

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590377

研究課題名（和文） T細胞性腫瘍におけるマイクロ RNA の意義

研究課題名（英文） Significance of microRNA in T-cell malignancies

研究代表者

稲垣 宏（INAGAKI HIROSHI）

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：30232507

研究成果の概要（和文）：

われわれは成人細胞白血病/リンパ腫（ATLL）細胞株を用いたマイクロ RNA アレイ解析および定量的 PCR を行い、6 種類のマイクロ RNA が ATLL 特異的に増加または減少していることを認めた。これらのマイクロ RNA の持つ臨床病理学的な意義を明らかにするために、多数の臨床検体を用いて検討したところ、マイクロ RNA-X の高発現が有意に予後不良因子であった。このマイクロ RNA-X の機能解析を行うために、細胞株に siRNA を導入し、その発現を抑制すると細胞増殖は有意に阻害された。以上よりマイクロ RNA-X は ATLL において重要な役割を有することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Using microRNA array and quantitative PCR for some cell lines, we screened six microRNAs that may be important in adult T-cell leukemia/ lymphoma (ATLL). Clinicopathological analysis of these six microRNAs showed that overexpression of one of these microRNAs (microRNA-X) was significantly associated with worse prognosis of the ATLL patients. Downregulation of microRNA-X by siRNA was associated with suppressed growth of the tumor cells of an ATLL cell line. These findings suggest that microRNA-X may play an important role in ATLL.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：成人 T 細胞性白血病、マイクロ RNA、臨床病理学、遺伝子異常、T 細胞、機能解析

## 1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA は、進化において保存されている 20 塩基程度の短い内在性 non-coding RNA で、標的 mRNA に特異的に結合し、mRNA の

翻訳抑制を行い、遺伝子発現を制御している。現在、哺乳動物のゲノムには 1000 種類以上のマイクロ RNA がコードされており、遺伝子

の少なくとも30%がこれらのマイクロRNAにより制御されていると考えられている。マイクロRNAは腫瘍の発生や進展において重要な役割を持つことが次第に明らかにされてきた。miR-21やmiR-196a-2は乳癌や膀胱癌で過剰発現しており、またlet-7、miR-143、miR-145は肺癌や大腸癌で著明に発現が減少していることが明らかとなった。これらのマイクロRNAの発現増加(または発現減少)は、その標的mRNAの発現抑制(または増加)につながり、腫瘍発生・進展に関与すると考えられている。リンパ性腫瘍におけるマイクロRNAの報告はB細胞性腫瘍を中心に発表されており、現在までに慢性リンパ性白血病におけるmiR-15/miR-16の発現低下、バーキットリンパ腫におけるmiR-155の発現上昇、びまん性大細胞性B細胞リンパ腫におけるmiR-143/miR-145の発現減少など多くの報告されている。しかしT細胞性またはNK細胞性リンパ腫におけるマイクロRNAの検討はこれまで報告が限られている。

## 2. 研究の目的

われわれはT細胞性腫瘍の中では研究が進んでいる成人細胞白血病/リンパ腫(ATLL)に着目している。わが国に多いATLLは、HTLV-1ウイルスの感染から長い潜伏期を経て発症する極めて予後の悪い疾患である。HTLV-1は逆転写され宿主ゲノムDNAにインテグレーションし、多くの蛋白をコードするが、特にTaxは癌遺伝子を含む様々な細胞遺伝子の発現誘導や、p16やp53などの癌抑制遺伝子の不活化に関与する。ATLLは、さらに複数の遺伝子異常を経て発症すると考えられている。

## 3. 研究の方法

ATLL細胞株を用いたマイクロRNAアレイ解析を行い、その発現が、ATLL特異的に増加または減少していることマイクロRNAをスクリーニングする。得られた結果を多くのATLL細胞株にて定量性PCRを用いて確認し、普遍性のあるマイクロRNAを同定する。これらのマイクロRNAを多数のATLL臨床症例に対して検討し、その高発現・低発現の臨床病理学的意義を検討する。そしてその発現の意義を再現するために、ATLL細胞株でマイクロRNAを発現を増加または減少させてやり、腫瘍細胞の変化を観察する。

われわれは数種類のATLL細胞株を用いたマイクロRNAアレイ解析を行い、数種類のマイクロRNA発現が、ATLL特異的に増加または減少していることを認めた。多くのATLL細胞株を用いて、これら数種類のマイクロRNAについてリアルタイムPCR装置にて相対定量を行ったところ、6種類のマイクロRNAで再現性が得られた。これらのマイクロRNAの持つ臨床病理学的な意義を明らかにするために、新鮮標本に対するリアルタイムPCR定量がパラフィン標本にても可能なことを確認し、6種類のマイクロRNAを相対定量した。そして多くの臨床病理学的因子とも関連を検討した。その結果、マイクロRNA-Xの高発現が有意に予後不良因子であった。このマイクロRNA-Xの機能解析を行うため、高発現している細胞株にsiRNAを導入し、その発現を抑制すると細胞増殖は有意に阻害された。よってマイクロRNA-XはATLLにおいて腫瘍細胞の増殖に重要な役割を有することが明らかとなった。

## 4. 研究成果

われわれは数種類のATLL細胞株を用いたマイクロRNAアレイ解析を行い、数種類のマイクロRNA発現が、ATLL特異的に増加または減少していることを認めた。多くのATLL細胞株を用いて、これら数種類のマイクロRNAについてリアルタイムPCR装置にて相対定量を行ったところ、6種類のマイクロRNAで再現性が得られた。これらのマイクロRNAの持つ臨床病理学的な意義を明らかにするために、新鮮標本に対するリアルタイムPCR定量がパラフィン標本にても可能なことを確認し、6種類のマイクロRNAを相対定量した。そして多くの臨床病理学的因子とも関連を検討した。その結果、マイクロRNA-Xの高発現が有意に予後不良因子であった。このマイクロRNA-Xの機能解析を行うため、高発現している細胞株にsiRNAを導入し、その発現を抑制すると細胞増殖は有意に阻害された。よってマイクロRNA-XはATLLにおいて腫瘍細胞の増殖に重要な役割を有することが明らかとなった。

## 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28件)

1. Mori F, Ishida T, Ito A, Sato F, Masaki A, Takino H, Ri M, Kusumoto S, Komatsu H, Ueda R, Inagaki H, Iida S. Potent antitumor effects of bevacizumab in a microenvironment-dependent human lymphoma mouse model. Blood Cancer Journal,

In press.

2. Yamada S, Sato F, Xia H, Takino H, Kominato S, Ri M, Ishida T, Iida S, Inagaki H, Yamada K. FOXP1 overexpression and its clinicopathological significance in peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified. *Hum Pathol*, in press.
3. Wada N, Zaki MA, Kohara M, Ogawa H, Sugiyama H, Nomura S, Matsumura I, Hino M, Kanakura Y, Inagaki H, Morii E, Aozasa K. Diffuse large B cell lymphoma with an interfollicular pattern of proliferation shows a favourable prognosis: a study of the Osaka Lymphoma Study Group. *Histopathology*. 2012, in press
4. Okumura F, Sakuma H, Nakazawa T, Hayashi K, Naitoh I, Miyabe K, Yoshida M, Yamashita H, Ohara H, Inagaki H, Joh T. Analysis of VH gene rearrangement and somatic hypermutation in type 1 autoimmune pancreatitis. *Pathol Int*, in press
5. Nishikawa H, Maeda Y, Ishida T, Gnjjatic S, Sato E, Mori F, Sugiyama D, Ito A, Fukumori Y, Utsunomiya A, Inagaki H, Old LJ, Ueda R, Sakaguchi S. Cancer/testis antigens are novel targets of immunotherapy for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*. 2012 ; 119 : 3097-104
6. Ishida T, Joh T, Uike N, Yamamoto K, Utsunomiya A, Yoshida S, Saburi Y, Miyamoto T, Takemoto S, Suzushima H, Tsukasaki K, Nosaka K, Fujiwara H, Ishitsuka K, Inagaki H, Ogura M, Akinaga S, Tomonaga M, Tobinai K, Ueda R. Defucosylated anti-CCR4 monoclonal antibody (KW-0761) for relapsed adult T-cell leukemia-lymphoma: A multicenter

phase II study. *J Clin Oncol*. 2012 ; 30 : 837-42

7. Kominato S, Nakayama T, Sato F, Yamada S, Xia H, Fujiyoshi Y, Hattori H, Inagaki H. Characterization of chromosomal aberrations in thymic MALT lymphoma. *Pathol Int*. 2012;62:93-8.
8. Ebi M, Kataoka H, Shimura T, Hirata Y, Mizushima T, Mizoshita T, Tanaka M, Tsukamoto H, Ozeki K, Tanida S, Kamiya T, Inagaki H, Joh T. The role of neuregulin4 and HER4 in gastrointestinal malignant lymphoma. *Mol Med Report*. 2011;4:1151-51.
9. Kojima M, Nakamura N, Nakazato Y, Igarashi T, Masawa N, Inagaki H. Light-chain-restricted monocytoid B-cell cluster in reactive lymphadenitis associated with Sjögren syndrome. *Leuk Lymphoma*. 2011;52:1150-2.
10. Xia H, Nakayama T, Sakuma H, Yamada S, Sato F, Takino H, Okabe M, Fujiyoshi Y, Hattori H, Inagaki H. Analysis of API2-MALT1 fusion, trisomies, and immunoglobulin VH genes in pulmonary mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Hum Pathol*. 2011;42:1297-304.
11. Sakuma H, Okumura F, Miyabe S, Sugiura M, Joh T, Shimozato K, Inagaki H. Analysis of VH gene rearrangement and somatic hypermutation in Sjogren's syndrome and IgG4-related sclerosing sialadenitis. *Scand J Immunol*. 2010;72:44-9.
12. Sato F, Ito A, Ishida T, Mori F, Takino H, Inagaki A, Ri M, Kusumoto S, Komatsu H, Iida S, Okada N, Inagaki H, Ueda R. A complement-dependent, cytotoxicity-enhancing anti-CD20 antibody mediating

potent antitumor activity in the humanized NOD/Shi-scid, IL-2R $\gamma$  (null) mouse lymphoma model. *Cancer Immunol Immunother.* 2010;59:1791-800.

13. Kojima M, Nakamura N, Itoh H, Kamiyoshihara M, Matsumoto M, Nakazato N, Fujisawa T, Motoori T, Masawa N, Inagaki H. Presence of immunoglobulin heavy chain rearrangement in so-called "plasma cell granuloma of the lung" *Pathol Res Pract.* 2010;206:83-7.

14. Yamamoto K, Utsunomiya A, Tobinai K, Tsukasaki K, Uike N, Uozumi K, Yamaguchi K, Yamada Y, Hanada S, Tamura K, Nakamura S, Inagaki H, Ohshima K, Kiyoi H, Ishida T, Matsushima K, Akinaga S, Ogura M, Tomonaga M, Ueda R. Phase I study of KW-0761, a defucosylated humanized anti-CCR4 antibody, in relapsed patients with adult T-cell leukemia-lymphoma and peripheral T-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2010;28:1591-8.

15. Kojima M, Motoori T, Tamaki Y, Igarashi T, Matsumoto M, Shimizu K, Ogawa A, Itoh H, Asano S, Masawa N, Inagaki H. Cyclin D1 protein overexpression in extramedullary plasmacytoma: A clinicopathologic study of 11 cases. *J Clin Exp Hemato.* 2009;49::53-6.

16. Ito A, Ishida T, Yano H, Inagaki A, Suzuki S, Sato F, Takino H, Mori F, Ri M, Kusumoto S, Komatsu H, Iida S, Inagaki H, Ueda R. Defucosylated anti-CCR4 monoclonal antibody exercises potent ADCC-mediated antitumor effect in the novel tumor-bearing humanized NOD/Shi-scid, IL-2R $\gamma$ (null) mouse model. *Cancer Immunol Immunother.*

2009;58:1195-206.

17. Ito A, Ishida T, Utsunomiya A, Sato F, Mori F, Yano H, Inagaki A, Suzuki S, Takino H, Ri M, Kusumoto S, Komatsu H, Iida S, Inagaki H, Ueda R. Defucosylated anti-CCR4 monoclonal antibody exerts potent ADCC against primary ATLL cells mediated by autologous human immune cells in NOD/Shi-scid, IL-2R $\gamma$ (null) mice in vivo. *J Immunol.* 2009;183:4782-91.

18. Kojima M, Tsukamoto N, Yokohama A, Suzuki Y, Shimizu K, Nishikawa M, Murayama K, Miyanaga T, Isoda A, Shimizu K, Itoh H, Masawa N, Yoshida K, Inagaki H. B-cell lymphoma associated with Sjogren's syndrome among Japanese patients: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 15 cases. *J Clin Exp Hemato.* 2009;49:89-95.

[学会発表] (計 37 件)

1. Mori F, Inagaki H, et al. Bevacizumab-induced potent antitumor effect in a microenvironment-dependent mouse lymphoma model. 第 73 回日本血液学会学術集会 2011 年 10 月 14-16 日 名古屋国際会議場 (愛知)

2. Totani H, Inagaki H, et al. Late relapse more than 5 years following limited-stage extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type. 第 73 回日本血液学会学術集会 2011 年 10 月 14-16 日 名古屋国際会議場 (愛知)

3. Ito A, Inagaki H, et al. Establishment of an angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) model in the NOG mouse. 第 73 回日本血液学会 プレナリー発表 2011 年 10 月 14-16 日 名古屋国際会議場 (愛知)

4. Suzuki S, Inagaki H, et al. Potent Tax-specific CTL response to primay

autologous ATL cells. 第73回日本血液学会学術集会 2011年10月14-16日 名古屋国際会議場 (愛知)

5. Yoshida T, Inagaki H, et al.

Differential effect of thalidomide in the treatment of POEMS syndrome: Two case reports. 第73回日本血液学会学術集会 2011年10月14-16日 名古屋国際会議場 (愛知)

6. 佐久間英規、稲垣宏、他 自己免疫性膵炎の免疫グロブリン遺伝子解析 第51回日本リンパ網内系学会総会 2011年6月30-7月2日 福岡国際会議場 (福岡)

7. 伊藤旭、稲垣宏、他 NOG マウスによる T 細胞性リンパ腫の病態解明 第51回日本リンパ網内系学会シンポジウム (招待講演) 2011年6月30-7月2日 福岡国際会議場 (福岡)

8. 佐久間英規、稲垣宏、他 シェーグレン症候群および IgG4 関連慢性硬化性唾液腺炎における免疫グロブリン重鎖遺伝子解析 第100回日本病理学会総会 2011年4月26-28日 パシフィコ横浜 (神奈川)

9. 山田勢至、稲垣宏、他 非特定末梢型 T 細胞リンパ腫における FOXP1 遺伝子発現の臨床病理学的意義 第100回日本病理学会総会 2011年4月26-28日 パシフィコ横浜 (神奈川)

10. 佐藤文彦、稲垣宏、他 NOG マウスリンパ腫モデルに対して CDC 増強抗 CD20 抗体の抗腫瘍活性の検討 第100回日本病理学会総会 2011年4月26-28日 パシフィコ横浜 (神奈川)

11. 夏洪晶、稲垣宏、他 成人 T 細胞白血病・リンパ腫におけるマイクロ RNA 発現異常の解析 第100回日本病理学会総会 2011年4月26-28日 パシフィコ横浜 (神奈川)

12. Ito A, Inagaki H, et al. A CDC-enhancing anti-CD20 mAb mediating

potent antitumor activity in the humanized NOG mouse model. 第72回日本血液学会総会 2010年9月24-26日 パシフィコ横浜 (神奈川)

13. 夏洪晶、稲垣宏、他 肺 MALT リンパ腫における遺伝子異常と IgH 遺伝子体細胞変異 第50回日本リンパ網内系学会総会 2010年6月18-19日 新潟コンベンションセンター (新潟)

14. 稲垣宏 縦隔・胸腺のリンパ増殖性疾患の診断 シンポジウム2 縦隔腫瘍の多様性はどこまでわかってきたか 第99回日本病理学会総会 (招待講演) 2010年4月27-29日 京王プラザホテル (東京)

15. 稲垣宏 造血系腫瘍の病理学的概要 第3回伴侶動物の臨床医学研究会 (招待講演) 2009年12月3-5日 岡崎コンファレンスセンター (愛知)

16. 稲垣宏 悪性リンパ腫: 病理診断と治療 第48回中部医学検査学会 (招待講演) 2009年11月7-8日 三島市民文化会館 (静岡)

17. 伊藤旭、稲垣宏、他 ヒト免疫担当細胞移入 NOD/Shi-scid, IL2Rgamma null (NOG) マウスを用いた抗体療法評価システムの確立 第71回日本血液学会総会 2009年10月23-25日 京都国際会議場 (京都)

18. 稲垣淳、稲垣宏、他 EBER 陽性の ALK 陰性 anaplastic large cell lymphoma (ALCL) の2例 第71回日本血液学会総会 2009年10月23-25日 京都国際会議場 (京都)

19. 森美子、稲垣宏、他 B-LBL モデルマウスの樹立及び病態解析 第71回日本血液学会総会 2009年10月23-25日 京都国際会議場 (京都)

20. 伊藤旭、稲垣宏、他 ヒト免疫担当細胞移入 NOD/Shi-scid, IL2Rgamma null (NOG) マウスを用いた抗体療法評価システムの確立 第68回日本癌学会総会 2009年10月1-3

日 パシフィコ横浜 (神奈川県)

21. 滝野寿、稲垣宏、他 胸腺 MALT リンパ腫  
における遺伝子過剰メチル化と Fas 遺伝子異  
常の解析 第 98 回日本病理学会総会 2009 年  
5 月 1-3 日 京都国際会議場 (京都)

[図書] (計 3 件)

1. 稲垣宏, 楠本茂, 片岡洋望 中山書店 癌  
診療指針のための病理診断プラクティス: 食  
道癌・胃癌 2012 307
2. 稲垣宏, 楠本茂 中山書店 癌診療指針の  
ための病理診断プラクティス: リンパ球増殖  
疾患 2010 335
3. 佐藤文彦、稲垣宏 医薬ジャーナル社  
WHO 血液腫瘍分類 WHO 分類 2008 をうまく活  
用するために 2010 587

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/patho2.dir/4pep.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

稲垣 宏 (INAGAKI HIROSHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 30232507

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし