

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23701088

研究課題名(和文) miRNAによる悪性リンパ腫の治療効果判定予測と生物学的意義の解明

研究課題名(英文) Clinical impact of down-regulated plasma miR-92a levels in non-hodgkin's lymphoma

研究代表者

吉澤 成一郎 (Yoshizawa, Sei-ichiro)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：70421063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では非ホジキンリンパ腫における血清miRNAの変動について、患者および健常人の血清を用いて定量PCR法で解析し、リンパ腫の診断や予後予測への臨床応用、さらにはその発現以上の機序について明らかにすることが目的とした。血清miR-92aの定量系(内部標準、外部標準を用いた標準化)を確立し、患者血清中でmiR-92aが極端に低下していることを明らかにし、さらに臨床病期(診断、寛解、再発時)における血清miR-92aの変動を詳しく解析したところ、診断時で著しく低下した血清中miR-92aの発現レベルは、寛解時に健常人と同レベルまで回復し、さらに再発時には診断時と同様の発現低下が見られた。

研究成果の概要(英文)：To evaluate the clinical relevance of the miR-92a in plasma obtained from non-Hodgkin's lymphoma patients, because miR-92 miRNA plays a crucial role in lymphogenesis, as well as tumorigenesis in lymphoid tissue. We evaluated plasma miR-92a value; MicroRNA Assays with modifications with non-Hodgkin's lymphoma and compared results with healthy subjects. Plasma miR-92a values in non-Hodgkin's lymphoma were extremely low, compared to healthy subjects. At the time of diagnosis The down-regulated plasma miR-92a increased in the complete response phase, reaching normal control levels, and again becoming down-regulated in the relapse phase. In non-Hodgkin's lymphoma patients, while a decreased level of plasma miR-92a was evident, indicating that the discrepancy lymph circulating miR-92a might be an important clinical issue. The plasma miR-92a value could be a novel biomarker for monitoring lymphoma patients, especially in those with indolent lymphoma.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：非ホジキンリンパ腫 血清miRNA miR-92a 診断マーカー

1. 研究開始当初の背景

1993年にLeeらによって*C.elegance*ではじめて発見された microRNA は、その後、動植物が共通に持つ18~24塩基程度の non-coding RNA であることが知られた。生体における発生、分化、形態形成などの密接な関与が取り立たされた以降は、多くの研究者たちの注目の的となった。miRNA はいくつかのタンパク質と RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれる複合体を形成し、他の遺伝子発現を制御している。現在、ヒトにおいて1000種類近くの miRNA が同定されており、ひとつの miRNA は多数の遺伝子発現制御機構に関わるとされているが、その詳細については多くが解明されていない。近年の研究から、各種がんにおいて miRNA の発現異常が報告され、疾患特異的に変動する miRNA の同定から、新たなバイオマーカーとして注目されている。

2008年以降は、血清中にも RNase によって分解されない分泌型 microRNA が存在することが相次いで報告され、以後 miRNA は組織から血清への流れへ移りつつある。これは、血清中から得られる miRNA もまた、がん疾患をはじめとする良悪性疾患で変動する点から、非侵襲的に早期診断できる可能性を持ち、新たな医学の進歩につながると考えられるからである。研究代表者の所属する研究室は世界に先駆けて造血器腫瘍において白血病患者では健常人と比べ、血清 miR-92a が著名に低下していることが報告した (Tanaka et al. *PLoS One.*, 2009)。このような背景を踏まえ、研究代表者はリンパ系造血器腫瘍における血清 miRNA について焦点を当て、予備実験としてリンパ腫患者血清サンプルからマイクロアレイ解析を行い、造血器腫瘍に特異的な発現パターンを示す miRNA の絞り込みを行い、リンパ腫患者に特徴的な miRNA として miR-92a の変化を見出した。

2. 研究の目的

20 塩基前後の蛋白をコードしない小分子 RNA が遺伝子発現を制御している microRNA (miRNA) であるという発見から現在では、その発現や機能異常が様々な疾患の病態メカニズムに関わっていることが明らかとなってきた。組織のみならず、血清中にも miRNA が存在することから、それらの発現パターンを知ることで、がんの早期診断や再発における非侵襲的なバイオマーカーになると考えられる。

本研究ではリンパ系造血器腫瘍における血清 miRNA の変動について、患者および健常人の血清を用いて、定量 PCR 法で解析し、がんの診断や予後予測への臨床応用、さらには、その発現異常の機序について明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

研究代表者は、非ホジキンリンパ腫患者の血清中からマイクロアレイを用いて miRNA を網羅的に解析した。その結果、患者血清中で miR-92a が極端に低下していることを示した。また、miR-638 はすべてのリンパ腫患者および健常人で非常に安定した状態で存在する miRNA であった。miR-92a は miR-17~92a クラスターとして、リンパ腫発生の病態に深く関与していることが知られているが、血清中におけるこれら miRNA についてはこれまで解析されていない。リンパ腫患者における血清 miR-92a の臨床的意義について以下の二つに絞って検証していく。

(1) 非ホジキンリンパ腫患者および健常人における血清 miR-92a の変化について検証し、さらには組織亜型、臨床病期、予後因子別からみた血清 miR-92a に違いがあるのかを調べる。

(2) リンパ腫組織内で高発現している miR-92a がなぜ血清中では低下するのかに

ついて、miR-92a の取り込み機構に着目し、そのメカニズムについて明らかにする。

血清 miR-92a の測定系の確立

研究代表者は、予備実験にて、マイクロアレイを用いて非ホジキンリンパ腫患者の血清 miRNA を網羅的に解析した。その結果、患者血清中で miR-92a が極端に低下していることを見出している。そこで、以下の方法でアッセイ系の標準化を行う。

細胞内 miRNA を測定するとき用いる U6B, 血清サンプルで恒常的な発現を認める miR-638, 外部標準 Cel を用いた miR-92a 発現の相対定量
絶対定量 (すでに応募者の研究室で構築したプラスミド)

なお、血清 miRNA は既報の Isogen LS を用いた方法で行う。(Tanaka et al. *PLoS One* 2009) これらの検討結果を比較検討し、ハイスルーブットの定量系を構築する。

非ホジキンリンパ腫患者における血清 miR-92a の定量解析

現有設備 (ABI Prism 7000 および ABI 7900HT real-time PCR) を用いて TaqMan MicroRNA assays (Applied Biosystems, Foster City, California) で解析する。使用する主な microRNA specific stem-loop primers は hsa-miR-92a (000431; Applied Biosystems) である。

健常人試料測定 (コントロールの測定)
非ホジキンリンパ腫 目標症例数: 200 例 (一部はすでに保存検体として保有している)
組織別、臨床病期別、染色体異常、病期 (診断、寛解、再発時) における血清 miR-92a の変動

リンパ腫細胞における miR-92a の機能解析

リンパ腫細胞株を用いて miR-92a の過剰発現およびノックダウンを行い、リンパ系腫瘍細

胞における miR-92a の役割を解析する。

市販の Pre-miR miRNA precursor (AM17100) をリポフェクションし、過剰発現細胞を得る。発現抑制には anti-miR-92a inhibitor (AM10916) を用いる。

それぞれの状態の細胞を回収し、細胞増殖との関係、アポトーシスとの関係を解析する。なおアポトーシスの評価は Annexin V 陽性細胞の変化および Caspase-Glo 3/7 assay (Promega) を用いて行う。

網羅的遺伝子発現解析には 384-well カード型アレイ (TaqMan® Gene Signature Array) を用いる。ABI 7900HT real-time PCR (現有設備) を利用し、同時にデータベースより in silico での標的遺伝子検索を行う。このことにより miR-92a のリンパ腫細胞における役割と miR-92a が制御するシグナル伝達経路が明らかになる。

4. 研究成果

本研究課題では非ホジキンリンパ腫における血清 miRNA の変動について、患者および健常人の血清を用いて定量 PCR 法で解析し、リンパ腫の診断や予後予測への臨床応用、さらには、その発現異常の機序について明らかにすることが目的である。初年度において血清 miR-92a の定量系 (内部標準、外部標準を用いた標準化) を確立し、患者血清中で miR-92a が極端に低下していることを明らかにし、組織別、臨床病期別 (診断、寛解、再発時) における血清 miR-92a の変動を詳しく解析したところ、診断時で著しく低下した血清中 miR-92a の発現レベルは、寛解時に健常人と同レベルまで回復し、さらに再発時には診断時と同様の発現低下が見られた。次年度および最終年度は、リンパ腫組織内で公発言

している miR-92a が、なぜ血清中では低下するのかについて、そのメカニズムについて明らかにすることを目的とし研究を行なった。血清中の miRNA は、エクソソームという細胞小胞に包まれて細胞外へと放出され、さらには他の細胞に取り込まれて細胞間相互作用に重要な役割を示していることがこの数年の間に多数報告され、ひとつの研究分野として確立しつつ有る。実際に miR-92a を CML (慢性骨髄性白血病) 由来細胞株に導入して、その細胞が放出するエクソソームと回収して血管内皮細胞に添加し、その血管新生能の変化を評価する in vitro 系で証明することに成功した。しかし、リンパ腫由来細胞株 (SUDHL-4) は、CML 細胞株と比較して、エクソソーム放出量が少ないことが Nano particle tracking assay により判明し、CML 細胞を用いた系で得られた実験結果と同様の蛍光を示す一方で、エクソソーム量の観点からはモデル系の構築に適していない面も見受けられた。

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 2 件)

(1) Yoshizawa S, Ohyashiki JH, Ohyashiki M, Umezumi T, Suzuki K, Inagaki A, Ohyashiki K. Downregulated plasma miR-92a levels have clinical impact on multiple myeloma and related disorders. *Blood Cancer J.* 2012, 2(1): e53. (査読有)

(2) Ohyashiki K, Umezumi T, Yoshizawa S, Ito Y, Ohyashiki M, Kawashima H, Tanaka M, Kuroda M, Ohyashiki JH. Clinical impact of down-regulated plasma miR-92a levels in non-Hodgkin's lymphoma. *PLoS One* 2011, 6(2): e16408. (査読有)

[学会発表](計 8 件)

(1) Yoshizawa S. Lower plasma miR-92a levels predict shorter progression-free survival in newly diagnosed symptomatic multiple myeloma patients. 55th Annual meeting of ASH 2013 年 12 月 7 日 New Orleans

(2) Yoshizawa S. Lower plasma miR-92a levels in newly diagnosed symptomatic multiple myeloma patients with poor-risk cytogenetics. 14th International Myeloma Workshop 2013 年 4 月 3 日 京都

(3) Yoshizawa S. Feasibility of plasma miR-92a as a prognostic marker in newly diagnosed multiple myeloma patients. 日本血液学会 2013 年 10 月 11 日 札幌

(4) Yoshizawa S, Ohyashiki JH, Ohyashiki M, Umezumi T, Suzuki K, Inagaki A, Iida S, Ohyashiki K. Plasma miR-92a levels in multiple myeloma correlate with T cell derived miR-92a and restored in bortezomib responder 53rd ASH annual meeting and exposition 2011 年 12 月 11 日 San Diego

(5) 吉澤成一郎、大屋敷一馬、大屋敷倫代、藤本博昭、後藤守孝、後藤明彦、北原俊彦、岩淵多光子、梅津知宏、小林千晶、廣田綾子、大屋敷純子 多発性骨髄腫における血清 miR-92a 低下は末梢 T 細胞由来 miR-92a を反映する 第 36 回日本骨髄腫研究会総会 2011 年 11 月 12 日 東京

(6) 吉澤成一郎、梅津知宏、藤本博昭、後藤守孝、木村之彦、大屋敷一馬、大屋敷純子、飯田真介、鈴木憲史 形質細胞腫瘍とマイクロ RNA 第 11 回血液疾患フォーラム 2011 年 10 月 22 日 東京

(7) 吉澤成一郎、梅津知宏、藤本博昭、後藤守孝、木村之彦、大屋敷一馬、大屋敷純子 多発性骨髄腫における血清 miR-92a の臨床的意義 第 73 回日本血液学会学術集会 2011 年 10 月 16 日 名古屋

(8) Yoshizawa S, Ohyashiki JH, Umezu T, Suzuki K, Inagaki A, Iida S, Ohyashiki K. Clinical impact of low plasma miR-92a levels in monoclonal gammopathies. The 13th International Myeloma Workshop. 2011 年 5 月 4 日 Paris.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉澤 成一郎 (Yoshizawa, Sei-ichiro)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：23701088

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：