the expression of the tumor suppressor gene PTEN, which is the target protein of these miRNAs.

研究分野：造血器腫瘍

キーワード：circRNA malignant lymphoma

## 1. 研究開始当初の背景

Circular RNA (circRNA)は、機能が不明な謎の環状 RNA として以前から知られていた。最近ヒト、マウス、線虫などの RNA の網羅的塩基配列解析によって 1900 個の circRNA が同定され (Memczak et al., 2013 Nature)、その後の解析で約一万個の circRNA がヒト生体内にも存在することが明らかになった。CircRNA は non-coding RNA(ncRNA)である microRNA(miRNA, miR)を「吸着」する機能をもつ。Memczak らの nature の報告では circRNA CDR1as は miR-7 を吸着し、その機能を阻害することでゼブラフィッシュの中脳の発達を阻害する(この場合 miR-7 は定量 PCR で高発現するが、実際は機能しない)。ごく最近、circRNA は、miRNA を吸着するだけでなく、がんにおける遺伝子転座の fusion 蛋白の副産物として、化学療法に耐性をもたらすことも明らかとなっている (Guarnerio et al., 2016 Cell)。このように 2016 年になって、circRNA とがんとの密接な関わりが報告されるようになってきた。研究代表者はこれまで責任研究者として、世界に先駆けて miRNA の異常発現とリンパ腫の腫瘍病態の密接な関わりを解明し、多数の学術専門誌にその成果を報告してきた。例えば、がん促進的 miRNA である miR-17-92 の B リンパ腫における異常発現を世界で初めて同定し (Ota, Tagawa et al., 2004 Cancer Res; Tagawa et al., 2005 Leukemia)、p21 や Bim を制御しがん化する機序を証明した (Inomata, Tagawa et al., 2009 Blood)。また、NK/T 細胞リンパ腫における複数の miRNA の発現異常が AKT シグナルを活性化することで腫瘍化を促進することや (Yamanaka, Tagawa et al., 2009 Blood; Watanabe, Tagawa et al., 2011 Leukemia; Ito et al., 2014 Blood)、最近では皮膚 T 細胞リンパ腫において miR-16 が p53 と協調し「細胞老化」を誘導することを報告した (Kitadate et al., 2016 Oncogene)。がんにおける miRNA 発現の調整機構として、Myc などの転写因子の関与やゲノム構造異常が報告されているが、その多くはまだ明らかにされていない。CircRNA は miRNA を吸着しその機能を抑制することから、その発現異常により、miR-16 などの、特に、がん抑制的 miRNA の調節異常に関与する可能性が高い。例えば、miR-16 を吸着しうる circRNA として、予測プログラム (Glaser et al., 2013 RNA) から 106 個の候補が抽出されるが、そのうち 12 個の circRNA はマンツル細胞リンパ腫 (MCL) におけるゲノム異常増幅領域 (Tagawa et al., 2005 Oncogene) と一致していた。また、細胞株でその発現を定量 PCR で検討すると、通常対応細胞より 100 倍以上高発現していた。miR-16 は T 細胞リンパ腫では発現低下しているが、MCL (B 細胞リンパ腫) では過剰発現していた (Teshima et al., 2014 Oncogene)。したがって、この発現上昇は「みかけ上」のものに過ぎず、実際は circRNA に吸着されてがん抑制的 miRNA としての機能が死活していると予想され、circRNA のリンパ腫造腫瘍性の関与が強く示唆された。また、最近、他のグループ (Zheng et al., 2016 Nat Comm) は、27000 の circRNA 候補のなかの一つ circHIPK3 が 9 つの miRNA を吸着し、細胞増殖を抑制することを見出している。今後、circRNA が吸着する miRNA と発がんの報告が加速していくと考えられる。蛋白をコードしない non-coding RNA(ncRNA) のなかには、microRNA(miRNA) を始めとする小分子機能 RNA がある。今世紀に入って、それらの分子細胞生物学的な役割が次々と明らかになっており、miRNA の調節異常がリンパ腫の病態に密接に関わることも、研究代表者ら

の研究により明らかとなっている。最近、小分子機能的(環状)RNAであるCircular RNA(以下 circRNA)が、miRNAを「吸着」する機能をもつことが明らかにされた。circRNAを介したmiRNA調節異常がリンパ腫病態に関わることが強く推測されるが、circRNAと発がんの研究はほとんどなされていない。

## 2. 研究の目的

本研究は、「リンパ腫造腫瘍性に影響を与える circRNA を同定し、circRNA-miRNA 相互作用のリンパ腫病態 への関与を解明する」ことを目的とする。

## 3. 研究の方法

リンパ腫細胞(n=59)の維持に重要な circRNA のスクリーニング: 前頁に記載したライブラリデザインから約 5000 個の circRNA に対する約 15,000 個 sh-RNA を含むレンチウイルスベクターを H27-28 年度にかけて既に作製している。図 3 に pLK0 システムを用いた レンチウイルスライブラリ作製とその作用経路を示す。

1. 対象となるリンパ腫細胞株に(細胞:ウイルス=1:1)の感染(MOIO.3-0.4)が起こるように、約 15,000 種の sh-RNA を同時に感染させる。予備実験により必要な最低細胞数は 15,000 sh-RNA x 200 回 =  $3 \times 10^6$  細胞であることが予備実験によりわかっている。感染した細胞株を継代世代ごとにサンプル採取し genomic DNA を抽出(図 4)、それぞれの sh-RNA が持つ固有のバーコード配列を次世代シーケンサーで比較する。
2. どの sh-RNA が感染集団から喪失しているか、すなわち腫瘍細胞を死に至らしめるかを継時的 データから抽出し、腫瘍維持に重要な役割をもつ circRNA を同定する。得られた候補 circRNA に対し発現解析を行う。
3. Total RNA から合成した cDNA をテンプレートとし Divergent primer(mRNA 上で外向きに遠ざかる方向に設定した primer)を用いて定量 PCR を用いて行い、正常対応細胞と細胞株間の circRNA 発現差を検討する(次ページ図 5)。次ページ図 6 に実験・研究のまとめを示す。
4. 上記複数の方法を用いて絞り込まれた候補 circRNA について、次年度以降で機能解析を行う。
5. CircRNA の機能評価と sh-RNA による腫瘍抑制効果の検討:
6. 予測プログラムや miRNA 発現解析を用いて、候補 circRNA に吸着される miRNA を推定し、腫瘍細胞維持に与える影響について検討する。特定の circRNA は予測サイトで、どの miRNA が吸着の可能性があるかわかる。それらの miRNA の変異を組み込んだ luciferase vector を構築し、その活性を検討することで、実際に吸着される miRNA を特定することができる。腫瘍維持に中心的な役割を担う治療標的になりうる候補分子について、circRNA の siRNA や、circRNA の標的 miRNA を組み込んだ腫瘍細胞を使用した下流蛋白発現変動や、アポトーシス、細胞増殖、細胞老化、臓器浸潤などの in vitro の検討の他に、免疫不全マウス(NOG)へ移植し、がん抑制効果の in vivo 検討を行う。
7. 臨床検体での定量的発現解析等:

8. CircRNA の q-PCR を用いた定量解析法を確立し、サブタイプの異なる 200 以上の臨床検体の circRNA 定量測定を行い、検体の蓄積されたデータに基づき circRNA の発現と予後、治療反応性、ことなるサブタイプと発現の相関を検討する。これらの実験により、リンパ腫における「CircRNA-miRNA-mRNA-標的蛋白」作用の解明が期待できる。

#### 4. 研究成果

研究代表者は小分子 RNA である circRNA/miRNA の研究を主に B 細胞リンパ腫を対象に行なった。circRNA は環状の non coding RNA であり、miRNA を相補配列に「吸着」して発現異常をおこさせる。平成 28 年度(2016 年度)からの circRNA スクリーニングによって得られたいくつかの circRNA 候補を同定した。平成 30 年度(2018 年度)は、予測プログラムや miRNA 発現解析を用いて、候補 circRNA に吸着される miRNA を推定し、腫瘍細胞維持に与える影響について検討した。また腫瘍維持に中心的な役割を担う治療標的になりうる候補分子について、circRNA の標的 miRNA を組み込んだ B 細胞リンパ腫の腫瘍細胞を使用して下流蛋白発現変動、アポトーシス、細胞周期の変化を検討した。平成 31 年度(2019 年度)は、50 臨床検体の circRNA 定量測定を行い、検体の蓄積されたデータに基づき circRNA の発現を検討した。研究代表者は B 細胞リンパ腫で発現が低下する circRNA として、circ-MT01 (hsa\_circ\_0007874)を同定した。また令和元年(平成 31 年度、2019 年度)には、circ-MT01 は miR-17、miR-20 を吸着することが明らかにした。したがって、同 circRNA の発現低下は、miR-17、miR-20 の異常な発現上昇を引き起こすと考えられた。miR-17、20 の発現上昇は、B 細胞リンパ腫において 13 番染色体 q31(13q31)のゲノム構造異常(ゲノムコピー数の増幅)によっても生じるが(Ota A, Tagawa H et al., Cancer Res 2004)、circMT01 の発現低下症例は 13q31 のゲノム増幅を生じていなかった。つまり circMT01 の発現低下と 13q31 の増幅は「互いに相補的、mutually exclusive」な関係であった。miR-17、20 の発現上昇の伴い、その標的蛋白である PTEN は発現が低下することも明らかにした。現在 circMT01 の強制発現の実験を B リンパ腫細胞株に対して行っており、その結果 PTEN の発現が回復することを見出した。これらの結果は論文化し現在海外学術雑誌に投稿予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ikeda S, Kitadate A, Abe F, Takahashi N, Tagawa H.	4. 巻 2(4)
2. 論文標題 Hypoxia-inducible KDM3A addiction in multiple myeloma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 323-334
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/bloodadvances.2017008847.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ikeda S, Kitadate A, Abe F, Saitoh H, Michishita Y, Hatano Y, Kawabata Y, Kitabayashi A, Teshima K, Kume M, Takahashi N, Tagawa H.	4. 巻 108(4)
2. 論文標題 Hypoxia-inducible microRNA-210 regulates the DIMIT1-IRF4 oncogenic axis in multiple myeloma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 641-652.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13183.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kitadate A, Ikeda S, Abe F, Takahashi N, Shimizu N, Matsue K, Tagawa H.	4. 巻 103(1)
2. 論文標題 Histone deacetylase inhibitors downregulate CCR4 expression and decrease mogamulizumab efficacy in CCR4-positive mature T-cell lymphomas.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 126-135.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3324/haematol.2017.177279.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kawamoto K, Miyoshi H, Suzuki T, Kozai Y, Kato K, Miyahara M, Yujiri T, Oishi N, Choi I, Fujimaki K, Muta T, Kume M, Moriguchi S, Tamura S, Kato T, Tagawa H, Makiyama J, Kanisawa Y, Sasaki Y, Kurita D, Yamada K, Shimono J, Sone H, Takizawa J, Seto M, Kimura H, Ohshima K.	4. 巻 103(6)
2. 論文標題 A distinct subtype of Epstein Barr virus positive T/NK-cell lymphoproliferative disorder: Adult patients with chronic active Epstein Barr virus infection-like features.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 1018-1028
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3324/haematol.2017.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 keda S, Abe F, Matsuda Y, Kitadate A, Takahashi N, Tagawa H.	4. 巻 111(11)
2. 論文標題 Hypoxia-inducible hexokinase-2 enhances anti-apoptotic function via activating autophagy in multiple myeloma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4088-4101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14614.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Tagawa Hiroyuki
2. 発表標題 Role of miRNA in malignant lymphoma
3. 学会等名 アジア太平洋がん学会 (APCC in Soul) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------