

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860411

研究課題名(和文)成人T細胞白血病におけるEZH2制御性miRNAの発現解析と臨床応用

研究課題名(英文)Expression analysis of miRNAs regulated by EZH2 in adult T-cell leukemia

研究代表者

佐々木 大介(SASAKI, Daisuke)

長崎大学・病院(医学系)・技術職員

研究者番号：90624784

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)：EZH2阻害剤DZNepはATL細胞株において低下していたmiRNAであるmiR-181aなどの発現を回復させ、Caspaseの活性化、Annexin陽性細胞の増加などアポトーシスと思われる現象を引き起こした。miR-181aは抗アポトーシス分子であるBCL2 mRNAと結合する可能性が示されており、DZNepによりBCL2のmRNAおよびタンパク発現を抑制することが示された。DZNepによるATL細胞株の細胞増殖抑制はmiR-181aを介したBCL2発現制御により引き起こされていると考えられ、EZH2およびmiRNA発現制御はATLに対する治療標的となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：MiR-181a was re-expressed in ATL cells by EZH2 inhibitor DZNep, which activated caspase3/7 and induced apoptosis in ATL cells. MiR-181a has been shown to be regulated by EZH2, while miR-181a is a candidate negative regulator of BCL2 expression. We confirmed that BCL2 mRNA and protein expressions were clearly suppressed in the ATL cell lines by DZNep. DZNep inhibits cell growth that is caused by BCL2 repression via miR-181a. These results strongly support the notion that miR-181a is suppressed by EZH2 and that BCL2 expression is regulated by miR-181a in ATL cells. Together, our findings indicate a unique apoptotic pathway of BCL2 suppression via miR181a and that the EZH2 inhibitor DZNep may become a novel therapeutic agent for ATL.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：ATL EZH2 miRNA

1. 研究開始当初の背景

クロマチン修飾などの塩基配列の変化を伴わずに遺伝子発現を変化させるエピジェネティックな制御機構において重要な分子である EZH2 は Polycomb repressive complex (PRC) を構成するヒストンメチルトランスフェラーゼ(HMT) 活性を有したタンパクであり、ヒストン 3 リジン 27(H3K27) のメチル化を促進し、その領域に存在する遺伝子の発現を抑制することが知られている。この EZH2 は様々な腫瘍で発現異常が起きていることが知られており、成人 T 細胞白血病(ATL) 患者細胞では EZH2 が過剰に発現することで H3K27 が正常細胞と比べ高度にトリメチル化されており何らかの遺伝子発現の抑制を引き起こしている。また ATL 患者の網羅的遺伝子発現解析より EZH2 発現量が患者予後に関わるということが報告されている。さらに EZH2 は遺伝子発現抑制機能を有する小分子 RNA である miRNA の発現異常に関与しており、ATL では NF- κ B 経路の異常活性化および腫瘍細胞の不死化に寄与していることが報告されている。miRNA は 21-25 塩基長の 1 本鎖 RNA であり真核生物では遺伝子の転写後発現調節に関与していることが知られており、ヒトゲノムでは 1000 以上の miRNA がコードされると言われており、miRNA はその標的 mRNA に対して不完全な相同性を介して結合し、標的遺伝子の不安定化や翻訳抑制を行うことでタンパク抑制するとされている。この miRNA の発現異常は様々な癌・腫瘍で認められ、ATL 細胞においても miRNA 発現が全体的に健常者と比べ低下しており、一部の miRNA の発現異常には EZH2 が関与していることが考えられる。しかし EZH2 を介した miRNA 制御機構は ATL においても一部しかわかっていない。

2. 研究の目的

EZH2 による miRNA 発現制御に関する報告は少なく様々な癌腫で異なることも考えられる。そこで ATL 細胞における EZH2 が関与する新たな miRNA 発現制御機構を探索し、miRNA 発現異常が ATL 細胞の細胞死や細胞増殖へどのように関わっているか調べる。

3. 研究の方法

ATL クローン由来細胞株を用い ATL における EZH2 が発現に関与する miRNA の同定および細胞増殖への関わりなどを調べるため以下の検討を行った。

1. マイクロアレイなどを用いた EZH2 が発現制御に関与する新規 miRNA の探索。
2. ATL における EZH2 制御性 miRNA の標的遺伝子同定と細胞増殖への関与について。
3. EZH2 阻害作用のある小分子化合物により抑制された miRNA の発現が回復するか。
4. EZH2 阻害剤による細胞増殖抑制効果の評

価および細胞死機序の解析。

4. 研究成果

ATL 細胞株に EZH2 阻害剤である DZNep を作用させ PCR array にて発現変動をきたす腫瘍抑制性 miRNA のスクリーニングを行った結果、miR-181a の発現回復が認められ、バリデーションのために行った qPCR でも同様の現象が確認された(Fig.1)。健常者および ATL 患者

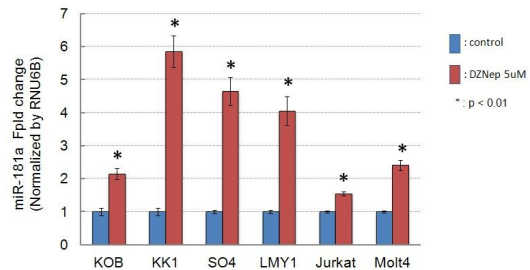


Figure.1

における miRNA 発現の網羅的解析では miR-181a の有意な発現抑制が ATL 患者細胞において確認され、qPCR でも同様の結果であった(Fig.2A, B)。上記より ATL 症例において腫瘍抑制性の miRNA とされる miR-181a の発現が抑制されており、発現抑制は EZH2 過剰発現により引き起こされていること、EZH2 を阻害することで発現を回復できることがわかった。また DZNep は ATL 細胞株に Caspase の活性化を引き起こし、Annexin-PI 染色では

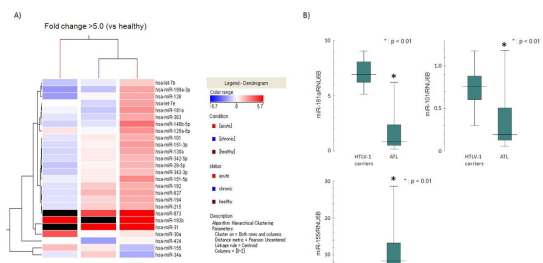


Figure.2

Annexin 陽性細胞の増加などアポトーシスによる細胞増殖抑制を示した(Fig.3A, B, C, D)。

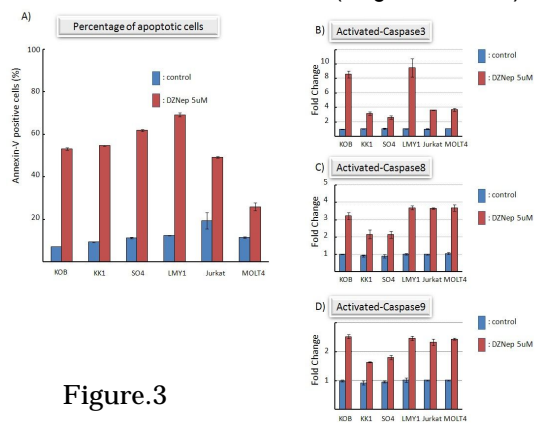


Figure.3

次に DZNep により発現が変動する mRNA を見出すためマイクロアレイによる網羅的探索を行った。様々な遺伝子発現の変動が認められたが、apoptosis に関連するよび遺伝子

では抗アポトーシス分子である BCL2 の顕著な発現抑制が確認された(Fig.4A,B,C)。ウエスタンブロットによるタンパク発現の確認も行い、EZH2 の抑制および BCL2 タンパクの抑制が確認された(Fig.4D)。しかし EZH2 が BCL2 発現に直接かかわるとの報告はなく、また網羅的解析では他の BCL2 制御に係るような分子の変動は見いだせなかった。以上より DZNep による BCL2 抑制は EZH2 が発現を制御している miRNA が関与している可能性を考えた。

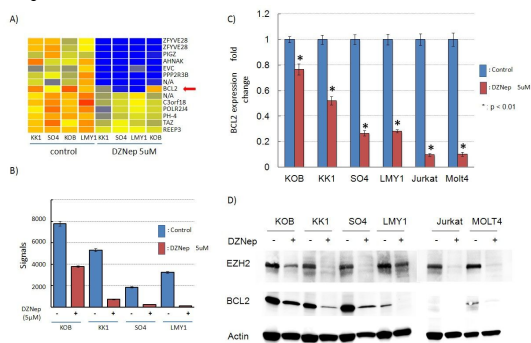


Figure.4

BCL2 mRNA 3' UTR 領域の配列解析を Targetscan などのウェブデータベースにて行った。miR-181a は BCL2 mRNA の 3' UTR に 2 箇所結合部位があることが予測された。また他に幾つかの BCL2 を標的とした miRNA の変動も認められたが miR-181a ほどの動きではなかった。また miR-181a の直接的な影響を見るため模倣分子を ATL 細胞株へトランスフェクションすると細胞増殖の抑制が確認された。

以上のことより DZNep による ATL 細胞株の細胞増殖抑制は miR-181a の BCL2 発現制御により引き起こされていることが強く示唆され、EZH2 を標的とした治療は ATL に対する新規治療薬としての可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Itonaga H, Imanishi D, Wong YF, Sato S, Ando K, Sawayama Y, Sasaki D, Tsuruda K, Hasegawa H, Imaizumi Y, Taguchi J, Tsushima H, Yoshida S, Fukushima T, Hata T, Moriuchi Y, Yanagihara K, Miyazaki Y. Expression of myeloperoxidase in acute myeloid leukemia blasts mirrors the distinct DNA methylation pattern involving the downregulation of DNA methyltransferase DNMT3B. *Leukemia*. 2014 Jul;28(7):1459-66. 査読有り

Itonaga H, Tsushima H, Imanishi D, Hata T, Doi Y, Mori S, Sasaki D, Hasegawa H, Matsuo E, Nakashima J, Kato T, Horai M, Taguchi M, Matsuo M, Taniguchi H, Makiyama J, Sato S, Horio K, Ando K, Moriwaki Y, Sawayama Y, Ogawa D, Yamasaki R, Takasaki

Y, Imaizumi Y, Taguchi J, Kawaguchi Y, Yoshida S, Joh T, Moriuchi Y, Nonaka H, Soda H, Fukushima T, Nagai K, Kamihira S, Tomonaga M, Yanagihara K, Miyazaki Y. Molecular analysis of the BCR-ABL1 kinase domain in chronic-phase chronic myelogenous leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors in practice: study by the Nagasaki CML Study Group. *Leuk Res*. 2014 Jan;38(1):76-83. 査読有り

Taguchi M, Imaizumi Y, Taguchi J, Imanishi D, Sasaki D, Hasegawa H, Tsushima H, Hata T, Miyazaki Y. Transient proliferation of donor-derived ATL cell-like lymphocytes early after allogeneic stem cell transplantation in an adult T-cell leukemia/lymphoma patient. *Blood*. 2013 May 23;121(21):4428-30. 査読有り

〔学会発表〕(計 4 件)

佐々木大介、長谷川寛雄、津島裕子、森沙耶香、西村典孝、松本成良、上野有郁、小佐井康介、宇野直輝、森永芳智、上平憲、宮崎泰司、柳原克紀、20 年間臨床検査として実施してきた HTLV-1 サザンブロット法の実態と病態解析、第 60 回日本臨床検査医学会学術集会 2014 年 11 月 24 日 福岡国際会議場 福岡)

Daisuke Sasaki, Hiroo Hasegawa, Hiroaki Taniguchi, Yoshitaka Imaizumi, Naoki Uno, Yoshitomo Morinaga, Yasushi Miyazaki, Katsunori Yanagihara, EZH2 Inhibitor DZNep Induces Apoptosis In Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma Cells By BCL2 Suppression Via Regulation Of Mir-181a, 55th ASH Annual Meeting and Exposition, December 9, 2013 New Orleans(USA)

佐々木大介、長谷川寛雄、今泉芳孝、桐生麻友、谷口広明、宇野直輝、森永芳智、宮崎泰司、柳原克紀、造血器腫瘍における腫瘍マーカーとしての肝細胞増殖因子 HGF、第 59 回日本臨床検査医学会学術集会 2013 年 11 月 2 日 神戸国際会議場(神戸)

Daisuke Sasaki, Hiroo Hasegawa, Yoshitaka Imaizumi, Yasushi Miyazaki, Shimeru Kamihira, EZH2 inhibitor DZNep suppress BCL2 expression and induce apoptosis in ATL cells. 第 72 回日本癌学会学術集会 2013 年 10 月 5 日 パシフィコ横浜(横浜)

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）
なし

取得状況（計0件）
なし

〔その他〕
特記事項無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 大介 (SASAKI, Daisuke)
長崎大学・病院（医学系）・技術職員
研究者番号：90624784