

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 20 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591191

研究課題名（和文） 悪性リンパ腫の microRNA 発現異常の探索、診断と治療法への応用

研究課題名（英文） Detection of aberrant miRNA expression of malignant lymphoma

研究代表者

田川 博之 (TAGAWA HIROYUKI)

秋田大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：30373492

研究成果の概要（和文）：

microRNA は、蛋白に翻訳されない、non coding の regulatory miRNA である。我々はこの小分子 RNA が造血器腫瘍でどのように働いているのかを探索してきた。特に、責任遺伝子が明らかでない NK/T 細胞リンパ腫を中心に、microRNA の網羅的解析を行って miR-21 と miR-155 の過剰発現ならびに miR-150 の発現低下を見いだした。miR-21 は PTEN を miR-155 は SHIP1 を downregulation させることによって AKT の活性化を来すことを明らかにした。また、miR-150 の発現低下によって AKT2 の発現上昇が来され細胞の不死化に関与することを明らかにした。これらの成果はそれぞれ blood 誌、leukemia 誌に報告した。また、B 細胞リンパ腫では miR-17-92 の発現上昇を来することが多いが、miR-17 と miR-20 が p21 を制御していることも明らかにし、blood 誌に報告している。

研究成果の概要（英文）：

MicroRNA (miRNA; miR) is a class of small regulatory RNA molecules, the aberrant expression of which can lead to the development of cancer. We recently reported that overexpression of miR-21 and/or miR-155 leads to activation of the PI3K-AKT pathway in malignant lymphomas expressing CD3⁺CD56⁺ natural killer (NK) cell antigen. Through expression analysis, we show here that in both NK/ T-cell lymphoma lines and samples of primary lymphoma, levels of miR-150 expression are significantly lower than in normal NK cells. To examine its role in lymphomagenesis, we transduced miR-150 into NK/T-cell lymphoma cells, which increased the incidence of apoptosis and reduced cell proliferation. Moreover, the miR-150 transductants appeared senescent and showed lower telomerase activity, resulting in shortened telomeric DNA. We also found that miR-150 directly downregulated expression of *DKC1* and *AKT2*, reduced levels of phosphorylated AKT^{ser473/4}, and increased levels of tumor suppressors such as Bim and p53. Collectively, these results suggest that miR-150 acts as a tumor suppressor, and that its aberrant downregulation induces continuous activation of the PI3K-AKT pathway, leading to telomerase activation and immortalization of cancer cells. These findings provide new insight into the pathogenesis of malignant lymphoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000

年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：血液内科学

科研費の分科・細目：造血器腫瘍

キーワード：microRNA, NK/T cell lymphoma

1. 研究開始当初の背景

MicroRNAは 20-24 ヌクレオシドからなる non-coding RNA であり、動物、植物、ウイルスなどに広く見つかっている。この低分子RNAは、ヒト遺伝子の 1/3 以上の発現を調節していると考えられている。MicroRNAは標的遺伝子の 3'UTR (3' Un-Translated Region: 非翻訳領域)にある相補配列に部分的に結合することにより、その遺伝子の発現を遺伝子発現レベルまたは、転写レベルで抑制する。MicroRNAが正常に働く場合は、生態の分化発達に重要な役割を担う。しかし、がん細胞などで過剰発現を来たす場合は、本来抑制されるべきでないがん抑制遺伝子などの発現低下を来たし、その結果、がんの発達や進展を増進すると考えられる。

研究代表者は、アレイCGH法を用いて種々の悪性リンパ腫に対してゲノムコピー数異常の解析を行ってきた。そして、染色体 13q31-q32 でゲノム異常増幅が頻繁に生じていることを見出し、さらに同領域から、C13orf25 遺伝子を世界で始めて同定した (Ota, Tagawa et al., **Cancer Res 2004**)。C13orf25 遺伝子は蛋白をコードしない non-coding 遺伝子であったが、遺伝子内に 7 つの microRNA を含んでいた (miR-17-5p, 17-3p, 18, 19a, 19b, 20, 92) (Tagawa et al., **Leukemia 2005**)。従って C13orf25 は、これら 7 つの microRNA の pri-microRNA である。同

遺伝子は、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫 (DLBCL; Tagawa et al., **Cancer Res 2004**; Tagawa et al., **Blood 2005**)、濾胞性リンパ腫 (Tagawa et al., **Leukemia 2007**)、マントル細胞リンパ腫 (Tagawa et al., **Oncogene 2005**)、バーキットリンパ腫 (Tagawa et al., **Cancer Sci 2007**) などで 13q31 のゲノム増幅に伴い過剰発現していた。これらの研究から、miR-17-92 の過剰発現はリンパ腫の造腫瘍性と密接に関わると考えられる。

ゲノム解析の次のステップとして、研究代表者らは miR-17-92 の造腫瘍性について検討し、Rat-1 細胞株 (rat fibroblast) で miR-17-92 を強制発現させることにより、同細胞が形質転換し、MYC 遺伝子と協調して、強い造腫瘍効果をもたらすことを明らかにした (Tagawa et al., **Cancer Sci 2007**)。研究代表者以外にも、miR-17-92 の研究が日本や世界で行われつつある。国内では、miR-17-92 が肺がんで同遺伝子が過剰発現することが証明された (Hayashita et al., **Cancer Res 2005**)。海外においては、C13orf25 を幹細胞移植したマウスで、白血病が生じることが報告されている (He et al., **Nature 2005**)。最近の報告では、慢性骨髄性白血病 (CML) (Venturini et al., **Blood 2007**) や前立腺がん (Sylvestre et al., **JBC 2007**) の造腫瘍にも関わるとされる。

C13orf25 遺伝子/miR-17-92 はがん遺伝

子であり、特にMYC転座を来たしているリンパ腫の発症に重要な関わりを持つと考えられる。miR-17-92 は 7 つの mature microRNA からなり、その標的遺伝子は 700-1000 遺伝子と推定される。今までに、miR-17-92 の標的として E2F1(O'Donnell et al., Nature 2005) が同定されているものの、造腫瘍に本質的に関わる標的遺伝子は未だ明らかでない

2. 研究の目的

研究代表者は、miR-17-92 の過剰発現を持続的に来たす実験系を確立した。図 3 に示すように、レトロウイルスにより、Rat-1 細胞株(Tagawa et al., Cancer Sci 2007) と B 細胞リンパ腫細胞株 OCI-Ly7 細胞株(未発表)で、miR-17-92 を導入することにより miR-17, 19, 20 が過剰発現を来たす。さらに、これらの細胞株に MYC を導入し過剰発現させることにより、miR-17-92 がより強い発現を来たし、造腫瘍性が増大する(図 4)。図 5 に示すように、t(8;14)転座により MYC 異常を来たすバーキットリンパ腫や一部の DLBCL では、しばしば 13q31 のゲノム増幅が見られるが(Tagawa et al., Cancer Sci 2007)、MYC の増幅に伴って miR-17-92 が増幅し、標的となる がん抑制遺伝子・蛋白 や がん遺伝子を制御する転写抑制遺伝子・因子 が負に制御され、(その結果、後者の場合はがん遺伝子・蛋白が活性化する) ことにより、アグレッシブな造腫瘍性を来たすと考えられる。miR-17-92 によって制御を受ける遺伝子・蛋白を知ることは、上述のリンパ腫の病態解明に重要だけでなく、標的分子は治療薬としてのポテンシャルも持つ。

3. 研究の方法

研究期間内に研究代表者らは、microRNA

を強制的に高発現させた変異細胞株(Rat-1 細胞株や B 細胞リンパ腫細胞株)を用い、遺伝子発現解析を行い、miR-17-92 によって発現が抑制されている遺伝子を同定する。また、これらの遺伝子の中で、miR-17-92 の標的となる 3'UTR をもつ遺伝子を TargetScan などのアルゴリズムをもちいて同定し、それらに対して、ルシフェラーゼアッセイを行い、microRNA の直接の標的遺伝子を同定する。さらに同定した遺伝子あるいは蛋白が臨床検体でも発現が低下していることを明らかにする。標的遺伝子あるいは蛋白は、がん抑制遺伝子・蛋白あるいは、転写抑制因子と想定される。

microRNA を導入した細胞株にたいして FACS 等を用いたアッセイを行い、miR-17-92 の過剰発現による細胞周期に及ぼす影響を調べる。また、標的遺伝子の下流遺伝子の異常な振る舞いを発現解析の情報とあわせて網羅的に調べ、miR-17-92 のがん発症のメカニズムを明らかにする

4. 研究成果

研究成果: B 細胞リンパ腫の miR-17-92 の標的の同定(Inomata et al., Blood 2009)。

T/NK 細胞リンパ腫での造腫瘍性 microRNA の同定(Yamanaka et al., Blood 2009)。

NK/T 細胞リンパ腫でのがん抑制的 microRNA である miR-150 の役割の解明(Watanabe et al., Leukemia 2011)。これらの研究ではいずれも研究代表者は指導者、correspondence author としての役割を果たした。

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 5 件)

01. Ubukawa K, Guo YM, Takahashi M, Hirokawa M, Michishita Y, Nara M, Tagawa H, Takahashi N, Komatsuda A, Nunomura W, Takakuwa Y, Sawada K. Enucleation of human erythroblasts involves non-muscle myosin IIB. *Blood*. in press.
02. Watanabe A, Tagawa H, Yamashita J, Teshima K, Nara M, Iwamoto K, Kume M,

Kameoka Y, Takahashi N, Nakagawa T, Shimizu N, Sawada K. The role of microRNA-150 as a tumor suppressor in malignant lymphoma. *Leukemia*. 2011;25:1324-34.

03. Guo YM, Ishii K, Hirokawa M, Tagawa H, Ohyagi H, Michishita Y, Ubukawa K, Yamashita J, Ohteki T, Onai N, Kawakami K, Xiao W, Sawada K. CpG-ODN 2006 and human parvovirus B19 genome consensus sequences selectively inhibit growth and development of erythroid progenitor cells. *Blood*. 2010;115:4569-79.
04. Yamanaka Y, Tagawa H, Takahashi N, Watanabe A, Guo Y-M, Iwamoto K, Yamashita J, Saitoh H, Kameoka Y, Shimizu N, Ichinohasama R, Sawada K. Aberrant overexpression of microRNAs activate AKT signaling via downregulation of tumor suppressors in NK-cell lymphoma/leukemia. *Blood*. 2009;114:3265-74.
05. Tagawa H. Aberrant expression of microRNA and its role in malignant lymphoma. *Rinsho Ketsueki*. 2011;52:263-71(日本語).

[学会発表] (計 1 件)

The role of oncogenic miRNA in malignant lymphoma, 2010 年、日本血液学会総会、シンポジウム

[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

田川 博之 (HIROYUKI TAGAWA)

秋田大学・医学系研究科・講師

研究者番号：30373492

: