

## 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 5 月 17 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011 年度～2012 年度

課題番号：23791868

研究課題名（和文）鼻性 NK/T 細胞リンパ腫における microRNA の発現

研究課題名（英文） Expression of the MicroRNAs in Nasal Natural Killer/T-Cell Lymphoma

研究代表者

岸部 幹 (KISHIBE KAN)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：80447101

研究成果の概要（和文）：

鼻性 NK/T 細胞リンパ腫（EBV 陽性）にて、ヒトの microRNA の発現をスクリーニングしたところ、mir-15a が正常 NK 細胞、EBV 陰性の非鼻性 NK 細胞リンパ腫より発現低下している microRNA として同定された。mir-15a は、EB ウイルス感染により発現した LMP1 によりその発現が抑制され、その miR-15a の発現低下は、MYB、cyclin D1 の発現を介し、細胞周期および細胞増殖能を亢進させ、リンパ腫の発生や進展に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We found that microRNA (miR)-15a was expressed at a much lower level in Nasal NK/T cell lymphoma (NNKTL) cells than in normal peripheral NK-cells and EBV-negative NK-cell line KHYG-1. In NNKTL, down-regulation of miR-15a possibly due to LMP1 implicates in the pathogenesis of NNKTL through cell proliferation via enhancing expressions of the targeting MYB and cyclin D1.

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	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：鼻性 NK/T 細胞リンパ腫、Epstein-Barr virus、マイクロRNA、mir-15a

## 1. 研究開始当初の背景

鼻性 NK/T 細胞リンパ腫は、顔面正中部である鼻腔や咽頭に初発し、急速に進行する壊死性肉芽腫性病変を主体とする T または NK 細胞由来の悪性リンパ腫である。病理組織上ほとんどが壊死組織や炎症細胞浸潤の所見で腫瘍細胞が確認しにくいことから診断は困難であり、既存の治療法に抵抗性を示すため予後が極めて不良である。また、発症には地域差があり、欧米では少なく、日本を含めたアジアで発症頻度が高い。また、まれな疾患であるためその病態解明も立ち遅れている。

## 2. 研究の目的

鼻性 NK/T 細胞リンパ腫は、鼻腔や咽頭に

初発し、顔面正中部に沿って進行する破壊性、壊死性の肉芽腫性病変を主体とする NK 細胞あるいは  $\gamma\delta$ T 細胞由来のまれなリンパ腫である。また、本リンパ腫は腫瘍細胞に Epstein-Barr virus (EBV) を認め、その発症への関与も報告されている。本疾患は、他のリンパ腫より破壊性が強いことが特徴である。また、このリンパ腫は肺、皮膚、消化管などの他臓器への浸潤が高頻度に出現し、予後が極めて不良である。しかし、これまでにその病態の解明は、まれな疾患もあってか十分ではない。また、近年発症のメカニズムのひとつとして microRNA の発現異常による発症が様々な癌で報告され、RNA を使用した薬剤への道も開けてきている。しかし、

本疾患における microRNA の報告はまだほとんどない。本研究では鼻性 NK/T 細胞リンパ腫におけるヒトの microRNA の発癌への関与を調べることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株で、発現異常のある micro RNA をスクリーニングする

鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株である SNK6、SNT1、SNT8 (EBV 陽性)、正常 NK 細胞、非鼻性 NK 細胞リンパ腫細胞株である KHYG-1 (EBV 陰性) から、micro RNA を抽出し、microRNACURY LNA Array microRNA labeling kit にてラベリングしたのち、東レ社の 3D-Gene Human microRNA Oligo chips にハイブリダイズさせ、解析した。

#### (2) リアルタイム PCR

micro RNA については、TaqMan microRNA assays (Applied Biosystems 社) を使用し、MYB、サイクリン D1、LMP1 については、サイバーグリーンを用いて、LightCycler 480 (Roche 社) にて行った。

#### (3) 遺伝子導入

Neon transfection system (Invitrogen 社) を用い、エレクトレポレーション法にて premiR-15a や、各遺伝子の siRNA を導入した。

#### (4) 細胞周期解析

Propidium iodide (PI)/RNase Staining Buffer (BD biosciences 社) を用いて、各細胞株を処理したのち、フローサイトメトリーを行い、ModFit LT software (Verity Software House 社) にて解析した。

#### (5) 細胞増殖アッセイ

細胞増殖は、CellTiter 96 Aqueous One Solution Proliferation Assay (Promega 社) を用いて行った。24、48、72 時間後に測定し、未処理のコントロール細胞株と比較した。

#### (6) ウェスタンブロット

細胞株より蛋白を抽出し、1 次抗体に rabbit monoclonal anti-MYB (clone EP769Y Abcam, Cambridge 社)、mouse monoclonal anti-cyclin D1 (clone DSC-6 DAKO, Glostrup 社)、mouse monoclonal anti-Cdk1/Cdc2 (clone 1/Cdk1/Cdc2 BD biosciences 社)、mouse monoclonal anti-LMP1 (clone CS1-4 DAKO 社) and mouse monoclonal anti- $\alpha$ -tubulin (clone DM 1A SIGMA 社) を用いて行った。

#### (7) 免疫染色

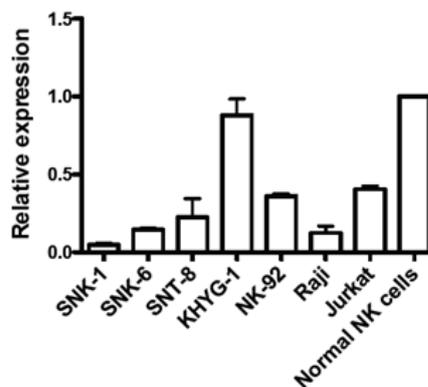
臨床検体の免疫染色は、フォルマリン固定、パラフィン包埋切片を用い、Envision G2 Doublestain System (DAKO 社) を使用して行った。1 次抗体として、rabbit monoclonal anti-MYB antibody (clone EP769Y Abcam 社)、rabbit monoclonal anti-cyclin D1 antibody (clone EP12 DAKO 社)、mouse monoclonal anti-CD56 antibody (Novocastra 社) を用いた。CD56 陽性細胞のうち、MYB もしくは、サ

イクリン D1 陽性細胞が 25% 以上を陽性と判断した。

### 4. 研究成果

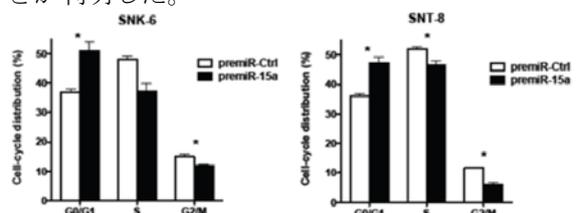
#### (1) Mir-15a は鼻性 NK/T 細胞リンパ腫で発現低下している

鼻性 NK/T 細胞リンパ腫にて、発現異常のある micro RNA をスクリーニングした。正常の NK 細胞と非鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株である KHYG-1 と比較し、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株である SNK1 と SNK6 で 2 倍以上発現低下のあった候補 micro RNA の中に mir-15a があり、これに着目して実験を進めた。mir-15a の発現を、他のリンパ腫細胞株、正常 NK 細胞と鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株の比較をリアルタイム PCR にて検討した。鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株である SNK-6、SNK-1、SNT-8 の mir-15a の発現は正常 NK 細胞と非鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株である KHYG-1 より 1/10 から 2/3 以上の発現低下を認めた。

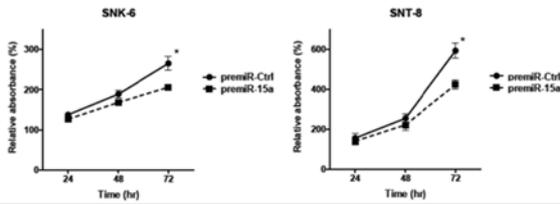


#### (2) mir-15a をトランスフェクションすると、G1 停止をおこす

mir-15a の標的遺伝子として、細胞周期を制御する複数の分子が同定されている。そこで、mir-15a の機能を見るために、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株 SNK6、SNT8 に premiR-15a をトランスフェクションさせ、細胞周期をしらべた。すると、G0/G1 期の細胞がトランスフェクションにより増加しており、mir-15a の発現増加は G1 停止をおこさせることが判明した。

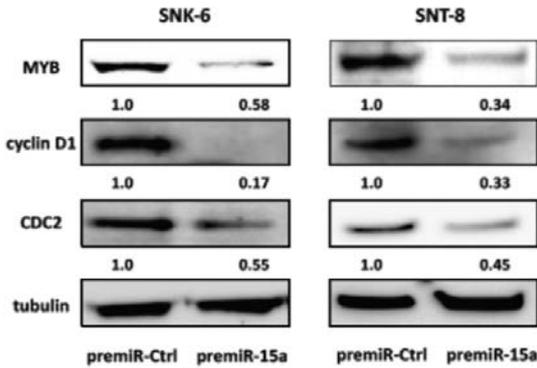


また、premiR-15a をトランスフェクションした鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株の増殖は 72 時間後に減じることが判明した。

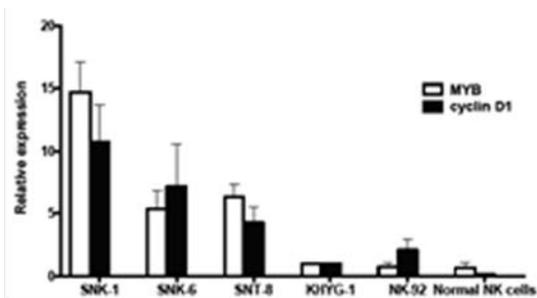


### (3) mir-15a の標的遺伝子は MYB、サイクリン D1 であり、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株でその発現上昇を認める

mir-15a の標的遺伝子として MYB、サイクリン D1 が targetscan にて同定された。これら標的遺伝子は G1 停止を解除させ、G1/S 期への細胞周期をすすめる機能がある。pre miR-15a をトランスフェクションさせ、これら標的遺伝子の発現が低下するかウェスタンブロットにて調べた。また、MYB の下流にある分子である CDC2 の発現も同時に調べた。pre miR-15a をトランスフェクションさせることにより、MYB、サイクリン D1、CDC2 の発現が低下した。これらから、mir-15a の標的遺伝子として MYB、サイクリン D1 があり mir-15a によりその発現が制御されていることが判明した。

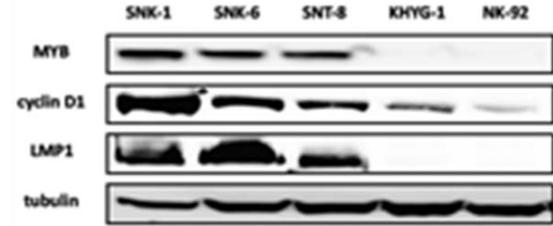


mir-15a の標的遺伝子である MYB、サイクリン D1 の鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株での発現をリアルタイム PCR にて調べた。MYB、サイクリン D1 の発現は、正常 NK 細胞と非鼻性 NK 細胞リンパ腫細胞株である KHYG-1、NK-92 より鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株で亢進していた。



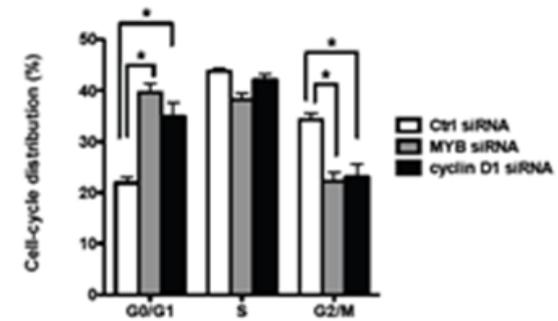
また、蛋白レベルでの標的遺伝子の発現もウェスタンブロットにて調べたところ鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞で非鼻性 NK 細胞リンパ腫細胞株である KHYG-1、NK-92 よりその発

現が高進していた。

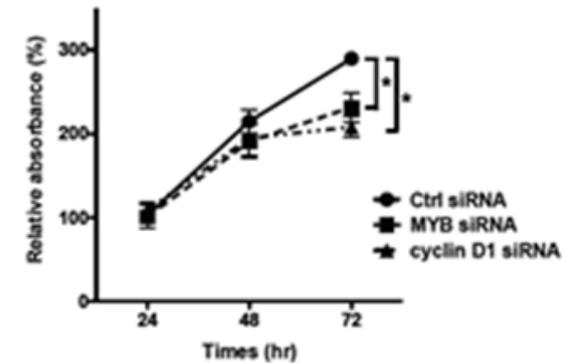


### (4) MYB とサイクリン D1 の機能は細胞増殖に関与する

MYB とサイクリン D1 の siRNA を用い、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株 SNK6 で RNA 干渉実験をおこなった。細胞周期を調べたところ、MYB、サイクリン D1 の siRNA 導入株で G0/G1 期の細胞が増加し、G2/M 期の細胞が減少していた。これにより MYB とサイクリン D1 の発現を低下させると、G1 停止が起こることが判明した。



また、MYB、サイクリン D1 の siRNA 導入株では、72 時間後に細胞増殖が減ることが判明した。

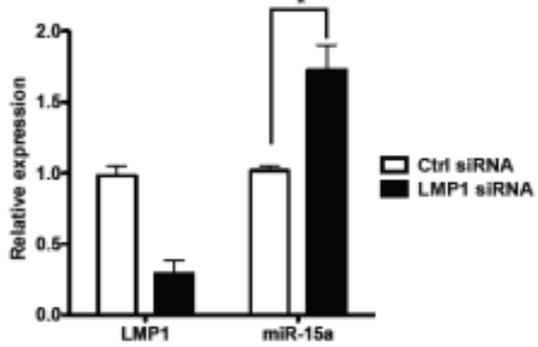


これらから、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株では、mir-15a が MYB とサイクリン D1 を介した G1/S 期への進行を抑制することにより、細胞増殖を制御しうることが示唆された。

### (5) EBV 由来の LMP1 が Mir-15a の発現を低下させる

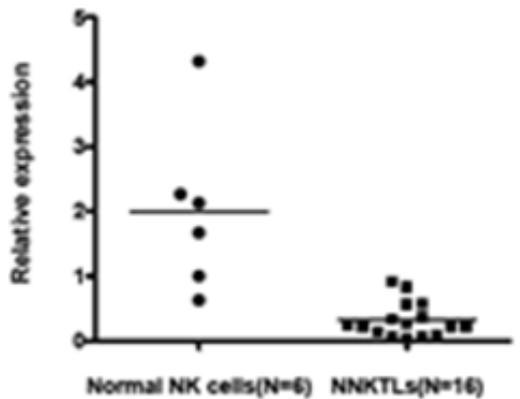
LMP1 の siRNA を鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株に導入し、mir-15a の発現が低下するか検討した。LMP1 の siRNA 導入株で、mir-15a の発現をリアルタイム PCR にて検討したところ、mir-15a の発現は低下していた。このことから、LMP1 が mir-15a の発現を低下させる

ことが判明した。



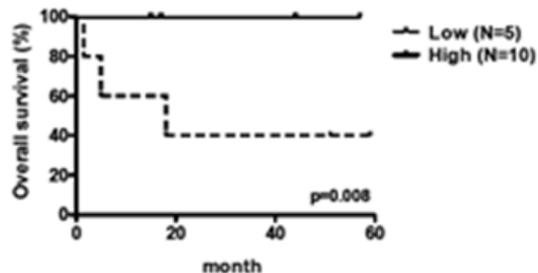
(6) 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫の臨床検体では、mir-15a の発現低下、MYB、サイクリン D1 の発現亢進を認め、mir-15a の発現低下は予後不良因子である

鼻性 NK/T 細胞リンパ腫の臨床検体 16 例について、mir-15a、MYB、サイクリン D1 の発現を検討した。mir-15a については、定量的 RT-PCR にて検討をおこない、正常 NK 細胞より鼻性 NK/T 細胞リンパ腫で有意に発現低下を認めた。



また、臨床検体 16 例を用いて MYB とサイクリン D1 の免疫染色をおこなったところ、MYB とサイクリン D1 の陽性はそれぞれ、7 例 (44%)、5 例 (31%) であり、臨床検体でも MYB とサイクリン D1 の発現を認めた。

また、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫で当科にて治療をおこなった 15 例で、mir-15a の発現を低発現群と高発現群に分けて検討した。 Kaplan-Meier 法で、高発現群では 5 年生存率が 100% であるのに対して、低発現群では 5 年生存率は 25% と低率であり、統計学的にも有意差を認めた。



以上の結果から、EB ウイルス感染により発現した LMP1 により miR-15a 発現が抑制され、その miR-15a の発現低下は、MYB、cyclin D1 の発現を介し、細胞周期および細胞増殖能を亢進させ、リンパ腫の発生や進展に寄与している可能性が示唆された。

#### 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 4 件)

(1) 岸部 幹、原 洸 保明：【HPV・EBV と頭頸部腫瘍】 EBV と悪性リンパ腫、耳鼻咽喉科・頭頸部外科 84 (9) 655-661、2012

(2) 岸部 幹、原 洸 保明：【唾液腺腫瘍-診療所で可能な鑑別診断-】 悪性リンパ腫、MTX 関連リンパ増殖性疾患、ENTONI 148 52-58、2012

(3) Yoshino K, Kishibe K, Nagato T, Ueda S, Komabayashi Y, Takahara M, Harabuchi Y: Expression of CD70 in nasal natural killer/T cell lymphoma cell lines and patients; its role for cell proliferation through binding to soluble CD27. Br J Haematol. 2013 160(3):331-42. 2012. 査読有

(4) 岸部 幹：鼻副鼻腔疾患におけるウイルス感染の位置づけ 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫の発症・増殖における EB ウイルスの関与、日本鼻科学会誌 50 (1)、87-90、2011

[学会発表] (計 7 件)

(1) 岸部 幹、駒林 優樹、熊井 琢美、高原 幹、林 達哉、原 洸 保明：鼻性 NK/T 細胞リンパ腫における EB ウイルス microRNA の発現と機能解析、第 31 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2013. 2. 7-9。倉敷市。

(2) Kishibe K, Komabayashi Y, Nagato T, Takahara M, Harabuchi Y. Expression of MicroRNAs in Nasal Natural Killer/T-Cell Lymphoma Cell Lines. EBV 2012, 2012. Aug. 1-4 Philadelphia, USA.

(3) 岸部 幹、駒林 優樹、長門 利純、高原 幹、林 達哉、原 洸 保明：鼻性 NK/T 細胞リンパ腫における EB ウイルス microRNA の発現と機能解析、第 30 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2012. 2. 16-18。大津市。

(4) Kishibe K, Komabayashi Y, Yoshino K, Nagato T, Takahara M, Katayama K, Hayashi T, Harabuchi Y. Expression of MicroRNAs in Nasal Natural Killer/T-Cell Lymphoma Cell Lines, 15<sup>th</sup> International Congress of Virology, 2011. Sept. 11-16, Sapporo.

(5) Kishibe K, Komabayashi Y, Yoshino K, Nagato T, Takahara M, Katayama K, Hayashi T, Harabuchi Y. Expression of MicroRNAs

in Nasal Natural Killer/T-Cell Lymphoma Cell Lines. 30th IRS-ISIAN 2011, 2011. Sept.20-23, Tokyo.

(6) Kishibe K, Komabayashi Y, Yoshino K, Nagato T, Takahara M, Katayama K, Harabuchi Y. Expression of MicroRNAs in Nasal Natural Killer/T-Cell Lymphoma Cell Lines. 第70回日本癌学会総会。2012.10.3-5, 名古屋。

(7) 岸部 幹, 吉野 和美, 長門 利純、高原 幹, 片山 昭公、林 達哉, 原 保明: 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫における EB ウィルス microRNA の発現と機能解析、第29回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2011.2.10-12。大分市。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岸部 幹 (KISHIBE KAN)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号: 80447071