

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23701080

研究課題名（和文）造血器腫瘍におけるがん抑制的 microRNA の同定

研究課題名（英文）To identify the role of microRNA as a tumor suppressor in hematological malignancy

研究代表者

渡部 敦（WATANABE ATSUSHI）

秋田大学・医学部・助教

研究者番号：80567157

研究成果の概要（和文）：

複数の造血器腫瘍を対象とした microRNA 発現解析から、B 細胞、T 細胞、NK 細胞リンパ腫の細胞株・患者検体では miR-150 の著明な発現低下を認めた。複数の NK リンパ腫細胞株に対し miR-150 を強制発現させたところ、miR-150 は AKT2, DKC1 を標的遺伝子とし抑制し、腫瘍細胞が Senescence（細胞老化）に至ることを認めた。悪性リンパ腫の造腫瘍性に miR-150 の発現低下が大きく関与する事が示唆された。他の造血器腫瘍に関して解析を継続している。標的遺伝子の同定は新規診断・治療法の可能性を秘めており意義のある解析結果であったと考える。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed aberrant expression of microRNAs in hematological malignancies. The levels of miR-150 expression in several lymphoma cell lines and clinical samples are significantly lower than in normal NK cells. We also found that miR-150 directly downregulates the expression of DKC1 and AKT2. These results suggest that miR-150 works as a tumor suppressor, and leading to telomerase activation. These findings provide new insight into the pathogenesis of malignant lymphoma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：MicroRNA, 造血器腫瘍, 悪性リンパ腫, Mir-150, 細胞老化

1. 研究開始当初の背景

MicroRNA (以下 miRNA, miR) は、20-24 塩基の non-coding RNA であり動物・植物・ウ

イルスなどあらゆる生物に存在する。MiRNA は標的遺伝子の 3' UTR (3' Un-Translated Region; 非翻訳領域) にある相補配列に部分的に結合する事により、その遺伝子の発現を

蛋白翻訳レベル（あるいは mRNA 発現を抑制する事もある）で抑制する。ヒトでは遺伝子の 1/3 以上が miRNA による発現調節を受け、細胞の分化、発達に重要な役割を担っている。

がん細胞では、microRNA を介して本来抑制されるべきでないがん抑制遺伝子の抑制や、本来抑制しているがん遺伝子の抑制が外れることにより、がんの進展に深く関与していると考えられ、複数の腫瘍において microRNA の発現解析が報告されている。

我々はこれまでに、NK/T リンパ腫を対象に microRNA 発現解析を行い、miR-21, miR-155 が発現亢進し造腫瘍性に関与している事を見いだした。さらに機能解析から、がん抑制遺伝子である PTEN, SHIP1 をそれぞれ抑制することで AKT シグナルの異常活性を引き起こし、主に抗アポトーシス作用を増強して造腫瘍性に寄与する事を明らかにした。がん抑制的に働く microRNA の解析報告は報告も少なくさらなる検討が必要であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、造血器腫瘍において発現が低下する事で本来の働きを失ってしまった「がん抑制的 microRNA」を同定することである。

3. 研究の方法

- (1) 造血器腫瘍で発現が低下している miRNA の同定
- (2) miRNA 機能解析から標的遺伝子の解明

について検討を行った。

(1) MicroRNA 発現解析として、miRNA array、Northern blot 法および Taqman PCR 法を用いて、悪性リンパ腫細胞株（NK/T 細胞リンパ腫：11 細胞株、CD56+T 細胞リンパ腫：5 細胞株、B 細胞リンパ腫：2 細胞株）とそれぞれの正常対応細胞で発現比較を行った。さらに、いくつかの候補 miRNA に対して臨床検体を加えて発現比較を行った。

(2) 候補となったがん抑制的 miRNA をレンチウイルスベクターを用いてリンパ腫細胞株

に導入し、細胞周期や抗アポトーシス、細胞老化など腫瘍能の変化について検討を行った。また、標的遺伝子の同定を western blot, Luciferase assay を用いて行った。

4. 研究成果

MicroArray による MicroRNA 発現解析では、いずれの B 細胞 T 細胞 NK 細胞株、臨床検体ともに正常対応細胞に比べて miR-150 の発現が有意に低下していた。特に NK 細胞リンパ腫では著しい低下を示した。（図 1, 図 2）

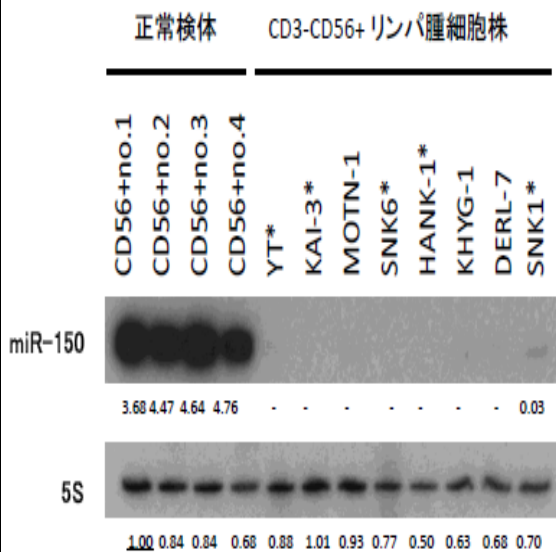


図1, Northern blot法によるMiR-150発現解析

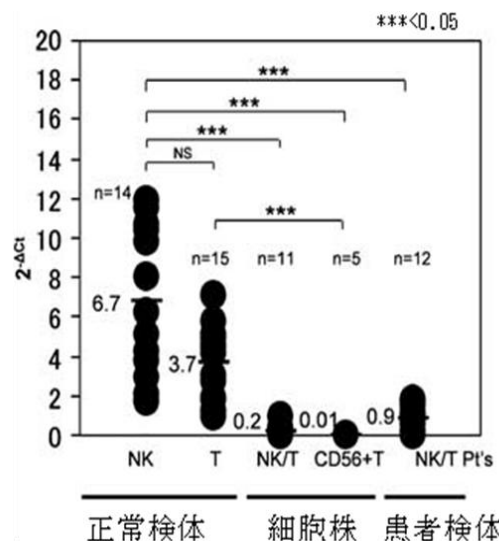


図2, 定量PCRによるMiR-150発現解析

MiR-150 の機能解析の為に、レンチウイルスベクターを用いて腫瘍細胞株に miR-150 を強制発現させたところ、増殖抑制がおこるとともに細胞の膨化などの形態変化を伴っており、それらの細胞は SA-β gal 染色陽性であることから細胞老化 (senescence) が誘導されていると考えられた。(図 3)

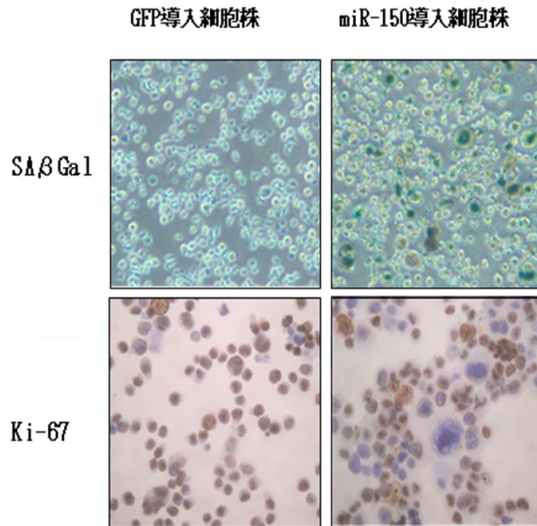


図 3, SA-β gal 染色

テロメラーゼ活性測定 (TRAP assay) では miR-150 導入によりリンパ腫細胞株のテロメラーゼ活性が消失し、Southern blot によるテロメア長の計測では、miR-150 導入後には継代するに従ってテロメア長が短縮しており、senescence が誘導されたことが示唆された。(図 4)

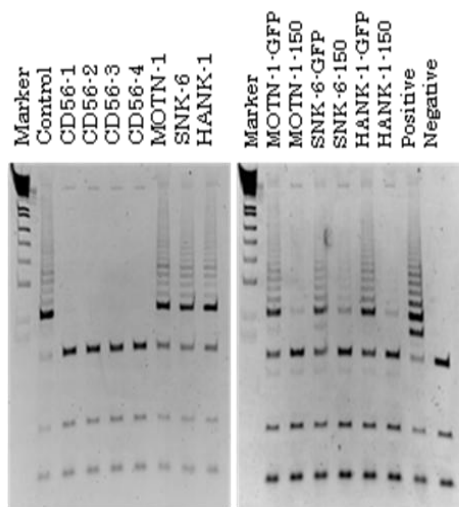


図 4, TRAP法によるテロメラーゼ活性解析

miR-150 の標的遺伝子同定のために western blot により miR-150 導入前後の蛋白発現変化を検討したところ、AKT2 と Dyskerin の 2 つの蛋白発現減少と p-AKT, Bim, P53 といった下流の蛋白発現異常を認めた。(図 5)

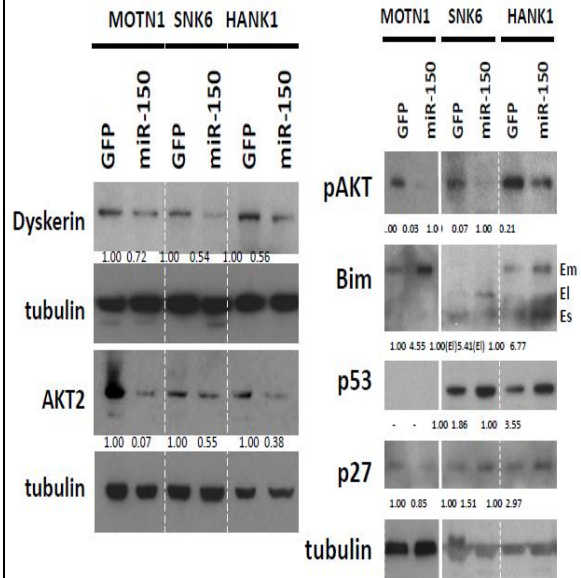


図 5, Western blot による蛋白発現解析

標的遺伝子同定のために、Luciferase vector に AKT2 および DKC1 の 3' UTR をそれぞれ組み込んだところ、miR-150 による抑制効果を認めた。AKT2, DKC1 が miR-150 の直接標的であると考えられた。

< 考察 >

悪性リンパ腫において複数の細胞株、臨床検体ともに miR-150 の発現が低下していた。miR-150 の標的遺伝子は AKT2, DKC1 であり、細胞周期、抗アポトーシス、senescence に働き、テロメラーゼ活性を抑制することにより細胞のテロメア短縮から細胞分裂停止へと導き、がん抑制的に働く事が同定された。これまでに我々が報告した造腫瘍性 microRNA である miR-21, MIR-155 の発現亢進とがん抑制的 microRNA である miR-150 の発現低下という 3 つの miRNA の発現異常がいずれも PI3K-AKT signal の異常に関与しており、悪性リンパ腫の造腫瘍性の本質に迫る結果であったと考えられる。NK/T 細胞リンパ腫におけるがん抑制的 miRNA の機能解析の報告は

これまでになく、今後の診断技術の進歩や新規治療の開発に貢献する可能性のある、新しい知見として期待される。

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1件)

- (1) Watanabe A, Tagawa H, Yamashita J, Teshima K, Nara M, Iwamoto K, Kume M, Kameoka Y, Takahashi N, Nakagawa T, Shimizu N, Sawada K. The role of microRNA -150 as a tumor suppressor in malignant lymphoma. *Leukemia* 25(8)p1324-1234, 2011, 査読あり. DOI: 10.1038/leu.2011.81

[学会発表] (計3件)

- (1) 渡部敦, 田川博之, 澤田賢一. The role of mir -150 as a tumor suppressor in NK/T cell lymphoma. 第70回日本癌学会学術総会. 2011年10月5日. 名古屋国際会議場
- (2) 渡部敦, 田川博之, 手島和暁, 奈良美保, 亀岡吉弘, 高橋直人, 久米正晃, 清水則夫, 澤田賢一. The role of mir-150 as Tumor suppressor in malignant lymphoma. 第73回日本血液学会学術集会. 2011年10月15日. 名古屋国際会議場
- (3) 伊藤貢, がん抑制的マイクロ RNA-150 の T細胞リンパ腫における役割. 第74回日本血液学会学術集会. 2012年10月20日. 京都国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡部 敦 (WATANABE ATSUSHI)
秋田大学・医学部・助教
研究者番号：23701080