

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 16 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861520

研究課題名(和文) 鼻性NK/T細胞リンパ腫の病態におけるEBウイルスmicroRNAの機能解析

研究課題名(英文) Function of Epstein-Barr virus-encoded microRNAs in nasal NK/T-cell lymphoma

研究代表者

駒林 優樹 (KOMABAYASHI, YUKI)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：40548864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：鼻性NK/T細胞リンパ腫は、EBV関連腫瘍であり、予後不良な悪性リンパ腫である。本疾患細胞株を用いてマイクロアレイ解析を行い、高発現しているEBウイルスmicroRNAとしてmiR-BART22を同定した。miR-BART22は標的遺伝子としてPCDC4を制御しうることを、本疾患細胞においてmiR-BART22発現を抑制することでアポトーシスが誘導されることを見出した。miR-BART22はPCDC4発現を制御することで細胞増殖に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Nasal natural killer/T cell lymphoma (NNKTL) is Epstein-Barr virus (EBV)-associated malignancy and characterized by a poor prognosis. In the present study, microarray analysis showed that ebv-miR-BART22 was highly expressed in NNKL cell lines. We found that ebv-miR-BART22 could regulate PCDC4 expression. Moreover, we showed that knockdown of ebv-miR-BART22 induced apoptosis in NNKTL cells. These data suggest that ebv-miR-BART22 implicates in cell proliferation regulating PCDC4 expression in NNKTL.

研究分野：医歯薬学

キーワード：鼻性NK/T細胞リンパ腫 Epstein-Barr virus microRNA ebv-miR-BART22

1. 研究開始当初の背景

鼻性NK/T細胞リンパ腫は、鼻腔や咽頭に初発し、顔面正中部に沿って進行する破壊性、壊死性の肉芽腫性病変を主体とするNK細胞あるいはT細胞由来のリンパ腫である。また、本リンパ腫は、腫瘍細胞にEpstein-Barr virus (EBウイルス)を認め、その発癌への関与も報告されている。本疾患は、破壊性が強いことが特徴であり、肺、皮膚、消化管などの他臓器への浸潤が高頻度に出現し、予後が極めて不良である。よって治療、診断を念頭に置いた腫瘍特性の理解が早急に求められている。

microRNAは、タンパクをコードしていない約22塩基長の短い一本鎖RNAでありmRNAからタンパクへの翻訳を負に制御することで様々な生命現象に関与している。一方でmicroRNAの発現異常による発癌が種々の癌において報告されており、RNAを使用した薬剤への道も開けてきている。EBウイルスにもmicroRNAが存在する。本疾患と同様にEBウイルス関連腫瘍である上咽頭癌やバーキットリンパ腫では、EBウイルスmicroRNAが宿主の遺伝子発現を制御し、アポトーシス抑制や免疫逃避に関与している事が明らかにされている。これらEBウイルスmicroRNAは、正常細胞には存在せず、ウイルス感染細胞にのみ存在するため、治療および診断的観点から非常に有用な標的分子となりうる。しかし、本疾患におけるEBウイルスmicroRNAの機能についてほとんど解っていない。

2. 研究の目的

本研究は、鼻性NK/T細胞リンパ腫におけるEBウイルスmicroRNAの機能を検討し、病態への関与を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) EBウイルスmicroRNAの発現解析

鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株(EBV陽性)3株およびEBV陰性NK細胞株、正常NK細胞よりRNAを抽出し、EBV-microRNAについてマイクロアレイ解析を行った。さらに候補microRNAについて、患者検体および細胞株での発現をrealtime-PCR法により解析した。患者検体として当科で鼻性NK/T細胞リンパ腫と診断された13名の腫瘍組織を使用した。また対象組織として健常人の末梢血NK細胞および非腫瘍性鼻粘膜計8検体を用いた。

(2) EBウイルスmicroRNAの標的遺伝子の同定

候補microRNAの標的遺伝子についてmicroRNAの標的遺伝子データベースであるTargetScanを用いて検索した。候補標的遺伝子については、3'UTRレポーターベクター、microRNA mimicを用いたレポーターアッセイで検証を行った。本疾患細胞株に候補microRNAに対するアンチセンス核酸を遺伝子導入し、標的遺伝子蛋白の変化をwestern

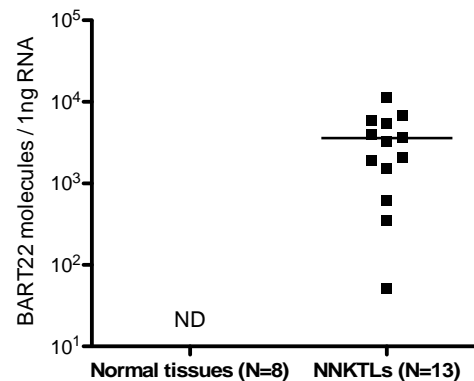
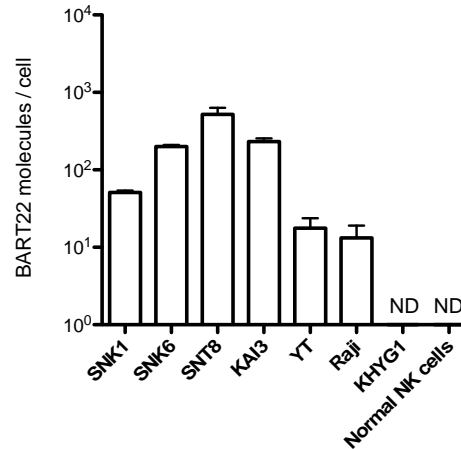
blotで解析する。

(3) アンチセンス核酸導入によるloss-of-function解析

本疾患細胞株SNK6に候補microRNAのアンチセンス核酸をエレクトロポレーション法により核酸導入しアポトーシス細胞の割合の変化についてAnnexin V/PI染色を用いて検討した。細胞増殖についてはMTSアッセイで解析した。

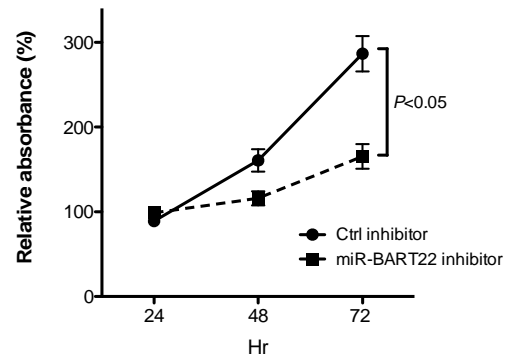
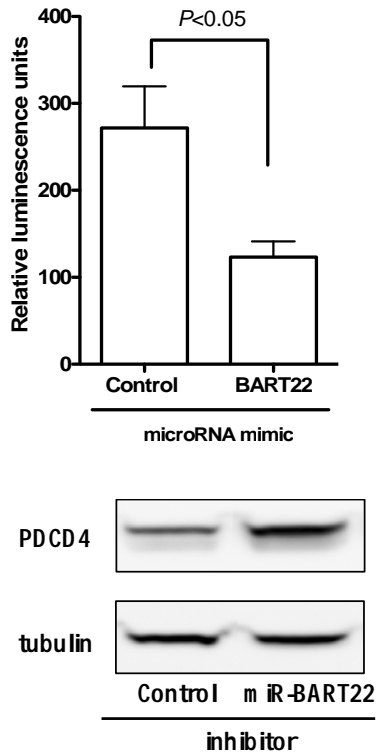
4. 研究成果

マイクロアレイ解析の結果、鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株において複数のEBV-microRNAが発現していることが確認された。このうち3株ともに高発現を認めたebv-miR-BART22に注目し、さらに発現解析を行った。realtime-PCR解析では、鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株を含めたEBV陽性細胞株においてebv-miR-BART22の発現を認めた。また、腫瘍組織において高発現を認めたが、正常NK細胞および鼻粘膜組織には発現を認めなかった(1)。



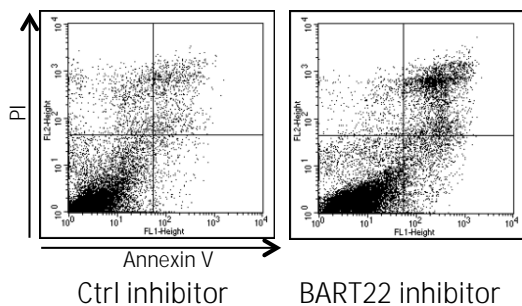
TargetScanを用いたebv-miR-BART22の標的遺伝子の検索の結果、癌抑制遺伝子であるPDCD4が同定された。HeLa細胞にebv-miR-BART22およびPDCD4 3'UTRレポーターベクターをコトランスフェクションし、レポーターアッセイを行った結果、control microRNAと比較しmiR-BART22 mimic導入株においてルシフェラーゼ発現が抑制され、PDCD4がebv-miR-BART22の標的遺伝子であることが示唆された。次いで鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株に

ebv-miR-BART22のアンチセンス核酸を導入し、PDCD4発現の変化を検討した。その結果、miR-BART22 アンチセンス核酸導入によりPDCD4発現は増強した。以上より鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株においてもebv-miR-BART22がPDCD4発現を制御していることが確認された(1)。



以上の結果より、鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞においてebv-miR-BART22は、癌抑制遺伝子であるPDCD4発現の抑制を介して、アポトーシスを抑制することで本疾患の病態に關与している可能性が示唆された。

アポトーシス解析では、ebv-miR-BART22 アンチセンス核酸導入株においてcontrol導入株と比較し、アポトーシス細胞の割合が有意に増加していた。また、MTSアッセイにおいては、ebv-miR-BART22 アンチセンス核酸導入により細胞増殖が抑制されることが確認された(1)。



<引用文献>

駒林優樹. 鼻性NK/T細胞リンパ腫におけるEBウイルスmicroRNAの機能解析. 旭川医科大学研究フォーラム 14:66-68, 2014.

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)

Komabayashi Y, Kishibe K, Nagato T, Ueda S, Takahara M, Harabuchi Y. Downregulation of miR-15a due to LMP1 promotes cell proliferation and predicts poor prognosis in nasal NK/T-cell lymphoma. Am J Hematol 89:25-33, 2014. DOI 10.1002/ajh.23570 査読有

Takahara M, Nagato T, Komabayashi Y, Yoshino K, Ueda S, Kishibe K, Harabuchi Y. Soluble ICAM-1 secretion and its functional role as an autocrine growth factor in nasal NK/T cell lymphoma cells. Exp Hematol 41:711-718, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exphem.2013.03.009> 査読有

Yoshino K, Kishibe K, Nagato T, Ueda S,

Komabayashi Y, Takahara M, Harabuchi Y. Expression of CD70 in nasal natural killer/T cell lymphoma cell lines and patients; its role for cell proliferation through binding to soluble CD27. *Br J Haematol* 160:331-342, 2013. DOI 10.1111/bjh.12136 査読有
駒林優樹, 原渕保明 画像診断パーフェクトガイド .鼻・副鼻腔 多発血管炎性肉芽腫症と悪性リンパ腫 耳鼻咽喉・頭頸部外科 86: 138-143, 2014.
駒林優樹, 原渕保明 疾患 - 診断と治療 46.鼻性 NK/T 細胞リンパ腫 ENT コンパス 小島博己, 森山 寛編. ライフ・サイエンス :257-258, 2014.

〔学会発表〕(計6件)

Komabayashi Y, Kishibe K, Takahara M, Harabuchi Y. Expression and function of Epstein-Barr virus-encoded microRNAs in nasal natural killer/ T-cell lymphoma: Jul.16-19, 2014, Brisbane, Australia.
駒林優樹, 岸部 幹, 高原 幹, 原渕保明. 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫における EB ウイルス microRNA miR-BART22 の発現と機能解析: 第 62 回日本ウイルス学会 : 11.10-12, 2014, 横浜.
駒林優樹, 岸部 幹, 林 達哉, 原渕保明. 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫における EB ウイルス microRNA miR-BART22 の発現と機能解析: 第 38 回日本頭頸部癌学会 : 6.12-13, 2014, 東京.
駒林優樹, 上田征吾, 岸部 幹, 高原 幹, 林 達哉, 原渕保明. 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫における EB ウイルス microRNA miR-BART22 の発現と機能解析: 第 32 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 : 2.6-8, 2014, 徳島.
Komabayashi Y, Kishibe K, Takahara M, Harabuchi Y. Downregulation of miR-15a due to LMP1 promotes cell proliferation and predicts poor prognosis in nasal NK/T-cell lymphoma: The 16th Asian Research Symposium in Rhinology (ARSR2013): Aug.29-31, 2013, Tokyo, Japan.
駒林優樹, 岸部 幹, 高原 幹, 林 達哉, 原渕保明. 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫における miR-15a の発現と機能解析: 第 114 回日本耳鼻咽喉科学会総会 : 5.15-18, 2013, 札幌.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

駒林 優樹 (KOMABAYASHI YUKI)
旭川医科大学・医学部・助教