

平成30年6月4日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06907

研究課題名(和文) がん等におけるシグナル異常活性化に関わるmiRNAとエピジェネティック因子の研究

研究課題名(英文) Study for epigenetic abnormality of microRNA in lymphoma biology

研究代表者

山岸 誠 (Yamagishi, Makoto)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任講師

研究者番号：90625261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新たな機能的miRNAのスクリーニング法として、RISC-capture法を確立した。これにより悪性リンパ腫細胞においてmiRNAの機能が異常に低下していること、その結果本来抑制されるべきBCR経路などのシグナル伝達経路の脱制御が起こり、慢性的な活性化を引き起こすメカニズムが明らかになった。さらにmiRNA発現異常メカニズムとしてエピジェネティック異常を同定し、腫瘍化過程におけるエピゲノム異常の重要性を示した。さらに腫瘍化における遺伝子翻訳異常の重要性も明らかにし、これらに対する阻害剤が次世代創薬につながることを示した。

研究成果の概要(英文)：Defenseless signaling is the true nature of the cancer cell. By using RISC-capture assay for normal and clinical samples, this study demonstrates that the signaling cascade habitually confronts epigenetic interference composed of miRNA group in human cells. In malignant lymphoma cells, aberrant action of epigenetic factors hierarchically influences the functional miRNA en masse, enhancing target gene translation and coherent active crosstalk involving NF-kB, Ras-Erk, and Akt-mTOR. We illustrate an example of a biological masterplan comprised of signaling networks, miRNAs, translation regulation, and epigenetic mechanisms. Furthermore, we show that appropriate inhibition of the signaling cascades or the epigenetic abnormality appear to be effective for malignant lymphoma.

研究分野：分子生物学、ゲノム医科学、分子腫瘍学

キーワード：microRNA エピジェネティクス 悪性リンパ腫 HTLV-1 ATL 遺伝子翻訳

## 1. 研究開始当初の背景

microRNA(miRNA)は真核生物に広く保存されている19-24ntの機能性非コードRNAである。主にmRNAの3'UTRを相補性によって認識し、RNAの分解と翻訳抑制を介して遺伝子発現制御を行う。ショウジョウバエを中心にmiRNAを取り巻く分子機構は急速に理解が進み、同時にmiRNAの生物学的多機能性も提唱されている。それはmiRNAが細胞の機能や分化制御に必須であり、また特にがんや感染症など疾患研究において多くのmiRNAの発現異常が同定されていることに起因する。短いRNAが様々な生物学的イベントに与えるインパクトは、発見当初の予想を遥かに超えるものであったと言える。疾患におけるmiRNAの役割を明らかにする上で、注目するmiRNAの絞り込みと標的遺伝子の同定が必須である。しかし従来の手法はmiRNA発現量の差異のみで絞り込み、標的についても予測のみ、あるいはモデル細胞を用いた人工的な過剰発現による同定が大半を占めており、周辺の分子メカニズムとbiological impactを考慮した研究が不足している。実際には一つのmiRNAが一標的遺伝子に対してもつ抑制能力は非常に小さく、従って一つの分子間のみ焦点を当てる研究から全体像を見るべき新たな局面を迎えている。解析技術が充実したビッグデータ時代にある今、miRNAの本質的な理解は従来のストラテジーでは回答を得ることができない重要な課題である。

## 2. 研究の目的

本研究は「シグナル伝達系を標的とした新たな機能的miRNAスクリーニング法の確立と、miRNAとエピジェネティクスが形成する複雑なクロストークの解明」を目的とした。これまでの研究成果と研究材料を活かし、疾患研究で特に注目されているmiRNAとエピジェネティクスに対して基礎から応用までを網羅した研究を計画した。がん細胞の生存と増殖に必要なシグナル伝達経路に注目し、新たな手法を用いてmiRNA群の本質的な機能と存在意義を明らかにする。またグローバルなmiRNA制御機構とエピジェネティクスの関与、複雑なクロストークの存在証明とその制御機構を明らかにし、がん細胞がmiRNAによるBuffer効果から回避していることを証明する。さらにがんの根本である遺伝子異常とmiRNA及びエピジェネティック異常の実際的な関連について悪性リンパ腫をモデルに検討する。基礎生物学の理解と概念の進歩に貢献し、同時に予後不良の悪性リンパ腫の新たな治療標的とバイオマーカーの提案によって社会に貢献する。

## 3. 研究の方法

### ・ RISC-capture assayの確立と各種B細胞の解析

細胞中のRISC-RNA複合体は、細胞溶解後AGO2に対する抗体を用いた免疫沈降法によって

精製した。RISC複合体に含まれるRNAを精製したのち、qRT-PCRによって標的mRNA及びmiRNAの定量を行った。

### ・ miRNAの機能解析

各miRNAの機能やシグナル伝達系を解析するために、目的のmiRNAやshRNAを発現するレンチウイルスベクターの作成を行った。レンチウイルスベクターは理化学研究所バイオリソースセンター三好浩之教授が開発した系を利用した。miRNAの標的遺伝子の同定は、TargetScanによる予測を行ったのち、3'UTRをluciferaseにつなげたレポーターアッセイにより検証を行った。また各miRNAを過剰発現させた細胞を用いてRT-PCR及びWestern blotにより標的遺伝子を決定した。さらにmiRNAによって直接制御されているかを確認する為に、miRNAを過剰発現させた細胞からRISC-RNA複合体を精製し、標的mRNAの定量を行った。

### ・ 遺伝子翻訳異常の解析

腫瘍細胞及び正常細胞からリボソームを含む細胞質溶液を調製し、ショ糖密度勾配遠心法によりリボソーム分画を分取した。各分画に含まれるmRNAを発現アレイを用いて網羅的に定量することで、各遺伝子の翻訳レベルを定量し比較検討を行った。

### ・ エピゲノム解析

腫瘍細胞及び正常細胞の全プロモーター上のH3K27me3レベルをChIP-on-chip法を用いて解析した。比較解析及び遺伝子発現データとの統合解析によって、メチル化によって抑制される遺伝子を決定し、またmiRNAへの影響も検討した。

## 4. 研究成果

### ・ 機能的miRNAのスクリーニング法の確立と、悪性リンパ腫におけるmiRNA機能異常

まず機能的miRNAの新たなスクリーニング法として、RISC-capture法を確立した。本手法は、細胞内のArgonaute複合体を免疫沈降法で精製し、複合体に含まれるmiRNAと標的となるmRNAを抽出して分析する。これにより、細胞内で機能するmiRNAと標的mRNAを同時に定量することが可能になった。実際に正常B、Tリンパ球、及び各種リンパ腫細胞株、さらに実際のリンパ腫凍結サンプルに対してRISC-capture法を実施し、リンパ腫において様々なmiRNAが機能異常となっていることを明らかにした。また同時にRISCに取り込まれた(=miRNAの標的となる)mRNAを定量したところ、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)において、BCRの下流のシグナル伝達経路においてシグナルを増幅させる因子群のmRNAの取り込み効率が低下していることを明らかにした(図1)。そこで実際のmiRNAの機能を検討するために、AGO2などのRISC構成因子を正常B細胞においてノックダウン

したところ、BCR 経路が活性化し、B 細胞の増殖が促進された (図 2)。以上のデータは、リンパ腫細胞における BCR 経路の慢性的な活性化が miRNA の機能低下によって引き起こされていることを示しており、B 細胞リンパ腫に対する新たな治療方策として、miRNA の機能をまとめて調節する意義が示された。

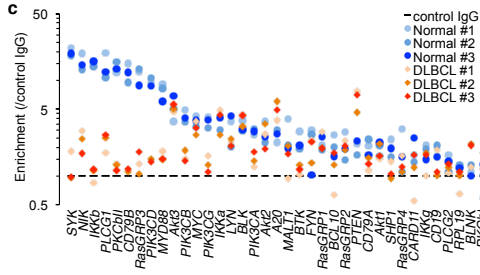


図 1. 正常 B 細胞における BCR 経路因子 mRNA の AGO2 複合体への取り込み

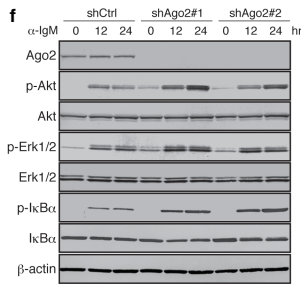


図 2. 正常 B 細胞において AGO2 を阻害すると、BCR 経路が活性化する

・ miRNA 異常による遺伝子翻訳異常への影響の検討

miRNA によって翻訳依存的に抑制される遺伝子を検討できる Ribosome profiling 法を開発した。これにより miRNA によって翻訳抑制された遺伝子を定量的に評価することが可能になった。これまでに明らかにした miRNA 異常の意義を検討するために、miRNA (-200c, -203, -31) をリンパ腫細胞株に導入し、Ribosome profiling 法によって BCR シグナル因子を評価したところ、BCR 因子の多くが miRNA によって制御されることがわかった (図 3)。シグナル経路を整理し、且つ実験的に検証した結果、miR-200c, -203, -31 は NF-κB, Ras-MAPK, PI3K-Akt シグナル経路に対して抑制的に働くことがわかった。つまりリンパ腫細胞における miRNA の発現低下が BCR シグナルの慢性的な活性化を促すと考えられた。さらに、これらの miRNA 群が EZH2 依存的なエピジェネティック異常によって抑制されることも明らかにした (Yamagishi *et al.*, *Sci. Rep.*, 2015)。

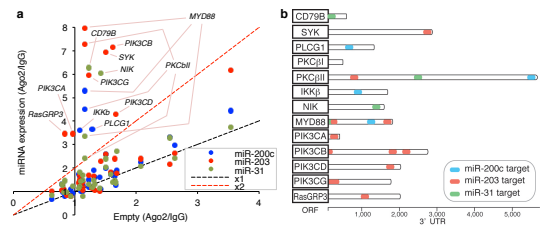


図 3. miRNA の標的遺伝子の同定(左)と、BCR 経路因子の miRNA 標的配列(右)

・ ウイルス感染、腫瘍化過程におけるエピジェネティック異常による miRNA 発現減少

miRNA 群発現減少の分子メカニズムを検討した結果、リンパ腫細胞におけるポリコーム群依存的なエピジェネティックな異常が原因であることがわかった。ポリコーム群は miRNA の発現を全体的に負に制御し、その結果多くの miRNA によって制御されるべき標的遺伝子の慢性的な過剰発現を引き起こしていることを明らかにした。成人 T 細胞白血病 (ATL) においてはポリコーム群により少なくとも 60 種以上の miRNA の発現が著しく低下しており、ATL 細胞における遺伝子発現ネットワークの全体的な異常に対する miRNA の重要性が強く示唆された。HTLV-1 感染細胞で発現する Tax 遺伝子は、宿主ポリコーム複合体の構成因子の発現レベルを変化させ、また直接相互作用することで宿主エピゲノムパターンを変化させることを明らかにした。Tax によって誘導されるエピジェネティックな発現異常は、感染初期、及び無症候性キャリアの感染細胞ですでに成立しており (図 4)、また HTLV-1 感染細胞の不活化過程に不可欠であったことから、Tax によるエピジェネティックな異常が HTLV-1 感染症において非常に重要なイベントであることが示された (図 5)。またポリコーム群について詳細な検討を行い、リンパ腫細胞における EZH1 及び EZH2 の重要性を明らかにした (Fujikawa *et al.*, *Blood*, 2016)。EZH1 及び EZH2 を同時に欠損させることにより、ATL 細胞や他の悪性リンパ腫細胞に対して合成致死を誘導できることを明らかにした。

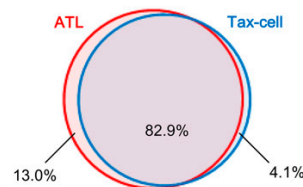


図 4. ATL 細胞と Tax 不活化細胞の H3K27me3 異常蓄積の実態。両者は酷似していた。

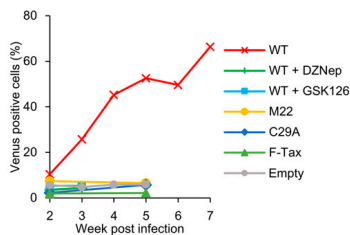


図 5. Tax による T 細胞の不死化は EZH2 の阻害によってブロックされる

・リンパ腫細胞における翻訳異常の網羅的解析

腫瘍細胞で減少した miRNA によって脱制御された遺伝子は転写レベルだけでなく、翻訳レベルで発現上昇することがわかった。遺伝子翻訳制御は転写制御と独立したシステムで構成されており、腫瘍細胞ではエピゲノム異常を契機に、転写、翻訳の各段階で異常な発現パターンを取ることがわかった。ATL をモデルに、翻訳異常の実態を ribosome profiling で検討した結果、細胞増殖や炎症反応など非常に多くの遺伝子の過剰発現を引き起こしていることを明らかにした(図 6)。また翻訳異常の原因として miRNA の発現低下だけでなく、翻訳開始複合体構成因子の異常を明らかにし、特に eIF4E 複合体因子に対する阻害剤は翻訳レベルを低下させ、リンパ腫細胞特異的に増殖を抑制することがわかった(図 7)。

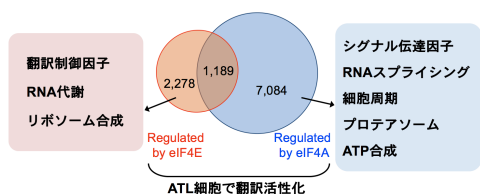


図 6. ATL 細胞における翻訳異常の実態

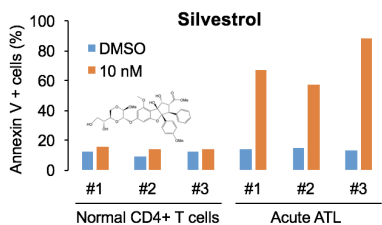


図 7. ATL 細胞に対する eIF4E 阻害剤の効果

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 10 件)

- ① Yamagishi M\* (\*corresponding author), Uchimaru K. Targeting EZH2 in cancer therapy. *Curr. Opin. Oncol.* 29: 375-381, 2017. (査読あり)
- ② 山岸誠、内丸薫、特集 / 成人 T 細胞白血病リンパ腫(ATL)研究と診療の進歩「ATL 発症における遺伝子翻訳異常」、*血液内科*、74(3)、314-319、2017 年(査読なし)
- ③ Tanaka M, Ishikawa S, Ushiku T, Morikawa T, Isagawa T, Yamagishi M, Yamamoto H, Katoh H, Takeshita K, Arita J, Sakamoto Y, Hasegawa K, Kokudo N and Fukayama M. EVI1 modulates oncogenic role of GPC1 in pancreatic carcinogenesis. *Oncotarget* 8: 99552-99566, 2017(査読あり)
- ④ Tsunetsugu-Yokota Y, Kobayashi-Ishihara M, Wada Y, Terahara K, Takeyama H, Kawana-Tachikawa A, Tokunaga K, Yamagishi M, Martinez JP, Meyerhans A. Homeostatically Maintained Resting Naive CD4<sup>+</sup> T Cells Resist Latent HIV Reactivation. *Front. Microbiol.* 7: 1944, 2016. (査読あり)
- ⑤ 山岸誠、渡邊俊樹、特集/成人 T 細胞白血病(ATL)研究の現状「ATL 細胞における EZH1/2 依存的なエピゲノム制御異常」、*血液フロンティア*、26(4)、2016 年(査読なし)
- ⑥ Fujikawa D, Nakagawa S, Hori M, Kurokawa N, Soejima A, Nakano K, Yamochi T, Nakashima M, Kobayashi S, Tanaka Y, Iwanaga M, Utsunomiya A, Uchimaru K, Yamagishi M\* (\*corresponding author), Watanabe T. Polycomb-dependent epigenetic landscape in adult T-cell leukemia. *Blood* 127: 1790-1802, 2016. (査読あり)
- ⑦ Yamagishi M\* (\*corresponding author), Katano H, Hishima T, Shimoyama T, Ota Y, Nakano K, Ishida I, Okada S,

Watanabe T. Coordinated loss of microRNA group causes defenseless signaling in malignant lymphoma. *Sci. Rep.* 5: 17868, 2015. (査読あり)

- ⑧ Kuramitsu M, Okuma K, Yamochi T, Sato T, Sasaki S, Hasegawa H, Umeki K, Kubota R, Sobata R, Matsumoto C, Kaneko K, Naruse I, Yamagishi M, Nakashima M, Momose H, Araki K, Mizukami M, Mizusawa S, Okada Y, Ochiai M, Utsunomiya A, Koh KR, Ogata M, Nosaka K, Uchimaru K, Iwanaga M, Sagara Y, Yamano Y, Satake M, Okayama A, Mochizuki M, Izumo S, Saito S, Itabashi K, Kamihira S, Yamaguchi K, Watanabe T, Hamaguchi I. Standardization of Quantitative PCR for Human T-cell Leukemia Virus Type 1 in Japan: A Collaborative Study. *J. Clin. Microbiol.* 53: 3485-3491, 2015. (査読あり)
- ⑨ Matsuda Y, Kobayashi-Ishihara M, Fujikawa D, Ishida T, Watanabe T, Yamagishi M\* (\*corresponding author). Epigenetic Heterogeneity in HIV-1 Latency Establishment. *Sci. Rep.* 5: 7701, 2015. (査読あり)
- ⑩ Kuramitsu M, Okuma K, Yamagishi M, Yamochi T, Firouzi S, Momose H, Mizukami T, Takizawa K, Araki K, Sugamura K, Yamaguchi K, Watanabe T, Hamaguchi I. Identification of TL-0m1, an Adult T-Cell Leukemia (ATL) Cell Line, as Reference Material for Quantitative PCR for Human T-Lymphotropic Virus 1. *J. Clin. Microbiol.* 53: 587-596, 2015. (査読あり)

[主な学会発表] (計 14 件)

- ① Yamagishi M. et al. Development and Molecular Analysis of Synthetic Lethality by Targeting EZH1/2 in ATL and HTLV-1-infected cells. **The 18th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, Tokyo, Japan, March 10, 2017** (March 7-10, 2017) (Oral) Oral Award
- ② Yamagishi M. et al. Comparative Transcriptome Analysis of HTLV-1-infected cells and ATL cells. **The 18th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, Tokyo, Japan, March 7, 2017** (March 7-10, 2017) (Poster) Poster

Award

- ③ Yamagishi M. et al. Development and molecular analysis of synthetic lethality by targeting EZH1 and EZH2 in T cell lymphomas. **T-cell Lymphoma Forum 2016**, San Francisco, CA, U.S.A., Jan. 27, 2017 (Jan. 26-28, 2017) (Oral/Poster)
- ④ Yamagishi M. et al. Development and molecular analysis of synthetic lethality by targeting EZH1 and EZH2 in non-Hodgkin lymphomas. **The 58th ASH Annual Meeting and Exposition**, San Diego, CA, U.S.A., Dec. 5, 2016 (Dec. 3-6, 2016) (Oral) ASH Abstract Achievement Award

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称: 「成人T細胞白血病リンパ腫の治療及び/又は予防剤」  
発明者: 渡邊俊樹、山岸誠、第一三共株式会社発明者5名  
出願人: 国立大学法人東京大学及び第一三共株式会社  
出願日: 平成28年7月29日  
登録日: 平成28年9月23日  
日本出願及びPCT国際出願 (特許第6009135号)

[その他]

ホームページ等

<http://uchimaru.umin.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山岸 誠 (YAMAGISHI, Makoto)

東京大学大学院・新領域創成科学研究科・特任講師

研究者番号: 90625261