

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461405

研究課題名(和文) 悪性リンパ腫の治療分子標的となるmicroRNAの同定

研究課題名(英文) Identification of microRNAs that might be therapeutic target of malignant lymphomas

研究代表者

田川 博之 (Tagawa, Hiroyuki)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30373492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、悪性リンパ腫のmiRNAの異常発現のその病態に及ぼす影響の解明について以下の2つの目標を掲げ、研究を行った。

(1)「CTCL(皮膚浸潤性T細胞リンパ腫)でのmiR-150の多臓器浸潤に関わる標的分子の同定を行う。(2)リンパ腫SP細胞に特異的に発現するmiRNAを同定する。(1)に関しては、miR-150の標的分子としてはCCR6を同定した。(2)に関しては、マントル細胞リンパ腫のSP細胞でmiR-16が発現低下しており、miR-16がBmi-1を介して抗アポトーシスに働くことを証明した。これらの研究により、miRNAが悪性リンパ腫の種々の病態において密接に関わることが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study we scheduled following two purposes. (1) To identify specific miRNAs that may be associated with invasion and metastasis of CTCL, and (2) to identify of specific miRNAs that is specifically regulated in side population of mantle cell lymphoma.

(1). In the presence of continuous CCR6 upregulation accompanied by miR-150 downregulation, IL-22 activation leads to continuous CCL20-CCR6 interaction in CTCL cells and, in turn, autocrine metastasis to distal organs Ito et al., 2014 Blood; Ikeda et al., 2016 Oncotarget).

(2). We found that Bmi-1 was over expressed in side population (SP) cells of relapsed MCL, and its up regulation by miR-16 was deeply associated with MCL tumorigenesis via enhancing anti-apoptotic function (Teshima et al., 2014 Oncogene).

研究分野：miRNA and malignant lymphomas

キーワード：miRNA malignant lymphoma CTCL Side population miR-16 miR-150 CCR6 metastasis

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いだされている。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。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結合することにより、その遺伝子や翻訳蛋白の発現を抑制し、正常に働く場合は細胞の分化、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・蛋白を抑制してしまうし、逆に発現低下を来す場合は、がん遺伝子・蛋白の発現の過剰発現をきたし、その結果がんの発達や進展、浸潤に深く関与する。研究代表者らは、B 細胞リンパ腫の染色体異常の解析から 13 番染色体長腕にある miR-17-92 遺伝子の発現異常を世界で始めて報告した(Cancer Res 2004; Leukemia 2005)。そして「microRNA の過剰発現による発癌」という新しい発癌概念を明らかにした。miR-17-92 の過剰発現は、びまん性大細胞型 B リンパ腫、パーキットリンパ腫、マントル細胞リンパ腫で生じていた(Leukemia 2005; Cancer Sci 2007)。miR-17-92 のがん遺伝子としての機能について検討し、miR-17-92 が MYC 遺伝子と協調して強い造腫瘍効果をもたらすことを証明した(Cancer Sci 2007)。さらに、miR-17-92 の標的蛋白は p21 であり、その発現低下が細胞増殖を招くことを証明した(Blood, 2009a)。NK/T 細胞リンパ腫の microRNA 解析では、i) miR-21 と miR-155 の過剰発現を発見し、その標的蛋白 Pten と Ship1 の発現を低下させ AKT の活性化をきたす事(Blood 2009b)、ii) miR-150 が不死化とアポトーシス制御に関わる事を解明した(Leukemia 2011)。これらの研究において研究代表者は研究立案から解析と総括を行った。今後も継続してリンパ腫における microRNA 発現異常とその標的蛋白の解析を行う。具体的な研究内容は次の(1)(2)である。(1) がん抑制的 microRNA である miR-150 のさらなる機能解析、そして (2)

リンパ腫 SP 細胞における miRNA 発現と機能解析である。(1)については、多臓器に浸潤する特性をもつ T 細胞リンパ腫細胞株に miR-150 を導入し免疫不全マウスに移植すると多臓器浸潤が著しく抑制される事を最近発見したのでその抑制がどのような機序(どの標的蛋白を制御するか)で行われるのかを検討する。また、(2)リンパ腫 Side population(SP)で特異的に発現する microRNA の同定とその機能解析の研究を企画した。SP 分画は、Hechst33342 染色で細胞内に取り込まれず薬剤排出ポンプにより細胞外に排出される分画のことで、細胞株を含めたがん細胞にもわずかに存在する。この薬剤排出能が亢進している SP 分画は治療抵抗性、再発難治性のリンパ腫では特に活動性が亢進していると考えられる。SP 細胞と非 SP 細胞とは異なる microRNA の発現が示唆されている。また、SP はたんに薬剤排出能が亢進しているばかりではなく、がん幹細胞が同分画から同定されることが多い(Goodell et al.,1996 JEM; Ricci-Vitiani et al.,2007 Nature)。実際、我々はリンパ腫細胞株の SP ががん幹細胞の性質を持つ事を検証し証明した。つまり SP 細胞はマウスへの連続移植により腫瘍が絶えることなく増殖するが非 SP 細胞は第一世代の移植以降腫瘍が発生しない。本研究(2)ではリンパ腫細胞株や初発、再発を含めた臨床検体より SP 細胞を抽出、miRNA 網羅的発現解析により SP 特異的に発現する miRNA を同定し、その標的遺伝子・蛋白を同定することを目標とする。特に、SP 細胞は薬剤排泄能が亢進している分画であることから、通常の抗がん剤は効きにくい。従って SP 細胞特異的な細胞表面抗原を見いだし、それを標的とする抗体療法や、SP 特異的に発現する蛋白を標的とする薬剤排出ポンプ非依存性の miRNA 導入療法の開発をも視野に入れた研究とする。(1)(2)ともに、悪性リンパ腫で異常発現する miRNA の標的遺伝子・蛋白を同定することを目標とし、その標的蛋白とそれを制御する miRNA はリンパ腫治療の新たな分子標的となりえる。

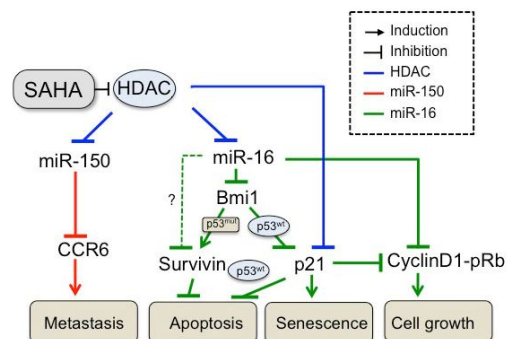
2. 研究の目的

microRNA は「蛋白をコードしない機能的 RNA」であり、その発現異常が悪性リンパ腫の病態と密接に関わることが知られるようになってきた。本研究は、悪性リンパ腫において、microRNA の発現異常とその標的蛋白を明らかにし、新たな診断、治療への道筋をつけることが目的である。その為に以下の(1)(2)の研究を行う。(1) 我々が(世界で初めて)報告したがん抑制的 microRNA-150 の新たながん抑制機序としての「多臓器浸潤を制御する機構の解析」と(2)「悪性リンパ腫の side population(がん幹細胞様分画)における microRNA の発現異常とその機能解析」である。

3. 研究の方法 研究期間内(平成 25-27 年)に研究代表者らは、(1)「miR-150 の多臓器浸潤に関わる標的蛋白」の同定をおこなう。miR-150 導入 T 細胞リンパ腫細胞株にたいして網羅的遺伝子探索による標的遺伝子候補を同定したのち、標的遺伝子・蛋白の siRNA による浸潤抑制効果を検証し、miR-150 の新たな標的分子を同定する。(2)「リンパ腫 SP 細胞と miRNA」に関しては、悪性リンパ腫患者検体と細胞株の SP 細胞の網羅的 miRNA・遺伝子発現解析を行い、候補 miRNA や遺伝子を絞り込む。さらに、標的遺伝子・蛋白の siRNA を用いて in vitro(細胞株)、in vivo で SP 細胞抑制効果を検証し、SP 細胞を標的とする鍵 miRNA/分子とその標的遺伝子・蛋白を同定する。また、発展的な研究として、再発性のリンパ腫 SP 細胞の miRNA 発現解析を行い、再発時に変動する鍵 miRNA を同定する。

4. 研究成果

(1)に関しては、miR-150 の標的分子としては CCR6 を同定した(次ページの図), Ito et al., 2014 Blood)。また、miR-150 は CCR6 のみならず、IL22 や CCL20 の発現をも下げることで転移浸潤を抑制する。また、CCL20 と CCR6 の相互作用が、転移浸潤に必須であることを示した(Ikeda et al., 2016 Oncotarget)。(2)に関しては、マントル細胞リンパ腫の SP 細胞で miR-16 が発現低下しており、miR-16 が Bmi-1 を介して Noxa や Bim といったアポトーシス関連遺伝子を制御して抗アポトーシスに働くことを証明した(Teshima et al., 2014 Oncogene)。これらの研究により、miRNA が悪性リンパ腫の種々の病態において密接に関わることが示された。



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 3 件)

1. Ito M, Teshima K, Ikeda S, Kitadate A, Watanabe A, Nara M, Yamashita J, Ohshima K, Sawada K, Tagawa H. MicroRNA-150 inhibits tumor invasion and metastasis by targeting the chemokine receptor CCR6 in advanced cutaneous T-cell lymphoma. Blood 2014;123:1499-1511.
2. Teshima K, Nara M, Watanabe A, Ito M, Ikeda S, Hatano Y, Oshima K, Seto M, Sawada K, Tagawa H. Dysregulation of BMI1 and microRNA-16 collaborate to enhance an anti-apoptotic potential in the side population of refractory mantle cell lymphoma. Oncogene 2014;33:2191-2203.
3. Ikeda S, Kitadate A, Ito M, Abe F, Nara M, Watanabe A, Takahashi N, Miyagaki T, Sugaya M, Tagawa H. Disruption of CCL20-CCR6 interaction inhibits metastasis of advanced cutaneous T-cell lymphoma cells. Oncotarget 2016 in press.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Mitsugu Ito, Kazuaki Teshima, Sho Ikeda, Atsushi Watanabe, Miho Nara, Akihiro Kitadate, Junsuke Yamashita, Koichi

- Oshima, Kenichi Sawada, Hiroyuki Tagawa. MicroRNA-150 Inhibits Tumor Invasion and Metastasis by Targeting The Chemokine Receptor CCR6 In Advanced Cutaneous T-Cell Lymphoma. American Society of Hematology 55th Annual Meeting. New Orleans, USA. 2013.
2. Akihiro Kitadate, Kazuaki Teshima, Kouichi Oshima, Masao Seto, Kenichi Sawada, Hiroyuki Tagawa. Dysregulation of BMI1 and MicroRNA-16 Collaborate to Enhance an Anti-apoptotic Potential in The Side Population of Refractory Mantle Cell Lymphoma. Third AACR International Conference on Frontiers in Basic Cancer Research. Washington DC, USA. 2013.
 3. Kazuaki Teshima, Hiroyuki Tagawa, Miho Nara, Atsushi Watanabe, Mitsugu Ito, Syo Ikeda, Naoto Takahashi, Kouichi Oshima, Masao Seto, Kenichi Sawada. BMI1 Exerts Its Oncogenic Effects Via Enhancement of Anti-apoptotic Potential in Mantle Cell lymphoma. JSH International Symposium (3rd meeting), Ehime, Japan, 2013.
 4. Kazuaki Teshima, Mitsugu Ito, Sho Ikeda, Akihiro Kitadate, Miho Nara, Kumi Ubukawa, Masumi Fujishima, Naohito Fujishima, Tomoko Yoshioka, Yoshihiro Kameoka, Naoko Hasunuma, Naoto Takahashi, Makoto Hirokawa, Kenichi Sawada, Hiroyuki Tagawa. MicroRNA-150 Regulates IL-22-CCL20-CCR6 Autocrine Pathway In Metastatic Cutaneous T-Cell Lymphoma. 19th Congress of the European Hematology Association. Milan, Italy. 2014.
 5. Hiroyuki Tagawa, Mitsugu Ito, Syo Ikeda, Akihiro Kitadate, Kenichi Sawada. MicroRNA-150 Inhibits Tumor Invasion and Metastasis by Targeting

IL-22-CC20-CCR6 Autocrine Signaling in Advanced T-Cell Lymphoma. American Association of Cancer Research 105th annual Meeting. San Diego, USA, 2014. Cancer Research 10/2014; 74(19 Supplement):4019-4019.

〔図書〕(計1件)

1. Hiroyuki Tagawa*, 著書名: MicroRNA: From molecular Biology to Clinical Practice (Editor: Gaetano Santulli, MD). 分担項目名: miRNA in malignant lymphoma、発行所: Springer、p41-50、発行年: 2015年。

〔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) 研究分担者 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

(2) 研究分担者 高橋直人(Takahashi Naoto)
 秋田大学大学院医学系研究科 教授 研究者番号: 80344753

(3) 連携研究者 なし

()

研究者番号: