

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17839

研究課題名(和文) 悪性リンパ腫における非コードRNA PVT1とPVT1内miRの役割解明

研究課題名(英文) The role of the non-coding RNA PVT1 in malignant lymphoma

研究代表者

細井 裕樹 (Hosoi, Hiroki)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00646036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：悪性リンパ腫発症における8番染色体長腕24バンド(8q24)のMYC下流にある long non-coding RNA (lncRNA)であるPVT1の役割を検討した。PVT1内に転座点を有する細胞株ではMYC周辺に転座点を有する細胞株よりMYC発現は高かった。転座点の位置とmiR発現量の間には一定の関係性は見られなかった。MYC発現を阻害するJQ1を作用させると、8q24転座を有する細胞株では細胞増殖が抑制された。その際、MYC発現のみでなくPVT1 5'の発現も低下した。PVT1 5'発現阻害とmiR1204阻害では現在のところ細胞増殖抑制効果は見られていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

8q24転座を有する悪性リンパ腫の中には予後が悪い一群があり、悪性リンパ腫に対する新たな治療法の開発が望まれる。8q24にはガン遺伝子であるMYCが存在するが、MYCは正常細胞でも重要な機能を有しているためMYCを標的とした薬剤の開発が難しい可能性がある。近年、lncRNAをターゲットとした核酸医薬開発への注目が高まっており、PVT1は治療標的になり得ると考えている。本研究は悪性リンパ腫発症におけるPVT1の役割を考える上で基礎的な知見を与える。

研究成果の概要(英文)：The role of PVT1, which is a long non-coding RNA gene located downstream of the MYC gene, was examined. The expression of MYC was higher in cell lines with breakpoints in the PVT1 gene than in cell lines with breakpoints around the MYC gene. The expression pattern of microRNAs encoded by PVT1 was not associated with the location of breakpoints in the 8q24 region. A BET bromodomain inhibitor, JQ1, suppressed the growth of B-cell lines with 8q24 breakpoints through the reduction of MYC and PVT1 5' expression. The inhibition of PVT1 5' and miR1204 expression did not lead to the suppression of B-cell proliferation.

研究分野：血液内科学

キーワード：PVT1 8q24転座 long non-coding RNA microRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性リンパ腫の予後は分子標的薬である抗 CD20 モノクローナル抗体により改善したが、進行期悪性リンパ腫の 5 年生存率は約 55% と十分ではない。悪性リンパ腫患者数は高齢化とともに増加傾向で、高齢者でも受けられる副作用の少ない治療薬の開発が必要であり、治療標的分子探索のための悪性リンパ腫発症機序解明は重要である。近年、次世代シーケンサーの開発などによりタンパク質をコードしない RNA 分子が遺伝子発現の調節に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。しかし、各種ガンの腫瘍化におけるそれらの役割は未だ不十分である。悪性リンパ腫発症において染色体転座点近傍には腫瘍発生に重要な遺伝子が存在することが多い。8q24 転座を有する悪性リンパ腫の中には極めて予後不良な疾患群があり、8q24 転座を有する悪性リンパ腫患者より細胞株を樹立して染色体転座点を解析した。8q24 転座点は MYC 下流にある PVT1 (Plasmacytoma variant translocation 1) 内に存在していた。そのため悪性リンパ腫発症には MYC のみでなく PVT1 も腫瘍化に関係していると考えた。PVT1 は種々の悪性リンパ腫で発現異常を呈すると報告されているが、悪性リンパ腫発症における PVT1 の役割はまだ明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は難治性悪性リンパ腫において long noncoding RNA (lncRNA) である PVT1 と PVT1 内 microRNA (miR) が悪性リンパ腫発症に果たす役割を解明することである。PVT1 が腫瘍発症に果たす役割は明らかでない。PVT1 内には 6 個の microRNA (miR) が存在する。miR は小さな機能性 RNA であり、近年様々な miR が腫瘍化に関連していることが報告されている。PVT1 は非常に大きな領域であるため、PVT1 に散在する miR に着目した。本研究により、申請者らが樹立した 8q24 に転座点を有する細胞株を用いて、PVT1 や PVT1 内 miR の悪性リンパ腫発症に果たす役割を明らかにし、難治性悪性リンパ腫の治療開発の糸口とすることを旨とする。

3. 研究の方法

当科で樹立した細胞株を含む下記の細胞株を用いた (表 1)。細胞培養液は RPMI+10%FBS を用いた。WILL3 の転座点解析は既報の如く行った (Shimanuki M., Hosoi H. et al. *Eur J Haematol* 2012)。細胞株からの RNA 抽出は RNeasy Mini kit、miRNeasy Mini kit (QIAGEN) を用いた。各細胞株における MYC、PVT1 の発現検討には QuantiTect SYBR Green PCR kit (QIAGEN)、Power Up SYBR Green kit (Applied Biosystems) を、miR 発現検討には miScript PCR system (QIAGEN) を用いた。qRT-PCR には CFX96 リアルタイム PCR システム (BioRad) を使用した。JQ1 (Sigma) 添加後の細胞増殖変化は Cell Counting kit-8 (Dojindo) を用い、吸光度をマイクロプレートリーダー (コロナ) で測定した。PVT1 阻害には Antisense LNA GapmeRs (QIAGEN) を、miR1204 阻害には miRCURY LNA miRNA Inhibitor (QIAGEN) を用いた。GapmeRs、miR inhibitor の細胞への導入には Lipofectamine 3000 (Invitrogen) を用いた。細胞導入効率検討について GapmeRs、miR1204 にラベルされた FAM の陽性率を蛍光顕微鏡 BZ-X800 (Keyence) と FACSVerse、FACSMelody (Becton Dickinson) を使用して解析した。

表 1 (細胞株と染色体転座点の関係。申請者らが樹立した細胞株を含む。)

細胞株	疾患	染色体転座	ゲノム上の遺伝子再結合
KHM2B	DHL	t(14;18)(q32;q21), t(8;14)(q24;q32)	<i>BCL2/IGH, MYC/IGH</i>
MD901	DHL	t(3;22)(q27;q11), t(8;22)(q24;q11)	<i>BCL6/IGA, PVT1/IGA</i>
WILL1	DHL	t(6;8;14)(q27;q24;q32)	?/ <i>MYC/IGH</i>
WILL2	DHL	t(14;18)(q32;q21), t(8;22)(q24;q11)	<i>BCL2/IGH, PVT1/IGA</i>
WILL3	DHL	t(14;18)(q32;q21), t(8;22)(q24;q11)	<i>BCL2/IGH, MYC/IGA</i>
WILL5	DLBCL	t(8;14)(q24;q32)	<i>MYC/IGH</i>
Raji	BL	t(8;14)(q24;q32)	<i>MYC/IGH</i>
KHM10B	BL	t(8;22)(q24;q11)	<i>PVT1/IGA</i>

4. 研究成果

(1) 新規樹立細胞株の 8q24 転座点の検討

難治性びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) の患者骨髄より細胞を抽出して培養し、新規細胞株 WILL3 を樹立した。骨髄液の G-band 検査で腫瘍細胞は t(14;18)(q32;q21)に加えて 8q24 転座を有していることが分かった。t(14;18)に関して、J_H のサザンブロット解析で IgH 再構成を確認した。J_H の long distance inverse PCR (LDI-PCR) を行い、PCR 産物のシーケンスを行って 14q32 の切断点を明らかにした。J_H は 18q21 の BCL2/ier と再結合していた。また、8q24 の転座点を明らかにするため、C_λ のサザンブロット解析を行い、C_{λ2} の LDI-PCR を行った。8q24 の転座相手は 22q11 であり、t(8;22)(q24;q11)は J_{λ2} と MYC 下流 5kb で再結合していた。8q24 転座点の近傍には activation induced cytidine deaminase 認識配列があった。

さらに、別の難治性 DLBCL の患者胸水より細胞を抽出して培養し、新規細胞株 WILL5 を樹立した。G-band 検査、FISH 検査で t(8;14)(q24;q32)を認めた。我々が樹立した細胞株を含む 8q24 転座点は図 1 のようにまとめられた。

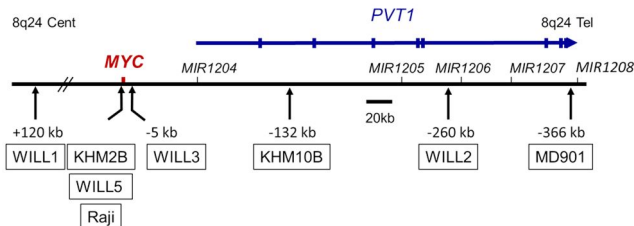


図 1 新たに樹立した細胞株を含む各種細胞株の 8q24 転座点

(2) 8q24 に転座点を有する細胞株の MYC 発現検討

種々の 8q24 転座点を有する細胞株を用いて、8q24 転座点の位置と MYC 発現に関連があるかを明らかにするため、MYC 発現を qRT-PCR 法で検討した。WILL3、KHM10B、WILL2 といった MYC 下流や MYC 下流の PVT1 内に切断点を有する細胞株では、Raji、KHM2B などの MYC 近傍に切断点を有する細胞株よりも MYC 発現は高かった (図 2)。ただ、WILL3、KHM10B、WILL2 は t(8;22)を有している。MYC 発現の違いは 8q24 転座相手が免疫グロブリン重鎖であるか、免疫グロブリンλ鎖であるかといった違いを反映している可能性も考えられた。

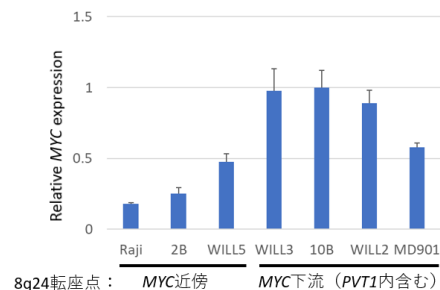


図 2 8q24 転座を有する細胞株の MYC 発現

(3) 8q24 に転座点を有する細胞株の PVT1 内 miR 発現検討

PVT1 は 300 kb をこえる大きな領域のため、PVT1 内に散在する miR に着目して、8q24 転座点を有する各細胞株における miR 発現を qRT-PCR 法で検討した。MYC 近傍に転座点を有する WILL5 に比べて、PVT1 内に転座点を有する細胞株では miR1206 以外の各 miR 発現は高い傾向にあった (図 3)。転座点の物理的位置と転座点前後の miR 発現量には関連性が認められなかった。miR1206 発現は KHM10B で極めて低く、MD901 で特に高かった。なお、miR1204 発現は絶対量としては低く、miR1204 発現の再検討を要する。

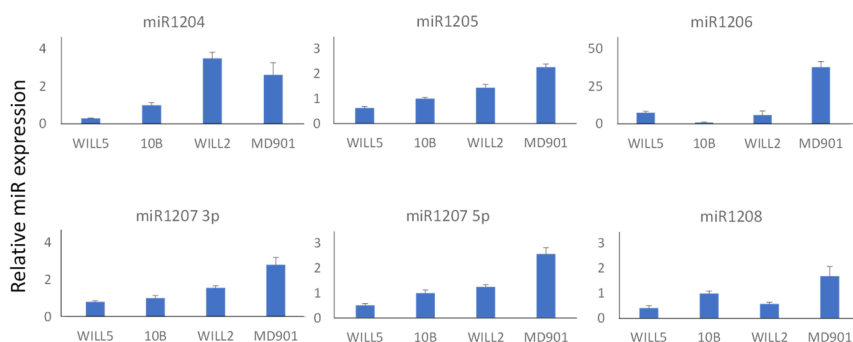


図 3 8q24 転座を有する細胞株における PVT1 内 miR 発現量 (KHM10B を 1 とする。)

(4) JQ1 による細胞増殖抑制効果の検討

PVT1 内に転座点を有する細胞株では *MYC* 発現が高かったため、JQ1 を用いて *MYC* 発現を低下させることによる細胞増殖変化を調べた。JQ1 は BET プロモドメイン阻害剤で、がん細胞特有のスーパーエンハンサーとよばれる遺伝子発現調節領域に作用することにより間接的に *MYC* 発現を阻害することが知られている。8q24 転座点を有する細胞に JQ1 を作用させると DMSO のみ添加のコントロール群と比較して細胞増殖が抑制された (図 4)。K562 は慢性骨髄性白血病細胞株で JQ1 抵抗性であることが報告されており、GM12878 は EB ウイルス関連リンパ芽球様細胞株で JQ1 感受性があることを他の研究で確認している (Hosoi H. et al. *Gene* 2021.)。 *PVT1* 内に転座点を有する細胞株である KHM10B、WILL2、MD901 では JQ 作用 24 時間後の早期より細胞増殖抑制がみられた。

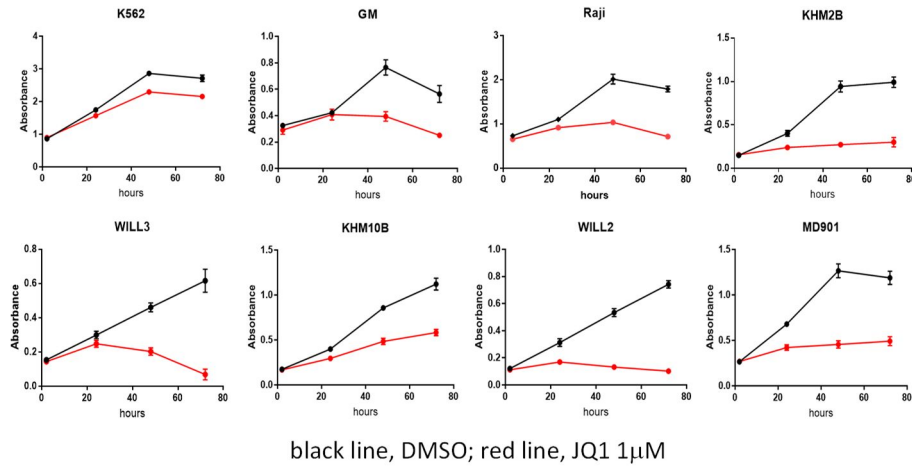


図 5 8q24 転座点を有する細胞株における JQ1 による細胞増殖抑制

(5) JQ1 作用下の *MYC*、*PVT1* 発現変化の検討

JQ1 作用後の細胞増殖抑制がみられた細胞株で *MYC* 発現を検討した。JQ1 作用後 3 時間で細胞を回収して RNA を抽出し、DMSO コントロール群と比較して *MYC* 発現の変化を調べた。KHM2B、KHM10B、MD901 では *MYC* 発現が低下していた (図 6 左)。興味深いことに *PVT1* 5' の発現も検討すると、JQ1 作用群では *PVT1* 5' 発現低下もみられていた (図 6 右)。特に *MYC* の下流に 8q24 転座点を有する細胞株である WILL3、KHM10B、WILL2、MD901 では JQ1 による *PVT1* 5' 発現低下割合は *MYC* 発現低下割合よりも高度であった。また、*PVT1* 5' 発現の低下に反して、*PVT1* 3' 発現は上昇していた (data not shown)。

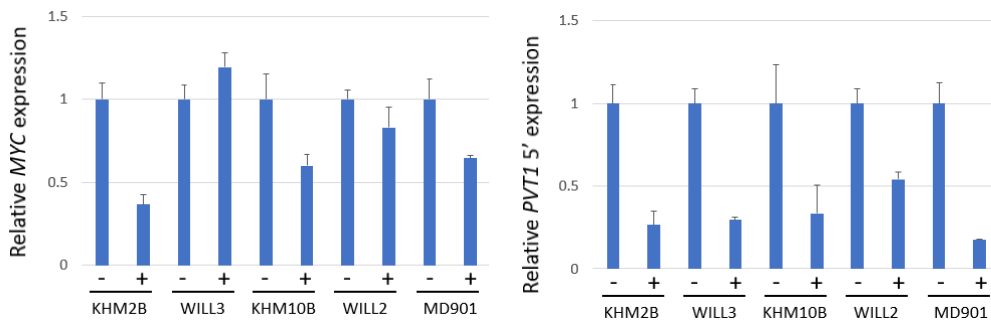


図 6 JQ1 による *PVT1* 5' (A)、*PVT1* 3' (B) の発現変化 (-: DMSO control; +: JQ1、各々の細胞株で control の *PVT1* 発現を 1 とする。)

(6) GapmeRs による *PVT1* 発現抑制下での細胞増殖変化の検討

PVT1 5' 領域に対して antisense oligonucleotide である GapmeRs を設計し、*PVT1* 5' 発現抑制下での各種細胞の細胞増殖変化を検討した。*PVT1* 5' 領域に対する GapmeRs 添加では細胞増殖抑制効果は示されなかった。ただ、*PVT1* 5' 抑制効果が低かったため、現在再検討を行っている。なお、蛍光顕微鏡、FACS による transfection 効率の評価では、transfection 効率は 3 割程度であった。

(7) miR inhibitor による miR1204 発現抑制下での細胞増殖変化の検討

JQ1 による細胞増殖抑制がみられた際に *PVT1* 5' の発現が抑制されていたことから、*PVT1* 5' に位置する miR1204 に着目した。miR1204 を抑制すると 8q24 転座点を有する細胞株の細胞増殖が抑制されると仮説をたて、miR1204 を miR1204 inhibitor で抑制した。miR1204 inhibitor を FAM label して transfection 効率をフローサイトメトリーで確認した。miR1204 inhibitor 作用後 24 時間で約 30% 程度の細胞に miR inhibitor が transfection されていた。miR1204 を阻害しても細胞増殖抑制はみられなかった。miR1204 発現量は低いため、qPCR による miR1204 抑制効果の正確な検討が困難であった。今後再検討の余地がある。

これらの結果から、*PVT1* は *MYC* と協同して悪性リンパ腫発症に何らかの作用を与えていると考えられる。*PVT1* 発現抑制効果の再検討と免疫グロブリンエンハンサーが *PVT1* に与える影響の検討を現在引き続き行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 吉田 菊晃、荒岡 秀樹、園木 孝志、田村 志宣、小浴 秀樹、山下 友佑、小畑 裕史、大岩 健洋、細井 裕樹、村田 祥吾、蒸野 寿紀、西川 彰則	4. 巻 60
2. 論文標題 びまん性大細胞型B細胞リンパ腫の救援化学療法中に発症したサイトメガロウイルス髄膜脳炎	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 124 ~ 129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.60.124	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 弘井 孝幸、小畑 裕史、細井 裕樹、西川 彰則、田村 志宣、園木 孝志、蒸野 寿紀、田中 顕、山下 友佑、栗山 幸大、村田 祥吾、古家 美昭、堀 善和、大岩 健洋	4. 巻 60
2. 論文標題 腹水濾過濃縮再静注法で症状が緩和した臍帯血移植後後期に発生した難治性腹水症	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 130 ~ 133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.60.130	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 Murata Shogo, Mushino Toshiki, Hosoi Hiroki, Kuriyama Kodai, Nishikawa Akinori, Nagakura Shoichi, Horikawa Kentaro, Yonemura Yuji, Nakakuma Hideki, Sonoki Takashi, Hanaoka Nobuyoshi	4. 巻 143
2. 論文標題 Soluble NKG2D Ligands Are Potential Biomarkers and Sentinels of Immune-Mediated Bone Marrow Injury in Bone Marrow Failure Syndromes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Haematologica	6. 最初と最後の頁 33 ~ 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000500657	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 Akagi Yuina, Murata Shogo, Yamashita Yusuke, Tanaka Ken, Hiroi Takayuki, Mushino Toshiki, Hosoi Hiroki, Nishikawa Akinori, Tamura Shinobu, Sonoki Takashi	4. 巻 59
2. 論文標題 Two Episodes of Transfusion-related Acute Lung Injury (TRALI) Occurring within a Short Period	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 2577 ~ 2581
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.4700-20	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 Hosoi Hiroki, Murata Shogo, Mushino Toshiki, Nishikawa Akinori, Sonoki Takashi	4. 巻 99
2. 論文標題 Eosinophilia during letermovir treatment after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Hematology	6. 最初と最後の頁 2453 ~ 2454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00277-020-04226-9	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 Hosoi H., Nishikawa S., Kida Y., Kishi T., Murata S., Iwamoto M., Toyoda Y., Yamada Y., Ikeda T., Sonoki T.	4. 巻 106
2. 論文標題 Susceptibility of patients receiving chemotherapy for haematological malignancies to scabies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Hospital Infection	6. 最初と最後の頁 594 ~ 599
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jhin.2020.08.021	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 Yamashita Yusuke, Morita Shuhei, Hosoi Hiroki, Kobata Hiroshi, Kishimoto Shohei, Ishibashi Tatsuya, Mishima Hiroyuki, Kinoshita Akira, Backes Bradley J., Yoshiura Koh-Ichiro, Papa Feroz R., Sonoki Takashi, Tamura Shinobu	4. 巻 21
2. 論文標題 Targeting Adaptive IRE1 Signaling and PLK2 in Multiple Myeloma: Possible Anti-Tumor Mechanisms of KIRA8 and Nilotinib	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6314 ~ 6314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21176314	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 Jianbiao Zhou, Jessie Yiyang Quah, Yvonne Ng, Jing-Yuan Chooi, Sabrina Hui-Min Toh, Baohong Lin, Tuan Zea Tan, Hiroki Hosoi, Motomi Osato, Qihui Seet, A.G. Lisa Ooi, Bertil Lindmark, Mark McHale, Wee-Joo Chng	4. 巻 105
2. 論文標題 ASLAN003, a potent dihydroorotate dehydrogenase inhibitor for differentiation of acute myeloid leukemia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 2286 ~ 2297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2019.230482	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 Hosoi Hiroki, Murata Shogo, Mushino Toshiki, Tamura Shinobu, Sonoki Takashi	4. 巻 -
2. 論文標題 Dose-adjusted high-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation for elderly (>70 years old) lymphoma patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Hematology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00277-020-04373-z	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 Hosoi Hiroki, Niibori-Nambu Akiko, Nah Giselle Sek Suan, Bahirvani Avinash Govind, Mok Michelle Meng Huang, Sanda Takaomi, Kumar Alan Prem, Tenen Daniel G., Ito Yoshiaki, Sonoki Takashi, Osato Motomi	4. 巻 774
2. 論文標題 Super-enhancers for RUNX3 are required for cell proliferation in EBV-infected B cell lines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 145421 ~ 145421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gene.2021.145421	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 該当する

1. 著者名 Hosoi Hiroki, Mushino Toshiki, Nakashima Kazutaka, Kuriyama Kodai, Tamura Shinobu, Murata Shogo, Imadome Ken-Ichi, Ohshima Koichi, Sonoki Takashi	4. 巻 -
2. 論文標題 Composite Epstein-Barr Virus-associated T-lymphoblastic and Peripheral T-cell Lymphomas: A Clonal Study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.6572-20	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 武田 里美、棚野 祐一、山下 友佑、細井 裕樹、蒸野 寿紀、西川 彰則、田村 志宣、園木 孝志、村田 祥吾、太根 美聡、吉田 菊晃、岩元 竜太、割栢 健史、榊 絢朱、横矢 悠馬、田中 顕	4. 巻 62
2. 論文標題 右房内腫瘍を契機に診断に至ったErdheim-Chester病	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 91 ~ 93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.62.91	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 細井裕樹、南部晶子、Michelle Mok, 園木孝志、大里元美
2. 発表標題 RUNX3 super-enhancer underlies Epstein-Barr virus mediated cell immortalization.
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 細井裕樹、村田祥吾、吉田菊晃、田中顕、弘井孝幸、森本将矢、大岩健洋、山下友佑、蒸野寿紀、西川彰則、田村志宣、園木孝志
2. 発表標題 Safety and efficacy of dose adjusted high-dose chemotherapy with ASCT for the elderly with lymphoma.
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 細井裕樹、村田祥吾、蒸野寿紀、田畑翔太郎、松山依子、吉田菊晃、赤木佑衣奈、小浴秀樹、田中顕、弘井孝幸、山下友佑、西川彰則、田村志宣、園木孝志
2. 発表標題 レテルモビル投与下の同種造血幹細胞移植後好酸球増多
3. 学会等名 第42回日本造血細胞移植学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------