

令和 2 年 5 月 16 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16178

研究課題名（和文）悪性リンパ腫におけるヒストン脱アセチル化酵素が制御するmiRNAの網羅的探索

研究課題名（英文）A comprehensive search for miRNAs regulated by histone deacetylase in malignant lymphoma

研究代表者

北舘 明宏 (Kitadate, Akihiro)

秋田大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90791559

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：HDAC阻害剤により多くのがん抑制的microRNAの発現が回復することを見出した。中でもmiR-150の発現回復によりケモカインレセプターCCR6の発現低下を生じることが明らかとなり、別のケモカインレセプターであるCCR4の発現が低下することを見出した。重要な点として、in vitroの検討において抗CCR4抗体であるモガムリズマブの作用がHDAC阻害剤の前投与により減弱する可能性がある点を明らかとした。これらの知見はT細胞リンパ腫治療戦略の確立に重要な示唆をもたらすものと思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HDAC阻害剤はT細胞リンパ腫における新規治療薬として登場したが、その作用機序は十分明らかではなかった。今回HDAC阻害剤ががん抑制的microRNAの発現を回復させ、ケモカインレセプターの発現を低下させることを見出した。特に重要な点として、ケモカインレセプターCCR4の発現を低下させることが挙げられる。CCR4はT細胞リンパ腫における別の新規治療薬であるモガムリズマブの標的抗原である。これにより、HDAC阻害剤とモガムリズマブの併用が有用でないことが示唆され、T細胞リンパ腫の最適な治療戦略確立に重要な示唆をもたらすものと思われる。

研究成果の概要（英文）：We found that HDAC inhibitors restore expression of many tumor suppressive microRNAs. In particular, it was revealed that restoration of miR-150 expression caused a decrease in the expression of chemokine receptor CCR6. Moreover, we found that the expression of another chemokine receptor, CCR4, is also decreased. Importantly, in vitro studies revealed that the efficacy of the anti-CCR4 antibody mogamulizumab may be diminished by pre-treatment of HDAC inhibitors. These findings may have important implications for the establishment therapeutic strategies for T-cell lymphoma.

研究分野：血液内科

キーワード：悪性リンパ腫 T細胞リンパ腫 HDAC HDAC阻害剤 CCR4

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年がんの病態においてジェネティックな遺伝子異常に加えて、様々なエピジェネティック異常の蓄積が関与していることが明らかになってきた。エピジェネティック異常は DNA メチル化、ヒストン修飾、miRNA などの複数の因子が関与しており、広範な遺伝子制御異常を来すエピジェネティック異常はがんにおける非常に良い治療標的であると考えられている。ヒストン脱アセチル化酵素(Histone Deacetylase、以下 HDAC)はこのうちヒストン修飾に関わる因子であり、ヒストンの N 末端に多く存在するリジン残基からアセチル基を除去する酵素の総称である。アセチル基が除去されたヒストン末端は DNA と強固に結合することで、クロマチン構造がコンパクトになり遺伝子発現が抑制される。すなわち HDAC はエピジェネティックな転写抑制に中心的役割を果たす分子であり、がん抑制遺伝子の転写抑制によりがん病態に関与していると考えられている。HDAC の活性化が悪性リンパ腫のみならず、肺癌・乳癌を始めとした多くの固形腫瘍において認められ、HDAC 阻害剤の臨床応用が様々ながん種で試みられてきた。しかしながら、これらの固形腫瘍、白血病などにおいては HDAC 阻害剤単剤での治療は臨床的な有効性を示してはいない。一方で悪性リンパ腫、特に T 細胞性リンパ腫において HDAC 阻害剤は他の疾患に先駆けてその臨床的な有効性が確認されており、本邦でも皮膚 T 細胞性リンパ腫(Cutaneous T Cell Lymphoma、以下 CTCL)に対して HDAC 阻害剤であるボリノスタットが適応を取得している。また、末梢性 T 細胞性リンパ腫に対しても別の HDAC 阻害剤であるロミデプシンも最近適応を取得し T 細胞リンパ腫の治療戦略に大きな影響を与えている。しかしながら、HDAC 阻害剤がどのような標的を介して薬効を発揮しているのかについては、これまで網羅的遺伝子発現解析による検討なども行われているが、いまだ十分明らかではない。

我々のグループではこれまで T 細胞性リンパ腫を中心として miRNA の発現異常とその病態への関与を報告してきた(Yamanaka et al, 2010 Blood、Watanabe et al, 2012 Leukemia)。その理由として、T 細胞性リンパ腫では B 細胞性リンパ腫と異なり特徴的な染色体異常・遺伝子異常が同定されておらず、エピジェネティックな異常が病態に大きく関与していることが考えられたためである。さらに最近では難治性悪性リンパ腫のモデルとして CTCL を対象に、患者検体・細胞株を用いた miRNA の発現解析を行い、特徴的な所見としていくつかのがん抑制的 miRNA の発現低下を同定している(Ito et al, 2014 Blood)。そしてこのうちがん抑制的 miRNA である miR-16 が CTCL 細胞にアポトーシス・細胞老化を誘導すること、さらに HDAC 阻害剤であるボリノスタットが CTCL 細胞の miR-16 発現を回復させ、miR-16 導入と同様にアポトーシス・細胞老化を誘導することを報告した(Kitadate et al, 2016 Oncogene)。これらの知見は、悪性リンパ腫における HDAC の本質的な作用が、がん抑制的 miRNA の発現抑制にある可能性を示唆しているものと思われる。従って、HDAC 阻害剤により発現変動する miRNA の探索を通じて、HDAC 阻害剤の重要な作用機序を同定できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、悪性リンパ腫における HDAC 阻害剤の分子学的機序について、「がん抑制的 miRNA との関わりから明らかにしていき、HDAC を標的とした新規治療戦略の開発・治療予後予測へと結びつける」ことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) miRNA 網羅的発現解析を用いた HDAC が制御するがん抑制的 miRNA の同定
CTCL を含む T 細胞性リンパ腫細胞株(n=20)・臨床検体(n=30 以上)を用いて、miRNA マイクロアレイにより HDAC 阻害剤で発現が変動する miRNA の網羅的発現解析を行う。候補となる miRNA は数十～数百にのぼる可能性があるが、この中から真に病態に深く関与する miRNA を同定していく。具体的には正常 T リンパ球、臨床検体を用いて、ノーザンブロットによる発現解析を行い正常リンパ球で発現しているがリンパ腫患者では発現低下している miRNA をスクリーニングしていく。この過程において、HDAC が制御し病態に本質的に関与する可能性がある miRNA の抽出を行う。

(2) HDAC 阻害剤の作用機序探索

候補となる miRNA に関して細胞株を用いた機能解析として、エレクトロポレーションによる miRNA 導入を行い、cell viability や細胞周期の評価、アポトーシス解析を行う。さらに in vivo でのがん抑制効果について、我々が以前確立したリンパ腫移植マウスモデルを用いて行う(Ito et al, 2014 Blood)。このマウスモデルは「CTCL 細胞を免疫不全マウスに皮下移植すると移植後 35 日前後で全身多臓器浸潤により死亡する」ものであり、皮膚から全身臓器へと増殖浸潤していく CTCL 進行期の病態をよく反映しているものである。レンチウイルスベクターを用いて候補となる miRNA を恒常的に発現回復させた細胞株を作成し、このマウスモデルにおける生存延長効果を検討することで真にがん抑制作用を有し病態に深く関与する miRNA の同定へと結びつける。

4. 研究成果

CTCL 細胞株を用いて HDAC 阻害剤暴露における miRNA の発現変動について網羅的解析を行って、約 150 程度もの多くの miRNA の発現を上昇させ、さらにその中には数多くのがん抑制的

miRNA が含まれていることを見出している。これは末梢血正常 T 細胞を使った検討や、多発性骨髄腫細胞株を用いた検討とは大きく異なる結果であった(図 1)。

HDAC阻害剤処理におけるmiRNA網羅的発現解析結果

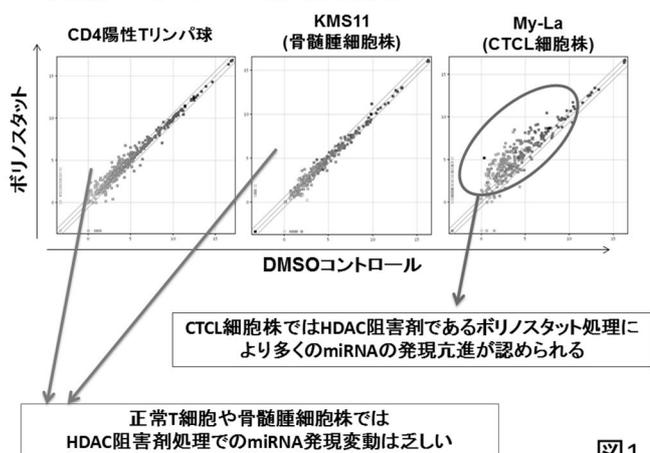


図1

さらに、これら発現亢進する miRNA の中には miR-16、miR-150 といった我々が報告してきたがん抑制的 miRNA が多く含まれていることを見出した。特に HDAC 阻害剤による miR-150 の発現回復によりケモカインレセプターである CCR6 の発現低下が生じることを明らかとし、HDAC 阻害剤により細胞遊走能の低下、転移浸潤能の低下が生じることが示され、HDAC 阻害剤の作用機序の重要な一つと考えられた (Abe, Kitadate, et al. Oncotarget 2017)。

CCR6 と同様に CCR4 も T 細胞リンパ腫における重要なケモカインレセプターであり、高発現症例が予後不良であることなどがすでに示されている。さらに重要な点として、CCR4 に対する抗体薬であるモガムリズマブも T 細胞リンパ腫に対する臨床的有効性が本邦より世界に向けて発信されている。そこで HDAC 阻害剤の CCR4 に対する影響を検討してみると、様々な T 細胞リンパ腫細胞株において HDAC 阻害剤が CCR4 の発現を顕著に低下させることを見出した。さらに、CCR4 発現低下は HDAC アイソフォームの中でも HDAC1、HDAC2 が主に制御していることを明らかにした。実際、ポリノスタット投与後に再発を認めた臨床検体では CCR4 の発現が投与前に比し低下していることを確認した。重要な点として、in vitro の検討では HDAC 阻害剤による前処理を行った細胞ではモガムリズマブの細胞障害活性を低下させてしまうことを見出した。これらの結果は、T 細胞リンパ腫の治療戦略に大きな影響をもたらすものと考えられる (Kitadate et al, Haematologica 2018)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kitadate Akihiro, Ikeda Sho, Abe Fumito, Takahashi Naoto, Shimizu Norio, Matsue Kosei, Tagawa Hiroyuki	4. 巻 103
2. 論文標題 Histone deacetylase inhibitors downregulate CCR4 expression and decrease mogamulizumab efficacy in CCR4-positive mature T-cell lymphomas	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 126 ~ 135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2017.177279	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Enzan N., Kitadate A., Tanaka A., Matsue K.	4. 巻 181
2. 論文標題 Incisional random skin biopsy, not punch biopsy, is an appropriate method for diagnosis of intravascular large B cell lymphoma: a clinicopathological study of 25 patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 British Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 200 ~ 201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjd.17603	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitadate Akihiro, Kobayashi Hiroki, Abe Yoshiaki, Narita Kentaro, Miura Daisuke, Takeuchi Masami, Matsue Kosei	4. 巻 105
2. 論文標題 Pre-treatment CD38-positive regulatory T cells affect the durable response to daratumumab in relapsed/refractory multiple myeloma patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 e37 ~ e40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2019.219683	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Akihiro Kitadate, Kota Fukumoto, Hiroki Kobayashi, Yoshiaki Abe, Kentaro Narita, Daisuke Miura, Masami Takeuchi, Kosei Matsue
2. 発表標題 Prognostic value of interim and end-of-treatment PET-CT in patients with mature T-cell and NK-cell lymphomas: A 10-Year Single Institution Study
3. 学会等名 60th ASH Annual Meeting and Exposition (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akihiro Kitadate, Sho Ikeda, Fumito Abe, Naoto Takahashi, Norio Shimizu, Kosei Matsue and Hiroyuki Tagawa
2. 発表標題 Histone deacetylase inhibitors downregulate CCR4 expression and decrease mogamulizumab efficacy in CCR4-positive malignant lymphomas
3. 学会等名 59th ASH Annual Meeting and Exposition (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Akihiro Kitadate, Kentaro Narita, Kota Fukumoto, Toshiki Terao, Takafumi Tsushima, Hiroki Kobayashi, Yoshiaki Abe, Daisuke Miura, Masami Takeuchi, Youichi Machida, Naoto Takahashi, Kosei Matsue
2. 発表標題 Baseline total lesion glycolysis combined with interim PET/CT is a robust predictor of outcome in patients with peripheral T-cell lymphoma
3. 学会等名 61th ASH Annual Meeting and Exposition (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考