

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 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：25461406

研究課題名(和文) 骨髄腫SP細胞で特異的に異常発現するmicroRNAの同定

研究課題名(英文) Identification of therapeutic candidate targets specifically expressed in myeloma side population cells

研究代表者

亀岡 吉弘 (KAMEOKA, YOSHIHIRO)

秋田大学・医学部・准教授

研究者番号：40422159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄腫のSPと非SP細胞を純化し網羅的なmiRNA/遺伝子発現解析を行いSPと非SP(以下MP)での発現比較を行った。SPとMPは、明らかに性質が異なることからmiRNAおよび遺伝子発現差があると考えられた。骨髄腫細胞株からSP細胞を抽出しmiRNAの発現量を比較したところ、miRNA-181ファミリーでSPとMP間の発現差を見いだした。miR-181の標的蛋白としてBmi-1が同定され、EZH2発現上昇 miR-181発現低下 Bmi-1発現上昇 Pten or Bim発現低下 Bcl2発現上昇が明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：We conducted comparison of miRNA/gene expression between SP and non-SP cells in multiple myeloma. We found that SP showed stem cell like phenotypes. We purified SP cells from myeloma cell lines and detected that miR-181 family's downregulation in SP cells. Moreover we found that Bmi-1 is a possible target of miR-181, and finally revealed following mechanism: EZH2 activation->miR-181 downregulation->downregulation of Bim or Pten->Bcl2 downregulation MM cells.

研究分野：血液内科学

キーワード：多発性骨髄腫 SP細胞 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

本研究は、骨髄腫の細胞株と臨床検体を用いて、side population(SP)分画をセルソーターで採取し骨髄腫 SP 細胞のがん幹細胞としての性質を詳しく調べた上で、SP 細胞に特徴的に発現する microRNA(以下 miRNA)を同定する。さらに、SP における miRNA の機能解析と標的遺伝子・蛋白の同定を行い、治療標的ともなり得る標的分子を同定する。多発性骨髄腫は難治性の造血器腫瘍であり、これまで多くの化学療法の治療薬が開発されてきたものの根治療法はいまだに開発されていない。それは、骨髄腫幹細胞が薬剤抵抗性を示し、骨髄内で残存するからであると考えられる。従って多発性骨髄腫の幹細胞を分離し、その遺伝子異常を同定することは、多発性骨髄腫を治癒可能な造血器腫瘍とする為に必要な研究である。しかし、骨髄腫の幹細胞は同定されていない。そこで我々は side population(SP)に注目した。SP は Hoechst 33342 染色をした細胞において薬剤排出ポンプの活性化によって Hoechst が排出される分画のことであり、同分画には幹細胞分画が多く含まれている。実際、がん細胞株や患者検体の SP からは、がん幹細胞が次々と明らかにされている (Goodell et al.,1996 JEM; Bonnet and Dick 1997 Nat Med; Ricci-Vitiani et al.,2007 Nature その他多数報告あり)。骨髄腫 SP 細胞ががん幹細胞としての性質を持つか否かを検討した報告は、海外の 2 報告がある。一つは Johns Hopkins 大学の Matsui らのグループで、彼らの報告によれば、骨髄腫患者の CD19-CD138+細胞と CD19+CD138-細胞を NOD/SCID マウスに移植したところ、後者

を骨髄に注射した方に腫瘍が生着し増大したが前者を移植したマウスでは腫瘍は生じなかった。従って骨髄腫幹細胞の表現型は CD34-CD19+CD138-であるという(Matsui et al.,2008 Cancer Res)。しかし、2011 年に、Harvard 大学の Mitsiades らのグループが、骨髄腫細胞株の SP 細胞の検討で、骨髄腫 SP 細胞は CD138+ であると報告した (Jakubikova et al.,2011 Blood)。つまり、骨髄腫幹細胞の細胞表面抗原表現系には諸説ある。しかし、どちらの報告も SP 細胞が、がん幹細胞の性質をもつ細胞を多く含む分画であるという点では一致している。実際、我々は骨髄腫細胞株をもちいて、SP 細胞が高いクローン性と造腫瘍性をもち、連続移植にて自己複製をする分画であることを証明した。最近、多数のがんの SP 細胞やがん幹細胞では、非 SP 細胞と比較して特徴的な遺伝子や miRNA の発現がみられるとの報告が相次いでいる。ここで、miRNA とは 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低分子 RNA である。miRNA は標的遺伝子の 3'UTR (3' Un-Translated Region)にある相補配列に部分結合する。miRNA は、標的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に深く関与する。最近、Shimono らは、miR-200c が乳がん幹細胞で発現低下

をしており、Bmi-1 を幹細胞内で制御するとの報告をしている。

研究代表者と分担研究者は、これまで悪性リンパ腫を中心に microRNA の発現解析とその機能解析を行っている。例えば、B 細胞リンパ腫で高発現する 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 の活性化をきたすこと (Blood 2009b)、ii) miR-150 が細胞不死化に関わることを解明し報告した (Leukemia 2011)。

2 . 研究の目的

本研究は、骨髄腫の SP 細胞で特異的に発現する miRNA を同定し、その機能解析、新規(miRNA)標的分子の同定を通じて、骨髄腫の新たな病態の解明を行う。

3 . 研究の方法

骨髄腫SP細胞のmiRNAと治療標的分子の同定を目的に、SPの網羅的miRNA解析・遺伝子発現解析を行う。細胞株、臨床検体のSPをセルソーター(MoFlo)で純化し、両者で共通に発現が増大しているか、または低下しているmiRNA・遺伝子を同定し(平成25年度)、miRNAの標的候補遺伝子をmiRNA導入細胞株を用いて一つ一つ検証し、miRNAとその標的蛋白を同定する。siRNA、miRNAやLNA(アンチセンスオリゴ)を用いてin vitro(細胞株)、in vivo(NOGマウス)でSP細胞に対する抑制効果を検証する(平成26年度以降)。遺伝子発現解析のプラットフォームは CodeLink™ Bioarray (Applied Microarrays, Inc.)を用いた。microRNAの解析には miRCURY LNATM microRNA array 6th

generation (Exiqon, Inc.)を用いた。Array scanner は GenePic 4000B (Molecular Devices) を、解析ソフトは Array-Pro Analyzer Version 4.5(Media Cybernetics, Inc.)を使用した。

4 . 研究成果

臨床検体20検体と骨髄腫14細胞株のSPと非SP細胞を純化し網羅的なmiRNA/遺伝子発現解析を行いSPと非SP(以下MP)での発現比較を行った。骨髄腫臨床検体では、CD138で標識した細胞からSP細胞を純化し、RNAを抽出し、遺伝子網羅的発現解析を行った。その際の遺伝子発現の比較はCD138陽性のSPとMP細胞分画である。SPとMPは、明らかに性質が異なる(SPは幹細胞用性質を持つ)ことからmiRNAおよび遺伝子発現差があると考えられた。骨髄腫細胞株からSP細胞を抽出しMP細胞との間で多数のmiRNAにつき発現量を比較したところ、miRNA-181ファミリー(miR-181a-d)でSPとMP間の発現差を見いだした(SPでの発現低下)。miR-181の標的蛋白としてBmi-1が考えられ、EZH2発現上昇 miR-181発現低下 Bmi-1発現上昇 Pten or Bim発現低下 Bcl2発現上昇という機序により、抗アポトーシスが生じていることを明らかにした(論文投稿準備中)。

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 4件)

1 亀岡吉弘、高橋直人 Lymphoma - Associated hemophagocytic syndrome. 日本臨床, 査読なし, 73巻, 2015, 455-460

2 池田翔、田川博之 骨髄腫幹細胞研究の進展 血液内科 査読なし 70巻、2015,661-667

3 Kameoka Y, Takahashi N, Itou S, Kume M, Noji H, Kato Y, Ichikawa Y, Sasaki O, Motegi M, Ishiguro A, Tagawa H, Ishizawa K, Ishida Y, Ichinohasama R, Harigae H, Sawada K. Analysis of clinical

characteristics and prognostic factors for angioimmunoblastic T-cell lymphoma. Int J Hematol. 査読有 101 巻、536-542

4 奈良美保、田川博之 骨髓腫 SP 細胞を標的とした治療戦略 血液内科 査読なし 2013、66 巻、366-371

〔学会発表〕(計 4 件)

1 Kameoka Y, Ubukawa K, Nara M, Yokoyama H, Ito S, Ishizawa K, Ishida Y, Harigae H, Takahashi N R-GDP therapy as salvage treatment of patients with refractory or relapsed DLBCL 第 75 回日本血液学会学術集会 2015 年 10 月 金沢

2 Ikeda S, Kitadate A, Ito M, Teshima K, Nara M, Watanabe, Ubukawa K, Fujishima M, Fujishima N, Yoshioka T, Kameoka Y, Takahashi N, Tagawa H Chemokine CCL20 and its receptor CCR6 are new therapeutic targets in cutaneous T-cell lymphoma 第 75 回日本血液学会学術集会 2015 年 10 月 金沢

3 Kitadate A, Ikeda S, Teshima K, Ito M, Nara M, Ubukawa K, Watanabe A, Fujishima M, Fujishima N, Yoshioka T, Kameoka Y, Takahashi N, Miyagaki T, Sugaya M, Tagawa H Tumor-suppressor miR-16 induces senescence and apoptosis in aggressive T-cell lymphomas 第 75 回日本血液学会学術集会 2015 年 10 月 金沢

4 Kameoka Y, Takahashi N, Akagi T, Nara M, Ine S, Kato Y, Yokoyama H, Noji H, Ito S, Ishida Y, Harigae H, Sawada K Analysis of the MCNU-based high dose chemotherapy followed by ASCT for relapsed or refractory DLBCL 第 74 回日本血液学会学術集会 2014 年 10 月 大阪

6 . 研究組織

(1)研究代表者

亀岡 吉弘 (KAMEOKA, Yoshihiro)

秋田大学・医学部・准教授

研究者番号：40422159

(2)研究分担者

田川 博之 (TAGAWA, Hiroyuki)

秋田大学・医学系研究科・講師

研究者番号：30373492

(3) 連携研究者なし