

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17867

研究課題名(和文) マントル細胞リンパ腫におけるmir17-92クラスターの網羅的機能解析と治療開発

研究課題名(英文) mir-17-92 cluster in mantle cell lymphoma

研究代表者

塚本 拓 (Tsukamoto, Taku)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50825049

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではマントル細胞リンパ腫(MCL)において、がん関連micro RNA(miRNA)であるmir-17-92 cluster高発現の機能的意義を明らかにするため、mir-17-92 clusterの標的分子の同定に取り組んだ。その結果、BTG2やFC 受容体遺伝子等の、MCLの病態形成に重要とされるB細胞受容体シグナルの抑制遺伝子を複数同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マントル細胞リンパ腫におけるB細胞受容体シグナル活性化機序の解明は、同経路の標的治療抵抗性獲得という臨床上的アンメットニードの克服において重要な課題であるが、本研究においてその知見の一端を明らかにできたことは、今後のマントル細胞リンパ腫における治療成績向上に寄与する可能性を有している。かねてから、様々ながんの発生・病態形成に重要な役割をはたすとされるがん関連micro RNA mir-17-92 clusterの標的分子の網羅的解析結果は、MCLのみならず多くの悪性腫瘍の病態解明につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：To uncover the targets of mir-17-92, an oncogenic micro RNA cluster, in mantle cell lymphoma, we performed unbiased sequencing analysis using pull-down method with micro RNA mimics. We identified some mir-17-92 cluster target genes involved in B cell receptor signaling, i.e., BTG2 and FCGR2A/B.

研究分野：血液内科学

キーワード：マントル細胞リンパ腫 B細胞受容体シグナル mir-17-92 cluster Pulldown-seq

## 1. 研究開始当初の背景

マンツル細胞リンパ腫(MCL)は既存治療では治癒困難なB細胞性リンパ腫であり、分子病態の解明による新規治療戦略開発が喫緊の課題である。B細胞受容体(B cell receptor; BCR)シグナルは、正常B細胞の分化・成熟に不可欠なB細胞特異的なシグナル経路である。B細胞性リンパ腫(B cell lymphoma; BCL)は、種々の分化段階のB細胞を発生母地とする造血器悪性腫瘍であり、発生母地や分子生物学的異常の異同により多くの細病型が存在するが、多くのBCL病型の発症と病態形成において、BCRシグナルと下流のNF- $\kappa$ B経路活性の異常活性化が関与する。なかでも、BCLの高頻度3病型であるびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫、濾胞性リンパ腫、濾胞辺縁帯リンパ腫では、*CD79A/CD79B*や*MYD88*, *CARD11*, *TNFAIP3*等のBCR-NF- $\kappa$ Bシグナル経路を構成する様々な遺伝子に高頻度に異常が生じ、その活性化の原因となることが知られている。一方、マンツル細胞リンパ腫(Mantle cell lymphoma; MCL)は、免疫化学療法による治療効果が不十分な難治病型である。MCLの発生源は胚中心B細胞より前段階にあるナイーブB細胞であるが、興味深いことに、通常、抗原刺激の生じていない正常ナイーブB細胞ではBCRシグナルの活性は低いのに対し、MCLでは疾患特異的にBCRが過剰活性化しており、病態形成を促進している。mir-17-92 clusterはmiR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b, miR-92aの6つのmicroRNA(miRNA)から成る。“Onco-mir”とも呼ばれるように、がん関連miRNAとして、悪性リンパ腫においても、MCLやBurkittリンパ腫の臨床検体において発現亢進がみられ、一部のmiRNAは予後とも相関するとされる。われわれは、研究開始時の事前検討よりmir-17-92 clusterの過剰活性化が、MCLにおけるBCRシグナル活性化の原因となりうる可能性を見出した。

## 2. 研究の目的

本研究ではMCLにおけるmir-17-92 clusterの網羅的な標的分子探索と機能解析を通じてBCRシグナル活性化の分子メカニズムの全貌を明らかにし、より効果的な新規BCR標的化治療戦略の開発にむけた基盤的研究を行うことを目的とした。

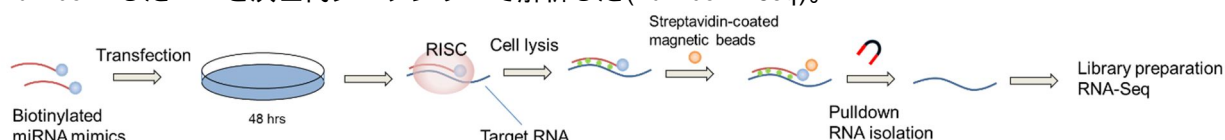
## 3. 研究の方法

### (1)mir-17-92 cluster 過剰発現機構に関する検討

MCLにおける疾患的な遺伝子発現制御異常を明らかにすべく、正常リンパ球およびMCL細胞株におけるヒストンアセチル化をChIP-Seqの結果から検討した。またSOX11をshRNAでノックダウン

### (2)mir-17-92 cluster 標的分子の探索

mir-17-92 clusterを構成する個々のmiRNAの標的RNAを明らかにするため、ビオチン標識miRNAをMCL細胞株(MINO, Z138)およびHEK293T細胞に導入し、ストレプトアビジンビーズを用いてPull-downしたRNAを次世代シーケンサーで解析した(Pull-down-Seq)。



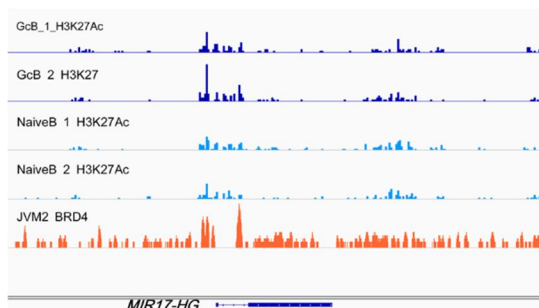
### (3)mir-17-92 cluster のBCRシグナルへの関与

候補化されたmir-17-92 cluster標的遺伝子のBCRシグナル過剰活性化への関与に関して、遺伝子ノックダウン実験にて*in vivo*レベルで検証した。MCLは希少疾患のため、公開されている臨床検体のマイクロアレイデータ(Gene Expression Omnibus #GSE93291)を用いた解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1)mir-17-92 cluster 過剰発現機構に関する検討

mir-17-92 clusterがMCLで高発現していることは既報より明らかにされているが、その異常発現の機構に関しては明らかにされていない。正常リンパ組織の胚中心B細胞、ナイーブB細胞と、MCL細胞株のChIP-Seqの結果から、MCLは正常発生母地であるナイーブB細胞と異なり、*MIR17-HG*遺伝子エンハンサー領域において病的にヒストン高アセチル化がみられ、mir-17-92 clusterの重要な発現制御機構と考えられた。なお、MCLで疾患特異的高発現がみられる転写因子SOX11は、shRNAによるノックダウン実験より細胞増殖が抑制されるものの、定量PCRの結果からmir-17-92 clusterへの発現制御の関与は見られなかった。



### (2) mir-17-92 cluster 標的分子の探索

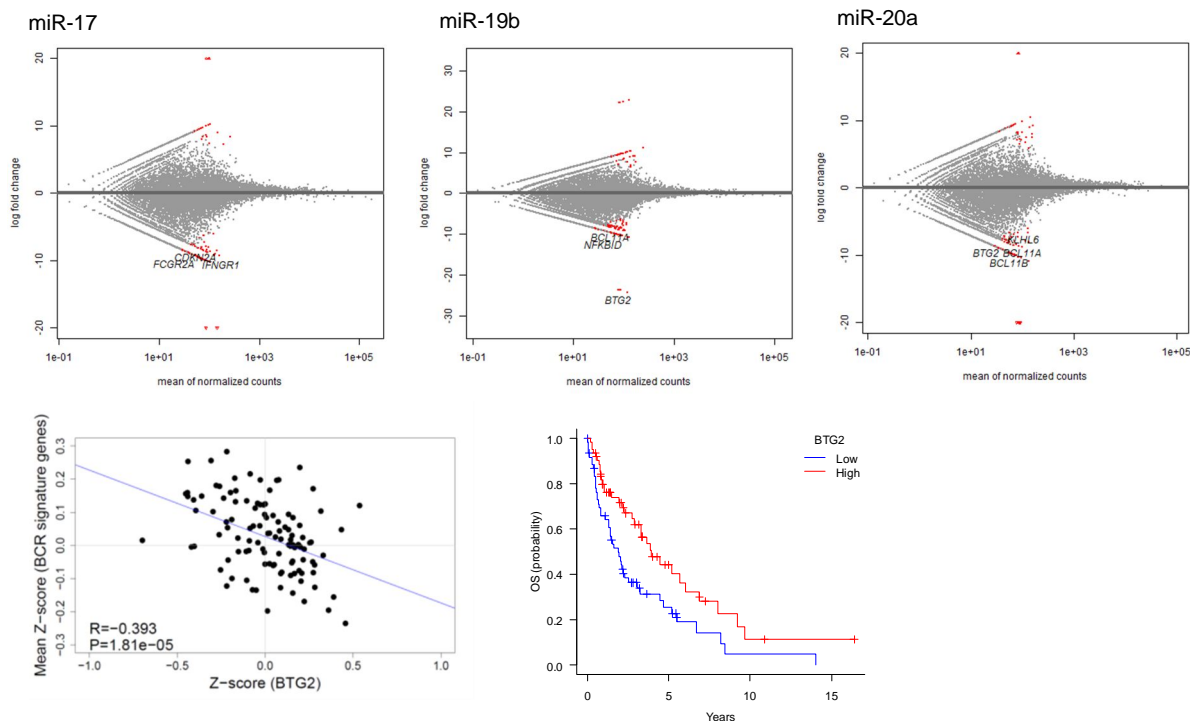
個々のmir-17-92 clusterの生物学的意義、標的分子を明らかにするため、ビオチン標識miRNA

を用いた Pull-down-Seq 技術による検証を行った。各々の miRNA の標的 RNA のプロファイルは MCL 細胞と 293T 細胞で異なっており、miRNA の標的は組織によって異なることが示唆された。

### (3) mir-17~92 cluster の BCR シグナルへの関与

MCL 細胞における miR-17 の標的として、FC 受容体遺伝子等の B 細胞受容体 (BCR) シグナルの抑制分子が同定された。興味深いことに、他のがん種で腫瘍抑制遺伝子として報告されている *BTG2* が mir-17~92 cluster の複数の miRNA の標的になっており、臨床検体における BCR シグナル関連分子の発現と負の相関関係を有していた。また *BTG2* の低発現は有意に予後不良であった。これらの結果は、mir-17~92 cluster 過剰発現が種々の BCR 抑制分子を負に発現制御することで、結果的に BCR シグナルを過剰活性化することを示唆する結果と考えられた。

これらの知見にもとづき、現在、mir-17~92 cluster が標的とする BCR 抑制分子の発現状態の臨床的意義の検証、ならびに *in vitro* での発現制御実験を通して、新たな治療標的としての可能性を探索すべく、研究を継続して遂行している。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 TSUKAMOTO TAKU, NAKAHATA SHINGO, SATO RYUICHI, KANAI AKINORI, NAKANO MASAKAZU, CHINEN YOSHIKI, MAEGAWA-MATSUI SAORI, MATSUMURA-KIMOTO YAYOI, TAKIMOTO-SHIMOMURA TOMOKO, MIZUNO YOSHIMI, KUWAHARA-OTA SAEKO, KAWAJI YUKA, TANIWAKI MASAFUMI, INABA TOSHIYA, TASHIRO KEI, MORISHITA KAZUHIRO, KURODA JUNYA	4. 巻 17
2. 論文標題 BRD4-Regulated Molecular Targets in Mantle Cell Lymphoma: Insights into Targeted Therapeutic Approach	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Genomics - Proteomics	6. 最初と最後の頁 77 ~ 89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/cgp.20169	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 Kuwahara Ota Saeko, Shimura Yuji, Steinebach Christian, Isa Reiko, Yamaguchi Junko, Nishiyama Daichi, Fujibayashi Yuto, Takimoto Shimomura Tomoko, Mizuno Yoshimi, Matsumura Kimoto Yayoi, Tsukamoto Taku, Chinen Yoshiaki, Kobayashi Tsutomu, Horiike Shigeo, Taniwaki Masafumi, G?tschow Michael, Kuroda Junya	4. 巻 191
2. 論文標題 Lenalidomide and pomalidomide potently interfere with induction of myeloid derived suppressor cells in multiple myeloma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Haematology	6. 最初と最後の頁 784 ~ 795
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjh.16881	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Matsumura Kimoto Yayoi, Tsukamoto Taku, Shimura Yuji, Chinen Yoshiaki, Tanba Kazuna, Kuwahara Ota Saeko, Fujibayashi Yuto, Nishiyama Daichi, Isa Reiko, Yamaguchi Junko, Kawaji Kanayama Yuka, Kobayashi Tsutomu, Horiike Shigeo, Taniwaki Masafumi, Kuroda Junya	4. 巻 9
2. 論文標題 Serine 227 in the N terminal kinase domain of RSK2 is a potential therapeutic target for mantle cell lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 5185 ~ 5199
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.3136	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Fujibayashi Yuto, Isa Reiko, Nishiyama Daichi, Sakamoto-Inada Natsumi, Kawasumi Norichika, Yamaguchi Junko, Kuwahara-Ota Saeko, Matsumura-Kimoto Yayoi, Tsukamoto Taku, Chinen Yoshiaki, Shimura Yuji, Kobayashi Tsutomu, Horiike Shigeo, Taniwaki Masafumi, Handa Hiroshi, Kuroda Junya	4. 巻 12
2. 論文標題 Aberrant BUB1 Overexpression Promotes Mitotic Segregation Errors and Chromosomal Instability in Multiple Myeloma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2206 ~ 2206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12082206	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Nishiyama Daichi, Chinen Yoshiaki, Isa Reiko, Fujibayashi Yuto, Kuwahara-Ota Saeko, Yamaguchi Junko, Takimoto-Shimomura Tomoko, Matsumura-Kimoto Yayoi, Tsukamoto Taku, Shimura Yuji, Kobayashi Tsutomu, Horiike Shigeo, Taniwaki Masafumi, Handa Hiroshi, Kuroda Junya	4. 巻 113
2. 論文標題 EWSR1 overexpression is a pro-oncogenic event in multiple myeloma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 381 ~ 394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-020-03027-0	査読の有無 有
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0件

〔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
---------	---------