

博士論文

T細胞リンパ腫におけるマイクロRNAによる
がんとがん微小環境の制御

松山 弘典

目次

1. 要旨.....	4
2. 序論.....	5
2-1 悪性腫瘍（がん）とがん微小環境	
2-2 マイクロ RNA	
2-3 がんとマイクロ RNA	
2-4 未分化リンパ腫キナーゼによる発がん機構	
2-5 ALK 陽性未分化大細胞リンパ腫とマイクロ RNA	
3. 方法.....	21
3-1 細胞培養・試薬	
3-2 患者検体	
3-3 TuD miRNA システム, shRNA, およびプラスミド	
3-4 ルシフェラーゼレポーターアッセイ	
3-5 定量リアルタイム PCR アッセイ	
3-6 クロマチン免疫沈降アッセイ	
3-7 レンチウイルスを用いた遺伝子導入	
3-8 ウェスタンブロットティング	
3-9 薬剤感受性試験	

3-10 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)	
3-11 動物実験モデル	
3-12 免疫組織染色	
3-13 遺伝子発現データベースの解析	
3-14 統計解析	
4. 結果.....	38
4-1 ALCL における miR-135b の発現上昇	
4-2 STAT3 活性化を介した NPM-ALK による LEMD1/miR-135b の発現誘導	
4-3 miR-135b による FOXO1 の発現抑制および薬剤感受性の制御	
4-4 miR-135b による Th2 調節因子 STAT6 および GATA3 の制御	
4-5 ALCL 細胞における miR-135b による IL-17 の産生調節	
4-6 miR-135b による ALCL の傍分泌型炎症反応と造腫瘍性の調節	
5. 考察.....	66
5-1 T 細胞リンパ腫におけるマイクロ RNA によるがんの制御	
5-2 T 細胞リンパ腫におけるマイクロ RNA によるがん微小環境の制御	
5-3 miRNA によるがん微小環境の調節	
5-4 miRNA を標的としたがん治療の可能性	

6. 結語.....	81
7. 謝辞.....	82
8. 文献.....	83

1. 要旨

本研究では、microRNA-135b が、anaplastic lymphoma kinase (ALK) 陽性未分化大細胞型リンパ腫 (ALCL) において、nucleophosmin (NPM) 遺伝子と ALK 遺伝子の相互転座によって生じる NPM-ALK キメラタンパク質により発現が誘導されること、およびインターロイキン 17 の産生によって特徴付けられる ALCL の免疫学的表現型を制御することを解明した。この結果より、ドライバーがん遺伝子により誘導されるマイクロ RNA ががん細胞の免疫学的表現型とがん微小環境の制御を介してがんの病態に関与している可能性が示唆された。

2. 序論

2-1 悪性腫瘍（がん）とがん微小環境

われわれ人間の身体は約37兆個の細胞より構成されていると考えられている(1)。

この37兆個の細胞は、様々な制御機構により分裂・増殖・細胞死を繰り返しその恒常性を維持している。一方で、遺伝的要因と、加齢、生活習慣、ウイルス感染、または放射線などの環境要因の影響により、制御機構を司る遺伝子群に複数の変異・異常が積み重なることで、正常細胞から悪性腫瘍(がん細胞)が生じると考えられている。

ただし、残念ながら現在においてもがんの発生機構は完全には解明されていない。また、がんの形成と同様ながんの維持・進展・転移などのメカニズムも未解明な部分が多い。一方、Weinbergらにより、がんが獲得する10の特性として、増殖抑制からの回避、免疫応答からの逃避、無制限な複製による不死化、がん細胞による炎症の促進、浸潤と転移の活性化、血管新生の誘導、ゲノム不安定化と変異、細胞死(アポトーシス)に対する抵抗性獲得、細胞内エネルギー代謝異常、および増殖シグナルの維持が提案されている(2)。近年のがん研究の進展により、がん細胞が持つ内因性の特性のみならず、外因的な要素、すわなちがんを取りまく間質ながんの発生・進展において重要であることが明らかにされている(3-8)。間質には線維芽細胞をはじめとして、炎症細胞、免疫担当細胞、骨髄由来間質細胞、内皮細胞、周皮細胞、血管、リンパ管

に加えて結合組織が存在しており、これらががん細胞を中心として細胞外マトリックスタンパク質、プロテアーゼ、およびサイトカインなどの分泌因子による情報ネットワークおよび低酸素やグルコース飢餓状態などのストレス環境を構築し、がん特異的な周辺環境、すなわちがん微小環境を形成している (3-8) (図 1)。

がん微小環境の主な機能として、炎症応答の制御、細胞外マトリックス構成成分の相互作用の制御、細胞集団の移動制御、死細胞と細胞由来の細胞デブリの除去、栄養素や酸素の運搬、代謝産物と二酸化炭素の回収、血中循環エストロゲンの産生、免疫細胞の誘導・制御、免疫細胞の監視からの逃避、血管新生の補助、および薬剤耐性機構の構築などが挙げられる (6)。間質は、がん抑制とがん促進という二面的な機能を有するが、主にはがんの進展を促進する機能を発揮していると考えられている。その具体例として、間質を構成する免疫担当細胞の一つであるマクロファージと線維芽細胞の働きについて記載する。マクロファージは一般的には免疫による生体防御機構において重要なエフェクター細胞として知られているが、マクロファージの中でも腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated macrophage, TAM) は多くの研究からがんの進展をサポートしていることが明らかとなっている (9)。実際に、乳がんとグリオーマにおいて TAM はがん細胞と協調的に働き、がん細胞からの colony stimulating factor 1 (CSF-1, 別名 macrophage-colony stimulating factor, M-CSF) 産生とマクロファージ

からの epidermal growth factor (EGF) 産生に基づく二重傍分泌ループを形成することにより、がん細胞の浸潤を促進することが知られている (10-12)。

線維芽細胞は細胞外マトリックスや基底膜構成成分の蓄積、内皮細胞の分化の制御、免疫反応の調節など非常に多岐にわたる機能を有し、組織の恒常性に寄与している (13)。がん関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblast, CAF) は正常線維芽細胞とは区別されており、がん微小環境においては非常に多く存在しているが、腫瘍進展の間にどのように生じてくるかについては未解明な面がある (14)。この CAF の活性化にはがん細胞が産生する transforming growth factor- β (TGF- β), monocyte chemotactic protein 1 (MCP1), platelet-derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor (FGF), および様々なプロテアーゼが関与している (13, 14)。活性化された CAF は、vascular endothelial growth factor (VEGF) を含む血管新生関連因子の分泌および nuclear factor-kappa B (NF κ B) シグナルを活性させる IL-1 β の産生を介した炎症の誘導などを引き起こし、がんにとって増殖および浸潤などに有利な環境を作り出し、がんの進展に寄与している (15, 16)。このように、がん微小環境の重要性が基礎研究の観点から明らかとなるだけでなく、がん微小環境を標的とした VEGF 抗体などの血管新生阻害剤、programmed death-1 (PD-1) 抗体と cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) 抗体といった免疫チェックポイント阻害剤が実際の臨床の場においても利用され、がん治療に大きく貢献している (17, 18)。今後さらに、このがん微小環境を構成する間質細胞

を標的としたがん治療薬の開発が進むことで、難治性と考えられているがんの治療成績の向上につながることを期待されている。

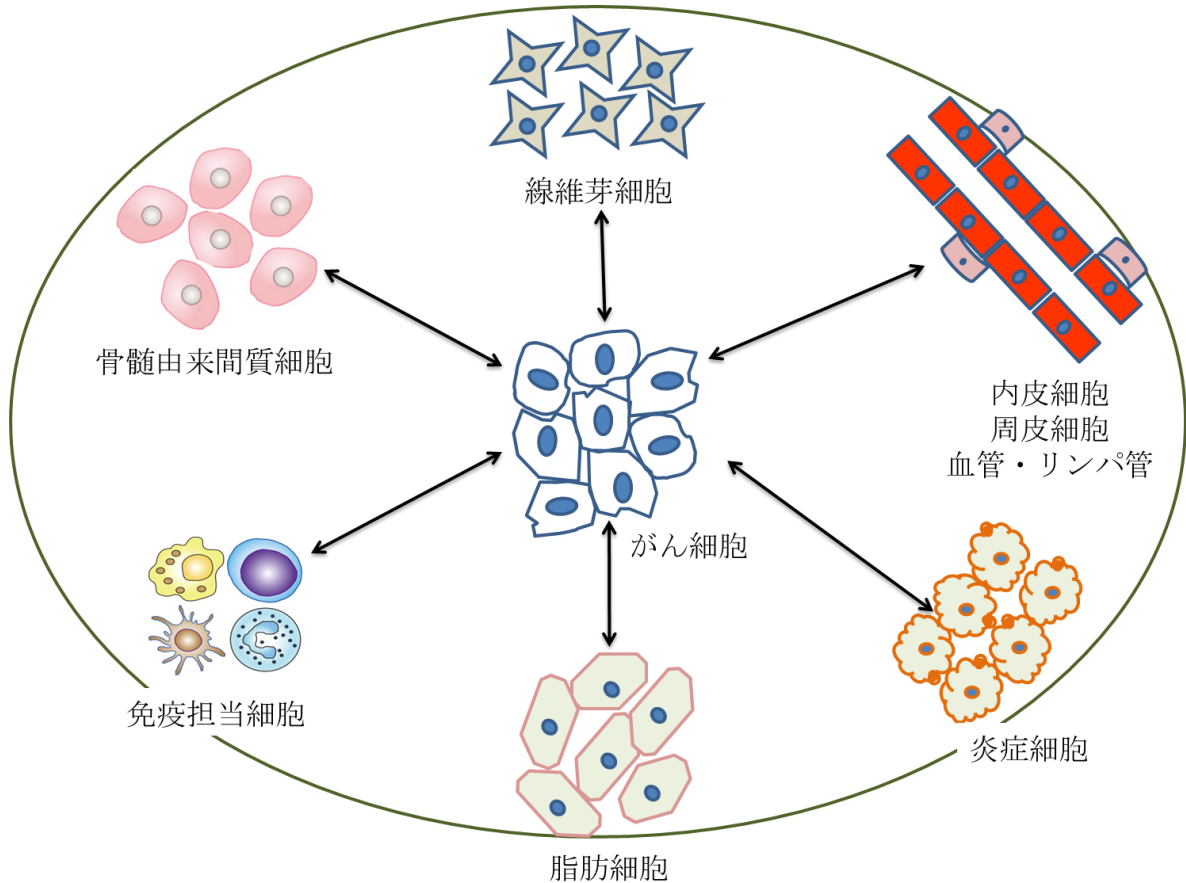


図 1. がん微小環境の概略図

がん細胞と間質（線維芽細胞，炎症細胞，免疫担当細胞，骨髄由来間質細胞，脂肪細胞，内皮細胞，周皮細胞，血管，およびリンパ管などを含む）が，それぞれ分泌因子（細胞外マトリックスタンパク質，プロテアーゼ，およびサイトカインなど）を産生し，がん細胞を中心とした情報ネットワーク，すなわちがん微小環境を形成している。

2-2 マイクロ RNA

マイクロ RNA (microRNA, miRNA) はその存在が最初に発見された線虫をはじめ，多様な種で存在が確認されている配列特異的に標的遺伝子の発現を抑制する働きを

持つ 21 ~ 24 塩基程度のタンパク質をコードしない一本鎖 RNA である (19, 20)。図 2 に miRNA の標準的な産生過程を示す (21-26)。まず miRNA は主に核内で miRNA 遺伝子より転写され長い一次転写産物 (primary miRNA [pri-miRNA]) として合成される。次に、核内で RNase III である Drosha により pri-miRNA が切断され、precursor miRNA (pre-miRNA) が産生される (24, 25)。産生 pre-miRNA は主に exportin-5 により核内より細胞質に輸送される。細胞質において、pre-miRNA は別の RNase III である Dicer による切断を受けて、21 ~ 24 塩基長の二本鎖 miRNA (miRNA duplex) となる。この二本鎖 miRNA は Ago タンパク質に取り込まれた後に片側の RNA 鎖だけが Ago タンパク質と安定な複合体を形成することで、RNA 誘導型サイレンシング複合体 (RNA-induced silencing complex: RISC) が形成される (27)。この産生された一本鎖成熟型 (mature) miRNA が、主に標的 mRNA の 3'非翻訳領域 (3' untranslated region, 3' UTR) の部分的に相補的な配列に結合することで、一般的には標的 mRNA の分解、不安定化とタンパク質への翻訳の抑制を誘導する。標的 RNA との相補的な結合は seed 配列と呼ばれる miRNA の 5'側の 6~7 塩基によりなされるが、seed 配列は非常に短いため、1 つの miRNA が標的とする mRNA は多数存在することが知られており、哺乳類において、タンパク質をコードする全遺伝子の 30 ~ 90% が miRNA の標的であると考えられている (28-30)。

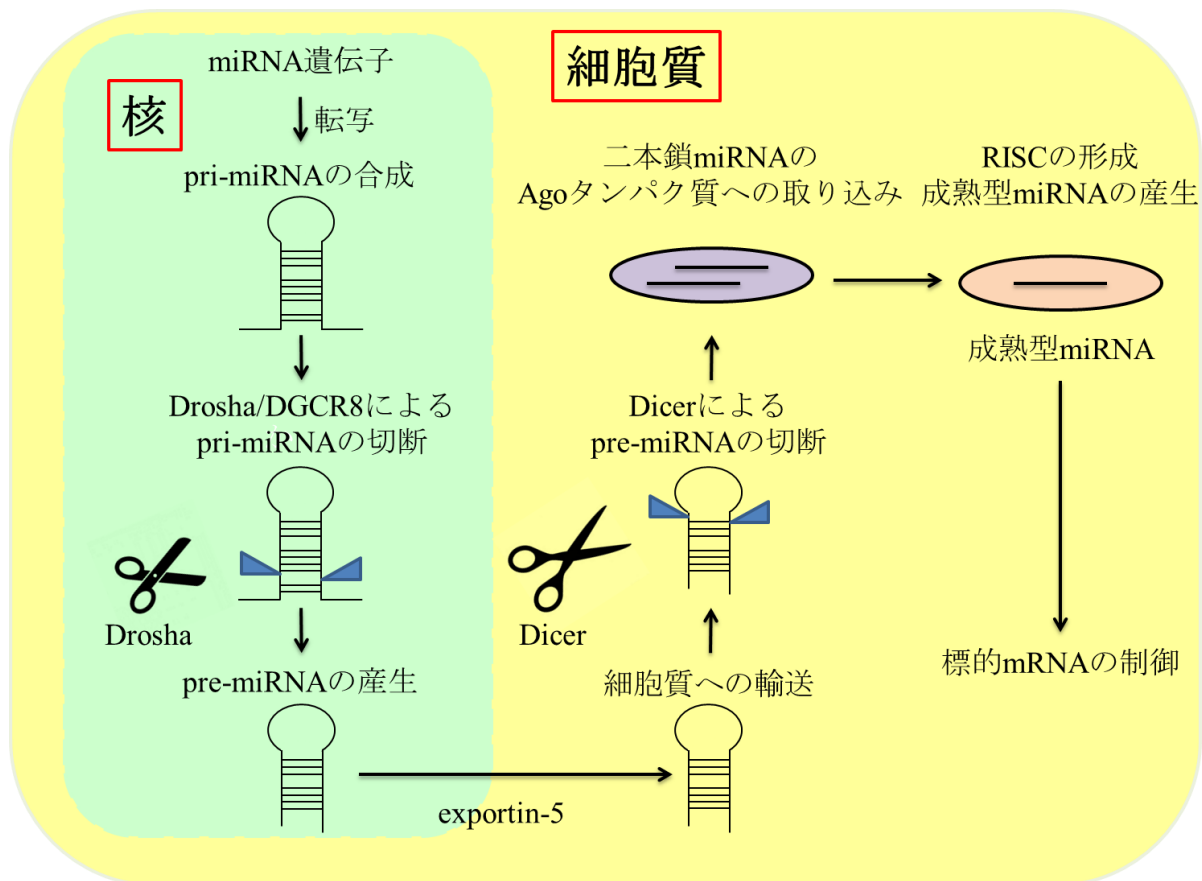


図2. マイクロRNAの標準的な生合成経路の概略図

標準的な miRNA の生合成過程として、まず核内における転写による pri-miRNA の合成、Drosha/DGCR8 による pri-miRNA の切断、および pre-miRNA 産生が生じる。次に、exportin-5 による pre-miRNA の細胞質への輸送、細胞質における Dicer による pre-miRNA の切断、二本鎖 miRNA の Ago タンパク質への取り込み、RISC の形成および成熟型 miRNA の産生、の各ステップが遂行される。

2-3 マイクロRNA とがん

がんでは様々な遺伝子の異常が報告されているが、その中で miRNA 遺伝子の異常も多くみられることが知られている。実際、悪性腫瘍においてがん促進的に働く miRNA の発現上昇が認められ、一方でがん抑制的に働く miRNA の発現が減少していることが知られている。これは転写レベルでの調節、染色体異常、miRNA 生合成系の

異常などに起因すると考えられている (31)。がん促進性の miRNA の発現上昇の初期の重要な発見として、He らはびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫、濾胞性リンパ腫、およびマントル細胞リンパ腫などの B 細胞リンパ腫で増幅がみられる 13q31 領域に含まれる miR-17-92 クラスターの発現上昇、およびこの発現上昇が腫瘍促進に寄与していることを報告した (32)。一方、がん抑制性の miRNA の発現減少の初期の発見としては、2002 年の Calin らのグループによる慢性リンパ性白血病 (CLL) での miR-15a/miR-16-1 の欠損の発見が挙げられる (33)。Calin らは、CLL では 13q14 領域の欠失が高頻度で認められるが、この欠損部位にはノンコーディング RNA である DLEU2, miR-15a, miR-16-1 がコードされていること、すなわち CLL では miR-15a/miR-16-1 の発現が低下し、その標的タンパク質である BCL2 の発現上昇が誘導されることで CLL 細胞のアポトーシスに対する抵抗性が高まることを明らかにした。

上記のようながんにおける miRNA 遺伝子の増幅・欠損以外の miRNA の発現異常のメカニズムとして、がん遺伝子・がん抑制遺伝子による制御が報告されている (24)。Myc を含むがん遺伝子および p53 などのがん抑制遺伝子が miRNA の発現制御に関連していることが明らかとなっているが (32, 34)、発がん性チロシンキナーゼによる miRNA の発現制御には未解明な部分が多い。

一般的に、がん遺伝子によるがん形成・進展亢進作用とがん抑制遺伝子による抑制作用のバランスがとれている場合は、がんの形成が生じることはないと考えられるが、

がん抑制遺伝子の変異の蓄積や欠損などにより拮抗状態・バランスの瓦解が起こるとがんが発生すると考えられる。この瓦解メカニズムに miRNA がどのように関与しているかが近年明らかとなってきている (35)。2011 年に Weinberg らによって提唱されたがんの hallmark (2) に対する miRNA の関与として、がんにおける細胞死 (アポトーシス) への抵抗性獲得を一例に挙げる。抗アポトーシス因子である BCL2 は先述した miR-15a/miR-16-1 およびがん抑制遺伝子である p53 により誘導される miR-34a の標的である (36)。miR-15a/miR-16-1 は遺伝子がコードされている領域の欠損により、また miR-34a は p53 の変異または欠損によって、それらの発現量がん細胞において低下する。すなわち、がん抑制遺伝子の変異または欠損によるがん抑制性の miRNA の発現低下はがん細胞においてがん促進的に働く BCL2 の発現上昇に寄与し、がん細胞の細胞死への抵抗性獲得の一端を担っていると考えられる (図 3)。

また、代表的ながん遺伝子の一つである Kras は miR-200c の発現を調節していることが報告されている (37)。この miR-200c は ZEB1 や ZEB2 を標的としている。ZEB1/ZEB2 は E-cadherin の転写抑制因子であり、かつ上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) によるがんの転移を促進するがん遺伝子としての機能を持っていることが報告されている (38)。すなわち、がん遺伝子によるがん抑制性の miRNA の抑制により、この miRNA により抑制されていたがん遺伝子の発現が上昇し、がんの形成・維持・進展が亢進することが考えられる (図 3)。さらに、他のがん

の hallmark に関係する主な miRNA の例としては、増殖シグナルの維持：miR-21, let-7 family, 増殖抑制からの回避：miR-17-92 cluster, 無制限な複製による不死化：miR-34a, miR-372/373 cluster, 血管新生の誘導：miR-210, 免疫による攻撃からの逃避：miR-155, エネルギー代謝の異常：miR-210, および腫瘍が促進する炎症：miR-146, miR-155 などが挙げられる (35) (図 4)。以上のように、miRNA はがんの hallmark に深く関与していることが明らかとなっており、がんのみならずその微小環境に対する影響を明らかとすることががんにおける miRNA の役割をより深く理解しがんを制御する点で重要だと考えられる。

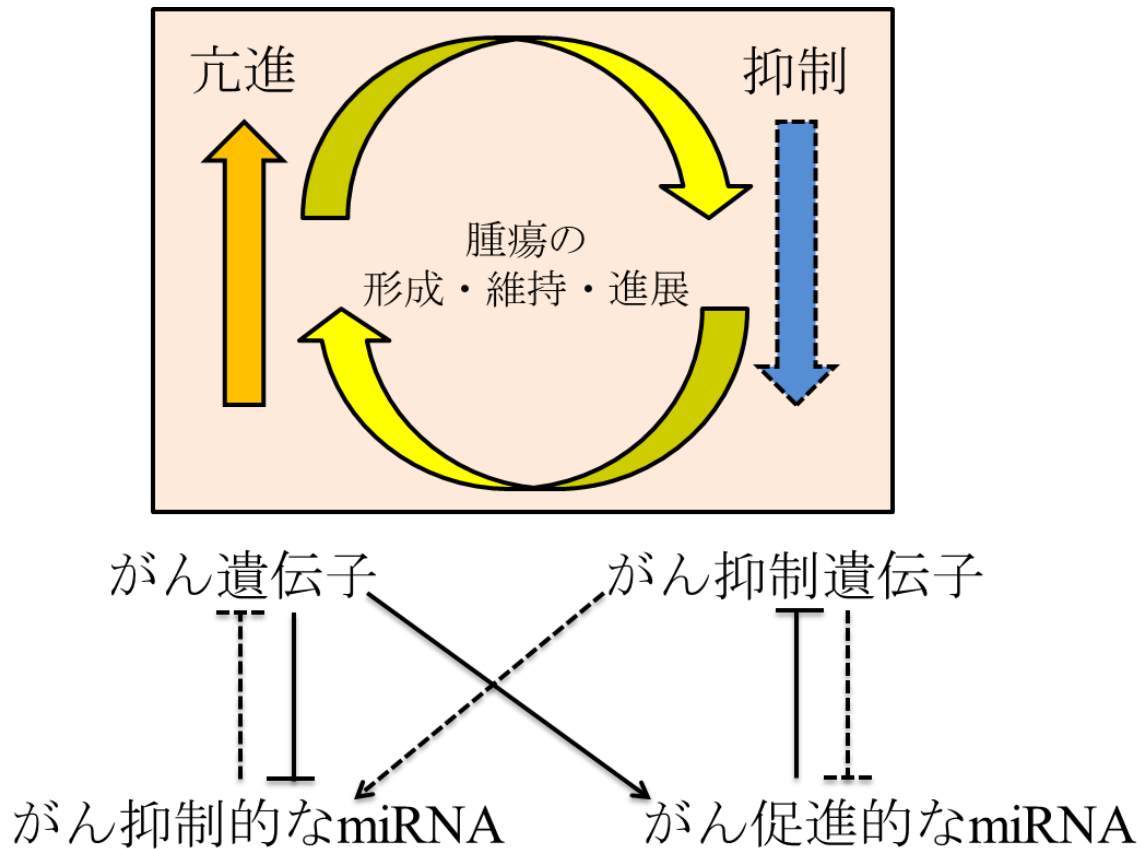


図3. 腫瘍の形成・維持・進展における miRNA の関与の模式図

腫瘍の形成・維持・進展はがん遺伝子により亢進される一方で，がん抑制遺伝子により抑制される。がん遺伝子の発現上昇・活性化もしくはがん抑制遺伝子の変異・欠損が生じると，がん促進性の miRNA の発現亢進，がん抑制遺伝子の低下，およびがん抑制性の miRNA の発現減少が起こり，腫瘍の形成・維持・進展が亢進すると考えられる。

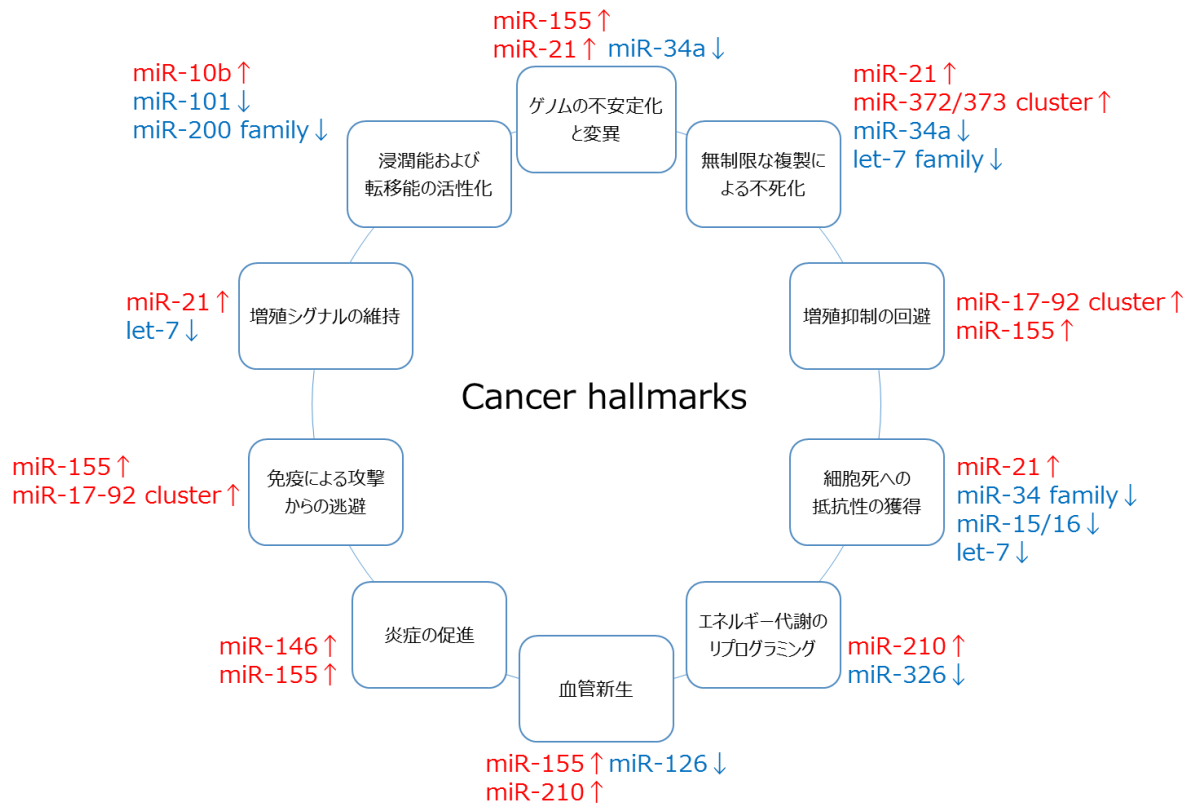


図 4. Cancer hallmark と関係する主な miRNA の関係図

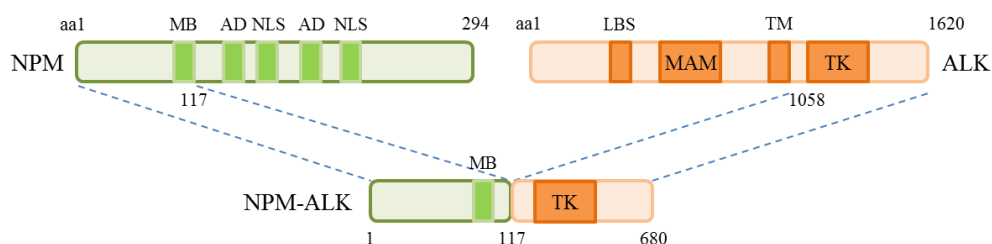
2011 年に Weinberg らによって提唱されたがんの 10 の hallmark であるゲノムの不安定化と変異、無制限な複製による不死化、増殖抑制の回避、細胞死への抵抗性の獲得、エネルギー代謝のリプログラミング、血管新生、炎症の促進、免疫による攻撃からの逃避、増殖シグナルの維持、浸潤能および転移能の活性化、それぞれに関与していると考えられている miRNA を示す。赤字で示したものはがん促進的に働く miRNA、青字で示したものはがん抑制的に働く miRNA であり、上下の矢印はがんでの典型的な発現量の変化（上昇または低下）を表す（文献 2 より改変）。

2-4 未分化リンパ腫キナーゼによる発がん機構

未分化リンパ腫キナーゼ（anaplastic lymphoma kinase: ALK）は造血器腫瘍および固形がんにおいて、様々な種類の遺伝子との融合、変異、コピー数増加、増幅などの機序によって発がん活性を発揮することが知られている（39-42）。

ALK は 2 番染色体上に位置しており，およそ 200 – 220 kDa の ALK チロシンキナーゼレセプター（別名 CD246 [cluster of differentiation 246]）をコードしている。ALK mRNA とタンパク質レベルは誕生後に急激に低下し，ほとんどの組織において非常に低いレベルに維持されているが，脳では高いレベルを示していることから，脳の発達に重要な働きをしていると考えられている（43）。この ALK が発がん活性を発揮する融合遺伝子を形成するためのパートナー遺伝子については多くの報告がある（41, 42）（図 5）。一般的には，パートナー遺伝子の N 末端と ALK の C 末端が融合することで融合遺伝子を形成しており，がん化に必須なチロシンキナーゼ活性は ALK に由来している。さらに，がんではこのチロシンキナーゼ活性の恒常的な活性化を維持するために，例えば echinoderm microtubule-associated protein-like 4（EML4）-ALK 融合遺伝子においては EML4 内の N 末端に存在する塩基性領域を介して融合遺伝子の産物が二量体化し，ALK のチロシンキナーゼ活性が恒常的に活性化されていることが報告されている（39）。この ALK との融合パートナー遺伝子の一つに Nucleophosmin（NPM）が存在し，第 2 染色体上の ALK と第 5 染色体上の NPM が転座し，融合することで生じる NPM-ALK は ALCL における代表的な発がん性チロシンキナーゼである。NPM-ALK は ALK 陽性未分化大細胞リンパ腫（anaplastic large cell lymphoma: ALCL）において signal transducer and activator of transcription（STAT）3，Ras - Extracellular Signal-regulated Kinase（Erk），および Phosphoinositide 3-kinase（PI3K）といったシグナル経

路を介して，細胞のがん化を制御している（40，41）（図6）。ALK 陽性 ALCL において細胞のがん化を制御している NPM-ALK が直接発現を制御しているとされる miRNA の存在についての報告はない。そこで，ALCL において NPM-ALK により制御を受ける miRNA の存在に着目した。



Fusion	Chromosomal aberration	Tumor types
NPM-ALK	t(2;5)(p23;q35)	ALCL, NHL
ATIC-ALK	inv(2)(p23;q35)	ALCL
CLTC-ALK	t(2;17)(p23;q23)	ALCL, IMT, BCL
TFG-ALK	t(2;3)(p23;q21)	ALCL
TPM3-ALK	t(1;2)(p25;q23)	ALCL, IMT
TPM4-ALK	t(2;19)(p23;p13.1)	ALCL, IMT
CAD-ALK	inv(2)(p23;p22)	CRC
EML4-ALK	inv(2)(p21;p23)	NSCLC
FN1-ALK	t(2)(p23;p34)	Ovarian, IMT
STRN-ALK	t(2)(p23;p22.2)	Thyroid

図5. NPM-ALK 融合タンパク質の模式図と ALK の主な融合パートナー遺伝子

NPM-ALK 融合遺伝子の模式図（上），ALK の主な融合パートナー遺伝子，染色体異常，および融合タンパク質が発現しているがん種（下）を示す。

AD: acidic amino-acid domain , ATIC: 5-aminoimidazole-4-carboxamideribonucleotide formyl transferase/IMP cyclohydrolase, CAD: dihydroorotase, CLTC: clathrin heavy chain, EML4: echinoderm microtubule-associated protein-like 4, FN1: fibronectin 1, LBS: ligand binding site, IMT: inflammatory myofibroblastic tumor, MAM: Meprin/A5 protein tyrosine phosphatase Mu, MB: metal binding domain, NLS: nuclear localization signal, STRN: striatin, calmodulin binding protein, TFG: TRK-fused gene, TK: tyrosine kinase domain, TM: transmembrane domain, TPM: non-muscle tropomyosin

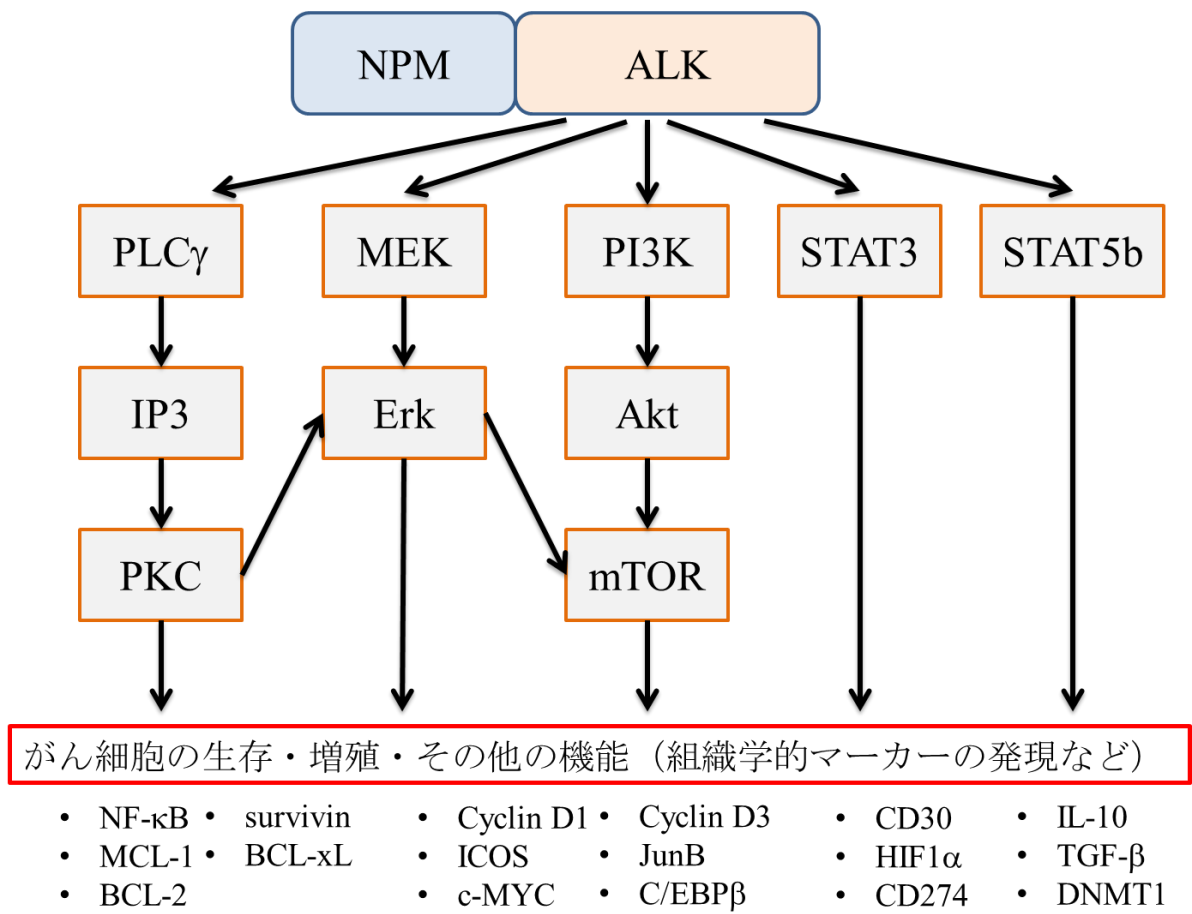


図 6. ALK 陽性 ALCL における NPM-ALK シグナル経路の概略図

ALK 陽性 ALCL において NPM-ALK は Erk, PI3K, PKC, STAT 経路を活性化することにより, がん細胞の生存・増殖を制御しているとともに, CD30 といった組織学的マーカーの発現なども制御している。

2-5 ALK 陽性未分化大細胞リンパ腫とマイクロ RNA

2008 年の WHO 分類第 4 版 (2008) および 2016 年の更新版において, Mature T and natural killer (NK) 細胞腫瘍として 20 種以上の多彩なサブタイプが報告されている (44, 45)。主なサブタイプとして, 末梢 T 細胞リンパ腫-非特定型 (Peripheral T-cell lymphoma [PTCL]-NOS), 血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫 (AITL), 節外性 NK/T 細

胞リンパ腫 (NKTCL), 成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (ATLL), ALK 陽性未分化大細胞リンパ腫 (ALCL, ALK positive), ALK 陰性未分化大細胞リンパ腫 (ALCL, ALK negative), および腸症型 T 細胞リンパ腫 (EATL) がある。

ALK 陽性 ALCL は T 細胞リンパ腫の一型で, 日本での年間罹患数は約 90 人/年と推計される稀な疾患であり, 臨床病理学的に CD30 陽性, CD15 陰性, EMA 陽性, BCL2 陰性の極めて均質な特徴を有しており, その診断には ALK タンパク質の発現の存在が必須である。前節で述べたように, キメラタンパク質 NPM-ALK は 1994 年に Morris らによって, 2 番染色体上に位置する ALK と 5 番染色体上の NPM 間での染色体転座 [t(2;5)] によって生じ, NPM と ALK の一部から形成されることが報告された (46)。現在, ALK 陽性 ALCL における ALK のパートナー分子は 9 種が報告されているが, NPM-ALK の頻度は 70%を超えている (47)。ALCL において NPM-ALK により活性化されるシグナル伝達経路として Ras-Erk, PI3K-Akt, および JAK-STAT 経路などが報告されており, これらの経路の活性化により主にかん細胞の生存増殖に有利な特徴, すなわち抗アポトーシス能の亢進および細胞周期の進行が惹起される (40, 41, 47)。さらに, NPM-ALK は DNA methyltransferase 1 (DNMT1) の発現を制御することで T 細胞受容体関連シグナル分子である CD3 ϵ , ZAP70, LAT, および SLP76 の発現を抑制すること (48), JunB を介して細胞傷害性分子である granzymeB と perforin の発現を制御すること (49), さらに Cdc42 の活性化により ALCL の特徴的な細胞形

態を誘導すること (50) などが報告されており, NPM-ALK は ALCL の生存増殖のみならずその表現型をも制御していることが明らかとなっている。

2010 年前後に ALK 陽性 ALCL で特徴的な発現パターンを示す miRNA が報告されている (51, 52)。Lawrie らは, 主な B 細胞リンパ腫および T 細胞リンパ腫の細胞株と正常リンパ球において特徴的な発現パターンを示す miRNA を報告している (51)。その中で, ALK 陽性 ALCL 細胞のみで発現が亢進している miRNA として miR-135b が報告されていた。そこで, 本研究では NPM-ALK による miR-135b などの miRNA の発現制御に注目し, さらに miRNA の ALK 陽性 ALCL の表現型に対する役割を解明することを目的に研究を行った。

3. 方法

3-1 細胞培養・試薬

ALCL 細胞株 (Karpas 299 細胞, SUDHL-1 細胞, および SUP-M2 細胞) は German Collection of Microorganisms and Cell Cultures より入手した。Jurkat 細胞, Molt4 細胞, CCRF-CEM 細胞, HCT116 細胞, HEK293T 細胞, HeLa 細胞, および肺癌細胞株は American Type Culture Collection より入手した。WI-38 ヒト二倍体線維芽細胞は理研細胞バンクより入手した。ヒト正常末梢血 pan T リンパ球は AllCells より入手した。神経芽細胞腫細胞株は堺 隆一教授 (北里大学医学部) より供与いただいた。細胞株の ALK status を表 1 に示す。造血器腫瘍, 神経芽細胞腫, および肺癌細胞株は RPMI 1640 培地 (Invitrogen) に 10% FBS および 100 units/mL ペニシリンと 100 µg/mL ストレプトマイシンを添加した培地を用いて培養した。他の細胞株はダルベッコ改変イーグル培地に 10% FBS および 100 units/mL ペニシリンと 100 µg/mL ストレプトマイシンを添加した培地を用いて培養した。共培養試験においては, Karpas 299 細胞と WI-38 細胞をトランスウェルセルカルチャーインサート (0.4-µm ポアサイズ; BD Biosciences) を用いて 48 時間共培養した。培地は 1% FBS 入り Opti-MEM (Invitrogen) を用いた。

実験には次に示す抗体を使用した: ALK 4C5B8 (Invitrogen), STAT3 124H6, p-STAT3

D3A7, Akt 9272, p-Akt 193H12, Erk2 9108, p-Erk 20G11, FOXO1 C29H4, および STAT6 9362 (Cell Signaling Technology), p21 H-164, p27 F-8, および GATA3 HG3-31 (Santa Cruz Biotechnology), CREG1 299133 (R&D Systems), CD31 555024 (BD Biosciences), tubulin DM-1A (Sigma-Aldrich)。キナーゼ阻害剤 (WHI-P154, U0126, および LY294002) は Calbiochem より入手した。

がん種	細胞名	ALK status
ALCL	Karpas 299	NPM-ALK
	SUDHL-1	NPM-ALK
	SUP M2	NPM-ALK
T-cell leukemia	Jurkat	WT
	Molt4	WT
	CCRF-CEM	WT
Colorectal cancer	HCT116	WT
Cervical cancer	Hela	WT
Lung cancer (adenocarcinoma)	A549	WT
	HLC-1	WT
	H441	WT
	H2228	EML4-ALK
Neuroblastoma	GOTO	WT
	TNB-1	ALK R1275Q mutation
	SH-SY5Y	ALK F1174L mutation
	NB-39-nu	ALK amplification (+)

表 1. 細胞株の ALK status

EML4: echinoderm microtubule associated protein like 4, WT: 野生型

3-2 患者検体

東京大学, 順天堂大学医学部および自治医科大の倫理委員会により承認された倫理基準に則って, 患者検体を実験に使用した。順天堂大学病院および順天堂浦安病院に

において ALCL と診断された患者検体を用いた。ヘルシンキ宣言に従って、書面によるインフォームドコンセントは入手済みである（東京大学 3240-(1), 順天堂大学 順大医倫第 2011043 号, 自治医科大学 第遺 11-20 号（遺 10-36 変更）, 特発性血液疾患のゲノミクス解析）。

3-3 TuD miRNA システム, shRNA, およびプラスミド

Tough decoy RNA (TuD RNA) のデザインは既報を参考にし (53), hsa-miR-135b に対する complementary sequence を組み込んだ。TuD RNA の詳細な配列を表 2 に示す。

Gene	TuD RNA insert (The underlined nucleotides indicate BamHI and XbaI sites) (The bold nucleotides indicate miR-135b complementary sequence)
TuD-NC	forward 5'- <u>gatcc</u> GACGGCGCTAGGATCATCAACAAGCCACAACGAATCTCTATATC ATCAAGTATTCTGGTCACAGAATACAACAAGCCACAACGAATCTCTAT ATCATCAAGATGATCCTAGCGCCGTCTTTTTT _t -3' reverse 5'- <u>ctaga</u> AAAAAAGACGGCGCTAGGATCATCTTGATGATATAGAGATTCGT TGTGGCTTGTTGTATTCTGTGACCAGAATACTTGATGATATAGAGATT CGTTGTGGCTTGTTGATGATCCTAGCGCCGTC _g -3'
TuD-miR-135b	forward 5'- <u>gatcc</u> GACGGCGCTAGGATCATCAACT CACATAGGAATGGATCAAAG CCATACAAGTATTCTGGTCACAGAATACAACTACATAGGAATGGAT CAAAGCCATACAAGATGATCCTAGCGCCGTCTTTTTT _t -3' reverse 5'- <u>ctaga</u> AAAAAAGACGGCGCTAGGATCATCTTGTATGGCTTTTGATCCAT

TCCTATGTGAGTTGTATTCTGTGACCAGAATACTTGTATGGCTTTTG ATCCATTCCTATGTGAGTTGATGATCCTAGCGCCGTC _{g-3'}
--

表 2. TuD RNA の配列

NC: Negative control

ALK と STAT3 に対する shRNA は既報を参照に作製した (54, 55)。TuD RNA と shRNA 用の合成オリゴヌクレオチドをアニーリングさせ、pENTR-H1 ベクターに組み入れた。Pri-miRNA 発現用ベクター (pri-miR-135b) は pre-miRNA とその両側の隣接配列を含むように pri-miRNA の短い断片配列を Karpas 299 細胞の RNA より合成した cDNA を鋳型に PrimeSTAR (Takara Bio) を用いてクローニングし、pcDNA6.2-GW/EmGFPmiR ベクター (Invitrogen) に挿入し作製した。NPM-ALK は Karpas 299 細胞の cDNA を鋳型として、PrimeSTAR を用いてクローニングし、pENTR ベクターに導入した。miRNA センサーベクター (miR-135b sensor) は Psicheck 2 dual luciferase reporter ベクター (Promega) のルシフェラーゼ遺伝子の 3' UTR の XhoI と NotI の制限酵素サイト間に成熟型 miRNA の相補配列を挿入することで調製した。他のレポーターコンストラクトは、各標的遺伝子 (FOXO1, GATA3, STAT6, APC, LZTS1, および LATS2) の 3' UTR 断片を PCR 法にて増幅し、上と同じ Psicheck 2 dual luciferase reporter ベクターのルシフェラーゼ遺伝子の 3' UTR の XhoI と NotI の制限酵素サイトに組み入れ調製した。PCR 法でクローニングしたものはすべてシーケンスの確認を実施した。使用したプライマー配列を表 3 に示す。

また miRNA の一過性のトランスフェクション用に, pre-miR miRNA precursors

(Ambion) を用いた。

ベクター	プライマー配列
miR-135b sensor	forward 5'- TCGAGagtagagctctagtTCACATAGGAATGAAAAGCCATAgc -3' reverse 5'- ggccgcTATGGCTTTTCATTCCTATGTGAactagagctctactC -3' (Sensor-oligo-forward: XhoI-SacI-(miRNA-complementary sequence)-NotI)
FOXO1 3' UTR reporter	forward 5'- <u>ccgctcgag</u> GGGTTAGTGAGCAGGTTA -3' reverse 5'- <u>ataagaatgcggccgc</u> TTGTGGCTGACAAGACTTA -3' (The underlined nucleotides indicate XhoI and NotI sites)
GATA3 3' UTR reporter	forward 5'- <u>ccgctcgag</u> TTCGACTTGCATTTTTGCAG -3' reverse 5'- <u>ataagaatgcggccgc</u> GCACGCTGGTAGCTCATACA -3'
STAT6 3' UTR reporter	forward 5'- <u>ccgctcgag</u> TCCCAGCTGGAGGGAGAAC -3' reverse 5'- <u>ataagaatgcggccgc</u> CAGATTGTGTACAGTAGATTA -3'
APC 3' UTR reporter	forward 5'- <u>ccgctcgag</u> TTAAAAGAGAGGAAGAATGAAACTAAG -3' reverse 5'- <u>ataagaatgcggccgc</u> TGGGTAAACTTGTTTCATC -3'
LZTS1/FEZ1 3' UTR reporter	forward 5'- <u>ccgctcgag</u> CTTTGTTCGAAATAGATATCCTC -3' reverse 5'- <u>ataagaatgcggccgc</u> CATATATGCCATCTTAGTG -3'
LATS2 3' UTR reporter	forward 5'- <u>ccgctcgag</u> GAAACTGAGTGATCTAATGGTTC -3' reverse 5'- <u>ataagaatgcggccgc</u> CATGAAAGTATGTCAGAG -3'
NPM-ALK	forward 5'- <u>tggaattc</u> CGATGGAAGATTCGATGGAC -3' reverse 5'- <u>attctcgag</u> ATATCAGGGCCCAGGCTGGTTC -3' (The underlined nucleotides indicate EcoRI and XhoI sites)
pri-miR-135b	forward 5'- <u>cgggatcc</u> TTTATGGCCAGGAAGC -3' reverse 5'- <u>ccgctcgag</u> AAGGTCTCCTTCCTT -3' (The underlined nucleotides indicate BamHI and XhoI sites)
shNTC	forward 5'- <u>gatcc</u> CCGCCGCTTTGTAGGATAGAGTTCAAGAGACTCTATCCTACAAA GCGGCTTTTTGGAAAt -3' reverse 5'- <u>ctaga</u> TTTCCAAAAAGCCGCTTTGTAGGATAGAGTCTCTTGAAGCTCTAT CCTACAAAGCGGCGGg -3' (The underlined nucleotides indicate BamHI and XbaI sites)

shALK	forward 5'- <u>gatcc</u> CCGGGCGAGCTACTATAGAAATTCAAGAGATTTCTATAGTAGCT CGCCCTTTTTGGAAA _t -3' reverse 5'- <u>ctaga</u> TTTCCAAAAAGGGCGAGCTACTATAGAAATCTCTTGAATTTCTA TAGTAGCTCGCCCGGg -3'
shSTAT3	forward 5'- <u>gatcc</u> CCGCAGCAGCTGAACAACATGTTTCAAGAGAACATGTTGTTTCAG CTGCTGCTTTTTGGAAA _t -3' reverse 5'- <u>ctaga</u> TTTCCAAAAAGCAGCAGCTGAACAACATGTTCTCTTGAAACATG TTGTTTCAGCTGCTGCGGg -3'

表 3. miRNA センサーベクター, 3' UTR レポーター, および shRNA の配列

NTC: non-targeting control

3-4 ルシフェラーゼレポーターアッセイ

miRNA センサーベクターは Jarkat 細胞, Karpas 299 細胞, および SUDHL-1 細胞に Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Invitrogen) を用いてトランスフェクションした。トランスフェクション後 24 - 48 時間で細胞抽出液を調製し, Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて Renilla ルシフェラーゼ発現量 / firefly ルシフェラーゼ発現量を測定し, ルシフェラーゼ遺伝子の発現を評価した。なお, control sensor は Psicheck 2 dual luciferase reporter ベクター キット付属のものを使用した。pri-miRNA 発現ベクターを用いた実験では, pri-miRNA 発現ベクター (empty, LacZ, お

よび pri-miR-135b) と各レポーターコンストラクトを Lipofectamine 2000 を用いて HEK293T 細胞にトランスフェクションした。なお, empty は pri-miRNA 発現ベクターの pri-miRNA の挿入配列がないベクターを示し, LacZ は Psicheck 2 dual luciferase reporter ベクター キット付属の LacZ Oligo をアニーリングしたものを挿入配列としてベクターに組み込んだものである。トランスフェクション後 48 時間で細胞抽出液を調製し, Dual-Luciferase Reporter Assay System を用いてルシフェラーゼ遺伝子の発現を評価した。Renilla ルシフェラーゼ発現量 / firefly ルシフェラーゼ発現量を測定し, 対象とする 3' UTR への各 pri-miRNA 発現ベクターの影響を評価した。

3-5 定量リアルタイム PCR アッセイ

定量リアルタイム PCR アッセイ (qRT-PCR) は既報に基づいて行った (34)。各遺伝子および pri-miR-135b を qRT-PCR 法で測定するにあたり, TRIzol (Invitrogen) を用いて total RNA を抽出し, PrimeScript II first-strand cDNA synthesis kit (Takara Bio) を用いて, oligo dT または random hexamer primer にて cDNA への逆転写を行った。qRT-PCR は SYBR Green 法で, 機器は 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いた。各遺伝子および pri-miR-135b の結果は β -actin を内在性コントロール遺伝子とし, 標準化を行った。

細胞株における成熟型 miRNA の発現レベルは各細胞から TRIzol を用いて調製した total RNA と TaqMan MicroRNA assay kit (Applied Biosystems) を用いて, miRNA 特異的プライマーによる逆転写と, それに続く TaqMan プローブでの qRT-PCR を行った。機器は 7500 Fast Real-Time PCR System を用いた。データ解析は比較 Ct 法により行った。成熟型 miRNA の評価は核小体低分子 RNA である RNU44 を用いて標準化を行った。臨床検体からの RNA 抽出には miRNeasy mini kit (QIAGEN) もしくは RecoverAll total nucleic acid isolation kit for FFPE Tissues (Ambion) を用いた。臨床検体の解析は細胞株と同様の方法を実施し, 成熟型 miR-135b の発現量を評価した。使用したプライマーを表 4 に示す。

遺伝子	プライマー配列
human pri-miR-135b	forward 5' - GCTTCTCGCTTCCCTATGA - 3' reverse 5' - TCCGAACCTGGTCCCA - 3'
human LEMD1	forward 5' - CTCTGCGGGGAATTGTGAG - 3' reverse 5' - GACTCAACAAGGCCCCCTTT - 3'
human IL-17A	forward 5' - ACCAATCCCAAAAGGTCCTC - 3' reverse 5' - TCTCTCAGGGTCCTCATTGC - 3'
human IL-17F	forward 5' - AGCGCAACATGACAGTGAAG - 3' reverse 5' - GCCTCACTCAGAAAGGCAAG - 3'
human I κ B ζ	forward 5' - ATGGCCTGACTCCCCTTCA - 3' reverse 5' - GAGTTCATGGACCACAGCATTG - 3'
human ROR α	forward 5' - GACGCCCACCTACAACATCT - 3' reverse 5' - TCTGGGGAAGGCTGTATGTC - 3'
human ROR γ	forward 5' - TTTTCCGAGGATGAGATTGC - 3' reverse 5' - AAGGCCAGCTCCAGATTGTA - 3'
human AHR	forward 5' - CTGCCTTTCCCACAAGATGT - 3' reverse 5' - AGTTATCCTGGCCTCCGTTT - 3'

human IL-1 β	forward 5' - AGCACCTCTCAAGCAGAAAACAT - 3' reverse 5' - TTGCATGGTGAAGTCAGTTATATCC - 3'
human IL-6	forward 5' - ATTCTGCGCAGCTTTAAGGA - 3' reverse 5' - GAGGTGCCCATGCTACATTT - 3'
human IL-8	forward 5' - CTGCGCCAACACAGAAATTA - 3' reverse 5' - CTCTGCACCCAGTTTTTCCTT - 3'
human GZMB	forward 5' - GGGGGACCCAGAGATTAATA - 3' reverse 5' - GCCATTGTTTCGTCCATAGG - 3'
human PRF1	forward 5' - ACTCACAGGCAGCCAACTTT - 3' reverse 5' - CTCTTGAAGTCAGGGTGCAG - 3'
human CCL2	forward 5' - CCCAGTCACCTGCTGTTAT - 3' reverse 5' - AGATCTCCTTGGCCACAATG - 3'
human CCL7	forward 5' - ACCACCAGTAGCCACTGTCC - 3' reverse 5' - TTGGGTTTTCTTGTCCAGGT - 3'
human CCL20	forward 5' - TTTATTGTGGGCTTCACACG - 3' reverse 5' - GATTTGCGCACACAGACAAC - 3'
human CXCL1	forward 5' - AGGGAATTCACCCAAGAAC - 3' reverse 5' - TAACTATGGGGGATGCAGGA - 3'
human CXCL2	forward 5' - GCAGGGAATTCACCTCAAGA - 3' reverse 5' - GACAAGCTTTCTGCCCATTC - 3'
human β -actin	forward 5' - TGGCACCACACCTTCTACAAT - 3' reverse 5' - TACATGGCTGGGGTGTGTA - 3'

表 4. 定量リアルタイム PCR アッセイに使用したプライマーの配列

I κ B ζ : Inhibitor of kappa B zeta, ROR: RAR-related orphan receptor, AHR: Aryl hydrocarbon receptor, GZMB: Granzyme B, PRF1: Perforin 1, CCL: C-C motif chemokine ligand, CXCL: C-X-C motif chemokine ligand

3-6 クロマチン免疫沈降アッセイ

SUP-M2 細胞または Jurkat 細胞に対して、終濃度 1% のホルムアルデヒドを添加し、10 - 15 分間処理し架橋操作を実施後、0.125 M グリシン溶液を加え室温で 5 分間震盪し架橋反応を停止させ、D-PBS (-) で洗浄後に細胞を回収した。回収した細胞を SDS

溶解バッファー (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM PMSF (sigma)) に懸濁し、氷上でピペッティング後 10 分間処置し、超音波破碎を行った。超音波破碎を行ったサンプルを ChIP 希釈バッファー (1.1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 165 mM NaCl, 0.11% sodium deoxycholate, 1 mM PMSF (Sigma)) で 10 倍に希釈し、D-PBS (-) と 0.5% 牛血清アルブミン (BSA) 溶液中で 5 - 10 μ g の抗体とともに前培養した protein A もしくは anti-mouse IgG-Dynabeads をサンプルに加えて、4°C で一晩培養した。STAT3 を沈降させるために、抗 STAT3 抗体 (124H6, Cell Signaling Technology) を使用した。培養後ビーズを 1 \times RIPA / 150 mM NaCl バッファー (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl) で 1 回, 1 \times RIPA / 500 mM NaCl バッファー (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl) で 1 回, LiCl バッファー (0.25 M LiCl, 1% NP40, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) で 1 回, TE バッファー (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) で 2 回洗浄し、ChIP 溶出バッファーに置換した。その後、サンプルを 65°C で一晩培養することで溶出およびリバースクロスリンクを行った。培養後 Proteinase K を加えタンパク質を分解させた後、PCR purification kit (QIAGEN) を用いてクロマチン DNA を抽出し、PCR 解析に用いた。使用したプライマーを表 5 に示す。

遺伝子	プライマー配列
LEMD1 ChIP #1	forward 5' - ACTGGCAGCAGCAGCCTTGA - 3' reverse 5' - GGTCCAGCGGCAGGAATCTCAT - 3'
LEMD1 ChIP #2	forward 5' - AGTTCCACCTGCTGGCTGCT - 3' reverse 5' - ACACTTGCCCGTGGGAGTCTGT - 3'
LEMD1 ChIP #3	forward 5' - GGCAGTGTGCCTATGAAGTCAACCA - 3' reverse 5' - AGGACAATGCATCTCAGCACCTCA - 3'
GAPDH ChIP (control)	forward 5' - TACTAGCGGTTTTACGGGCG - 3' reverse 5' - TCGAACAGGAGGAGCAGAGAGCGA - 3'

表 5. クロマチン免疫沈降アッセイに使用したプライマーの配列

ChIP: chromatin immunoprecipitation, GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

3-7 レンチウイルスを用いた遺伝子導入

TuD RNAs, shRNAs, pri-miRNA, NPM-ALK または恒常活性型 STAT3 (constitutively active[ca]-STAT3[A662C/N664C]) (56) はレンチウイルス感染システムを用いて細胞に導入した。レンチウイルス感染システムは慶応義塾大学医学部, 三好浩之博士より供与いただいた。TuD RNA と shRNA は pENTR4-H1 ベクターから LR Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen) を用いて CS-RfA-EG レンチウイルスベクターへ組み入れた。同様に, NPM-ALK は pENTR ベクターから LR Clonase II Enzyme Mix を用いて, CSII-EF-RfA-CMV-Puro レンチウイルスベクターへ組み入れた。pri-miRNA 用発現ベクターは pcDNA6.2-GW/EmGFPmiR ベクターから BR Clonase II Enzyme Mix を用いて CSII-EF-RfA-CMV-Puro レンチウイルスベクターへ組み入れた。これらのベクターを pCMV-VSV-G-RSV-Rev と pCAG-HIVgp ベクターとともに HEK293FT 細胞に Lipofectamine

2000 Transfection Reagent を用いてトランスフェクションすることでレンチウイルスを産生させた。トランスフェクション 48 - 72 時間後に培養上清を遠心回収し、0.22 μm Filter (Millipore) を用いてウイルス粒子を回収した。Lenti-X qRT-PCR titration kit (Takara Bio) を用いて力価を測定し、培養細胞に添加した。力価が低い場合は、Lenti-X™ Concentrator (Takara Bio) を用いて、ウイルスの濃縮を行った。測定した力価を元に、細胞毎の適切な MOI (multiplicity of infection) に合わせるためにウイルス量を調整し、細胞に添加・遠心処理し 24 時間培養後に培地交換を行い、さらに 48 - 72 時間培養することで遺伝子導入を実施した。安定発現株樹立が目的の場合は、その後 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ puromycin を添加しセレクションを実施した。TuD RNA に関しては、遺伝子導入のための 72 時間培養後に感染効率をモニターするためにフローサイトメトリーを用いてベクター由来の GFP の発現解析を行った。

3-8 ウェスタンブロッティング

浮遊細胞の場合は、細胞を回収し、D-PBS (-) で洗浄後に 1% Nonidet P-40, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, および 1% protease inhibitor mixture (Nacalai Tesque) を含むバッファーを用いて細胞を溶解させた。接着細胞の場合は、培養上清を除去し、D-PBS (-) で洗浄後に上記の溶解バッファーを用いて細胞を溶解させた。溶解させた細胞サンプルを、10,000 \times g, 30 分, 4°C で遠心し、上清 (Total cell

lysates) を回収した。Total cell lysates のタンパク質濃度を BCA タンパク質アッセイ (Pierce) を用いて決定した後、3 × SDS サンプルバッファー (100 mM Tris-HCl, pH 8.8, 0.01% bromophenol blue, 36% glycerol, 4% SDS, 10 mM dithiothreitol) を加え、95°C で 5 分間加熱することでタンパク質の変性を行った。作製したサンプルを 30-50 µg/レーンの濃度で SDS-PAGE で泳動し、アクリルアミドゲルより Fluoro Trans W membrane (Pall) に転写した。転写後の membrane を 5% スキムミルクまたは 5% BSA in TBS-T で 1 時間ブロッキングを行い、TBS-T で洗浄後に前述の一次抗体を 4°C にて一晩反応させた。翌日 TBS-T で洗浄後、二次抗体を 1 時間反応させた。TBS-T で洗浄後、ECL detection system (Amersham Pharmacia Biotech) によりタンパク質の検出を行った。

3-9 薬剤感受性試験

Jurkat (WT および miR-135b 過剰発現株) 細胞は薬剤添加 24 時間前に 1×10^5 cells/mL の密度で 6 ウェルプレートに播種した。種々の濃度 (0, 100, または 200 nM) の cytosine β -D-arabinofuranoside (Sigma-Aldrich) を加えてから 24 時間培養後に、細胞を回収し、使用培地で洗浄後再び 1×10^5 cells/mL の密度で 96 ウェルプレートまたは 24 ウェルプレートに播種し、細胞増殖およびアポトーシス解析に用いた。WST-8 (Nacalai Tesque)

を用いて細胞増殖を測定し， annexin V assay kit (BD Biosciences) を用いてアポトーシスを測定した。

3-10 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

miRCURY LNA microRNA power inhibitor (EXIQON; Control A or antisense against miR-135b) を Karpas 299 細胞に Amaxa V kit, program: A-30 でトランスフェクションし，72 時間後の培養上清中の IL-17F の濃度を ELISA kit (R&D Systems; DuoSet human IL17F) の操作手順書に沿って測定した。

3-11 動物実験モデル

4 週齢の C.B-17/IcrCrj severe combined immunodeficient (SCID) 雌性マウスは日本チャールズリバーより購入した。すべての動物試験は東京大学の動物倫理委員会の指針に則って実施した。FBS を含まない RPMI 1640 培地と 30% Matrigel (BD Biosciences) の混合液に 5×10^6 cells/mL の濃度になるように Karpas 299 細胞を混合し，この混合液 0.2 mL を雌性 SCID マウスの右腋皮下に移植した。1 週間，腫瘍体積が 50 - 200 mm³ になるまで観察した。miRCURY LNA microRNA power inhibitor (EXIQON; Control A or antisense against miR-135b) と atelocollagen (Koken) を操作手順書にしたがい，混合させた。移植後 7 日目に無作為に群分けを行い (n = 6/群)， atelocollagen と 5 M の

Antisense oligonucleotides の混合物を移植後 7 日目と 10 日目に腫瘍周辺の皮下に 200 $\mu\text{L}/\text{body}$ の量で投与した。皮下移植マウスの腫瘍の長径と短径はノギスを用いて評価終了日まで毎日測定した。腫瘍体積は (長径 \times 短径²) / 2 により算出した。

3-12 免疫組織染色

動物より採取した腫瘍サンプルは 1 時間室温で 10% 中性ホルマリンを用いて固定後、4°C で 10% ショ糖入り PBS を用いて一晩洗浄し、optimal cutting temperature compound (Tissue-Tek) に包埋した。免疫組織染色用にドライアイスで冷やしたアセトン内にサンプルを入れて急速凍結させた。クライオスタットを用いて、凍結サンプルを 10 μm の厚さで切り出しを行い、10%ホルマリンにて固定後に 1 次および 2 次抗体を用いて染色を行った。サンプルは LSM510 Meta confocal microscope (Carl Zeiss) を用いて観察した。Photoshop 8.0.1 software (Adobe Systems) と ImageJ 1.36b software (National Institutes of Health) を用いて、6 匹のマウスより採取した腫瘍の複数のフィールド内の CD31 染色部位の定量解析を行った。

3-13 遺伝子発現データベースの解析

NPM-ALK 依存的な遺伝子発現パターンを解析したマイクロアレイデータ (GSE6184) と末梢性 T 細胞リンパ腫 (PTCL) の患者の遺伝子発現プロファイル (gene

expression profiling, GEP) データ (GSE19069) は National Center for Biotechnology Information's Gene Expression Omnibus より入手した (54, 57)。Broad Institute (<http://www.broadinstitute.org/gsea/>) より入手した GSEA Version 2.0 software を用いて, NPM-ALK のマイクロアレイデータ (GSE6184) と GSEA に含まれる miRNA 標的遺伝子セットもしくは TargetScan に基づく標的遺伝子セット (<http://www.targetscan.org/>) を使用して gene set enrichment analysis (GSEA) を行い (58), NPM-ALK を knockdown した際の miR-135b 標的遺伝子群の全体的な変化を解析した。PTCL の患者の遺伝子発現プロファイルデータ (GSE19069) の再解析は, T- and NK-細胞および細胞株, 成人 T 細胞白血病リンパ腫 (ATLL), 血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫 (AITL), ALK 陽性 ALCL, ALK 陰性 ALCL, および末梢性 T 細胞性リンパ腫-非特異型 (PTCL-unclassifiable) における Th17 関連分子 (IL-17A, IL-17F, RORC, IL-26), GATA3, FOXO1, ALCL 関連遺伝子 (ALK, GZMB, PRF1), および TCR 関連遺伝子 (CD3E, CD3G, LCK, ZAP70, LAT, および SLP76) の発現を解析し Heatmap を用いて示した。

3-14 統計解析

統計解析は Student's *t* テストもしくは multivariate ANOVA（増殖試験と *in vivo* 試験の解析に利用）を用いて行った（*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 で表記）。すべてのデータは平均値 ± 標準誤差で表記した。

4. 結果

4-1 ALCL における miR-135b の発現上昇

Lawrie らによって、主な B 細胞リンパ腫および T 細胞リンパ腫の細胞株と正常リンパ球において特徴的な発現パターンを示す miRNA 群が報告された (51)。その中で T 細胞性白血病と比べて ALCL で発現が亢進している miRNA として miR-21, miR-27a, および miR-135b が、逆に発現が抑制されているものとして miR-324, miR-342, および miR-454 が報告されている。これらの miRNA のうち、miR-21 は ALK 陽性 ALCL 以外のリンパ腫細胞株でも発現亢進が認められた。一方、miR-135b は ALK 陽性 ALCL のみで発現が亢進しており、かつ他のほぼすべての B 細胞株, T 細胞株, およびリンパ球において発現が抑制されていた。この報告より、miR-135b は NPM-ALK により発現が誘導されている可能性があると考えた。

そこで、まず NPM-ALK 融合遺伝子を有する ALCL 細胞株 3 株 (Karpas 299 細胞, SUDHL-1 細胞, および SUP-M2 細胞) を用いて RT-PCR 法によって上記 3 つの miRNA の発現量を測定・比較した。対照として、正常 T 細胞, ヒト T 細胞性白血病細胞株 3 株 (Jurkat 細胞, CCRF-CEM 細胞, および Molt4 細胞), および miR-135b が発現している大腸がん細胞株 HCT116 細胞を用いた。この結果、miR-21, miR-27a, および miR-135b の内、特に成熟型 miR-135b は正常 T 細胞およびヒト T 細胞性白血病細胞株では

発現がみられず，ALCL 細胞株で顕著に発現量が高いことが明らかになった（図 7 A-C）。

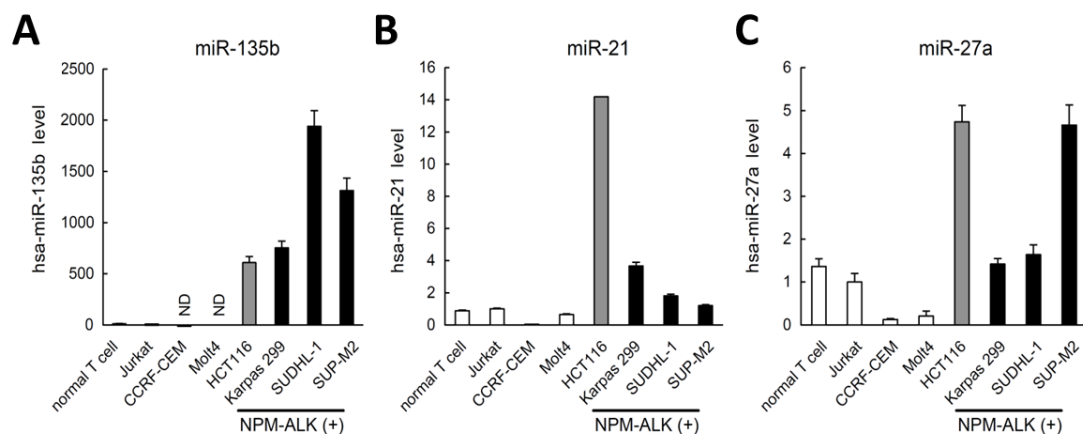


図 7. ALCL 細胞における miR-135b の高発現

(A-C) NPM-ALK 陽性 ALCL 細胞株 (Karpas 299 細胞, SUDHL-1 細胞, および SUP-M2 細胞), 正常 T リンパ球, および T 細胞性白血病細胞株 (Jurkat 細胞, CCRF-CEM 細胞, および Molt4 細胞) における成熟型 miR-135b (A), miR-21 (B), および miR-27a (C) の発現量を qRT-PCR により評価した。陽性対照として内因性の miR-135b が発現している大腸がん細胞株 HCT116 細胞を用いた。ND: not detected.

miR-135b は染色体 1q32.1 上の LEM domain containing 1 (LEMD1) 遺伝子の第一イントロンに存在する (図 8 A)。そこで LEMD1 遺伝子の発現量を解析したところ, 成熟型 miR-135b と同様に ALCL 細胞株において LEMD1 の発現量が非常に高いことが確認された (図 8 B)。

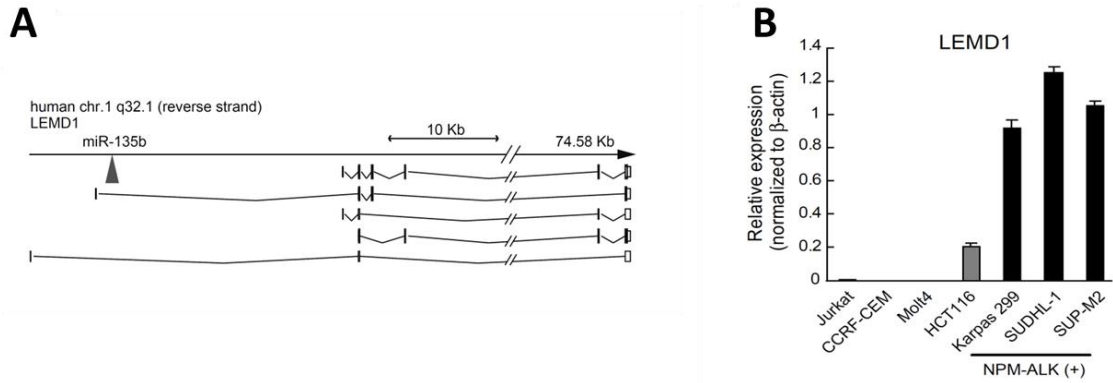


図 8. ALCL 細胞における LEMD1 の高発現

(A) ヒト LEMD1 遺伝子と miR-135b のゲノム構成図 (ヒト LEMD1 遺伝子について数種のスプライシングバリエントが報告されている。miR-135b は LEMD1 の長い転写産物の第一イントロン上にある)。

(B) NPM-ALK 陽性 ALCL 細胞株 (Karpas 299 細胞, SUDHL-1 細胞, および SUP-M2 細胞), T 細胞性白血病細胞株 (Jurkat 細胞, CCRF-CEM 細胞, および Molt4 細胞), および大腸がん細胞株 HCT116 細胞における LEMD1 遺伝子の発現量を qRT-PCR により評価した。

続いて, NPM-ALK の活性を阻害することが報告されている化合物である WHI-P154 を用いて miR-135b の発現に対する影響を検討した (59)。その結果, Karpas 299 細胞 および SUDHL-1 細胞において, 成熟型 miR-135b の発現が ALK 阻害剤である WHI-P154 により抑制されることを見出した (図 9 A)。さらに, Karpas 299 細胞および SUDHL-1 細胞において ALK 阻害剤による LEMD1 と pri-miR-135b の発現量の減少が認められた (図 9 B)。このように ALK 阻害剤によって成熟型 miR-135b, pri-miR-135b, および LEMD1 の発現量が減少したことから, ALCL 細胞において miR-135b の高発現が NPM-ALK により規定されていることが示唆された。

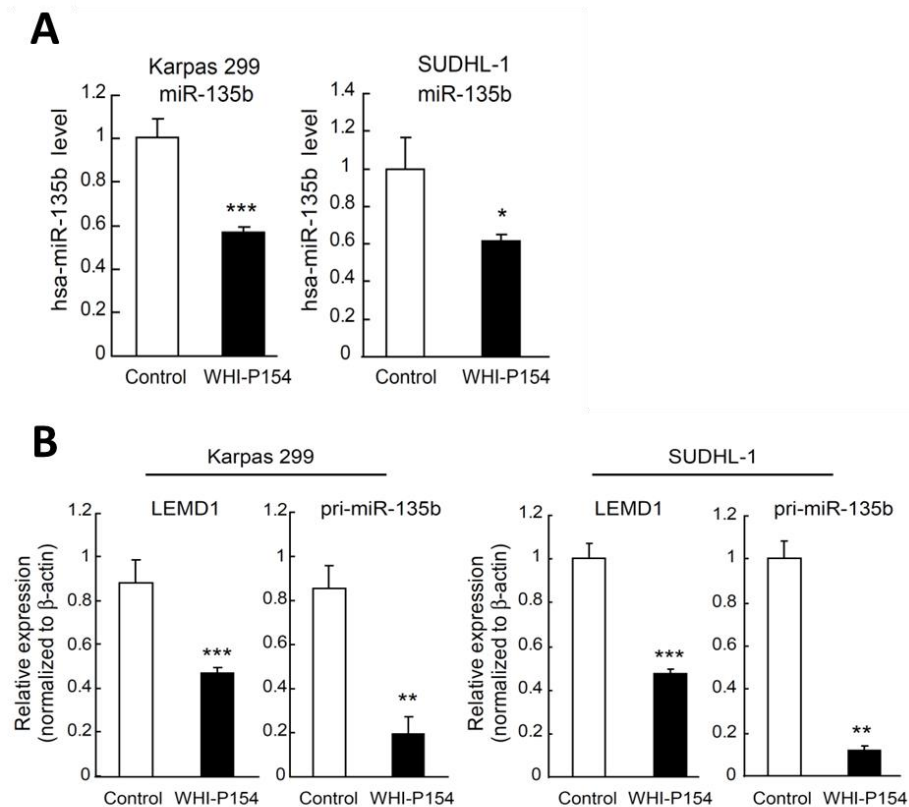


図 9 ALK 阻害剤による ALCL 細胞における成熟型 miR-135b, pri-miR-135b, および LEMD1 の発現抑制

- (A) ALK 阻害剤である WHI-P154 (10 μ M, 4 時間) で処理した Karpas 299 細胞と SUDHL-1 細胞における成熟型 miR-135b の発現量を qRT-PCR により評価した (* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$)。
- (B) ALK 阻害剤である WHI-P154 (10 μ M, 1 時間) で処理した Karpas 299 細胞と SUDHL-1 細胞における LEMD1 および pri-miR-135b の発現量を qRT-PCR により評価した (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)

さらに, ALCL 患者検体を用いて成熟型 miR-135b の発現量を測定したところ, ALK 陽性 ALCL サンプルでは反応性リンパ節および ALK 陰性 ALCL サンプルと比較して, 成熟型 miR-135b の高発現がみられた (図 10)。また, ALK の異常を持つ肺癌および神経芽腫の細胞株における成熟型 miR-135b の発現レベルを測定したところ,

神経芽腫においては測定したすべての細胞株で成熟型 miR-135b の発現は非常に低いものであった (図 11)。肺がんにおいては, EML4-ALK 融合遺伝子を有する H2228 肺腺がん細胞である程度の成熟型 miR-135b の発現が認められたが, それは ALCL 細胞と比較すると非常に低いレベルであった (図 11)。

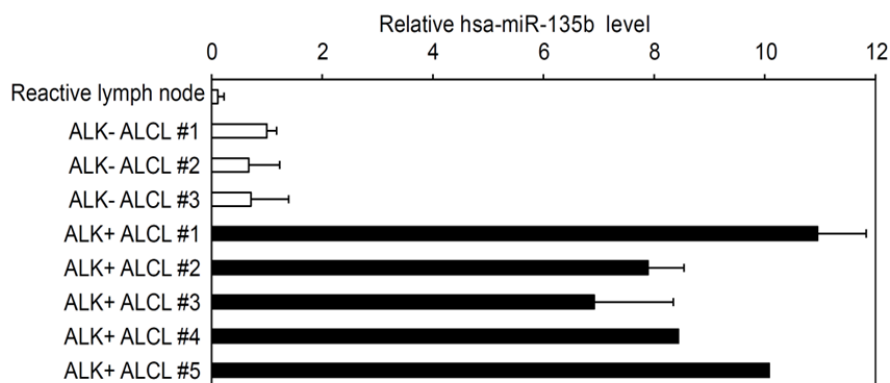


図 10. ALCL 患者検体における miR-135b の発現

ALK-negative および ALK-positive ALCL 患者検体における成熟型 miR-135b の発現量を qRT-PCR により評価した。

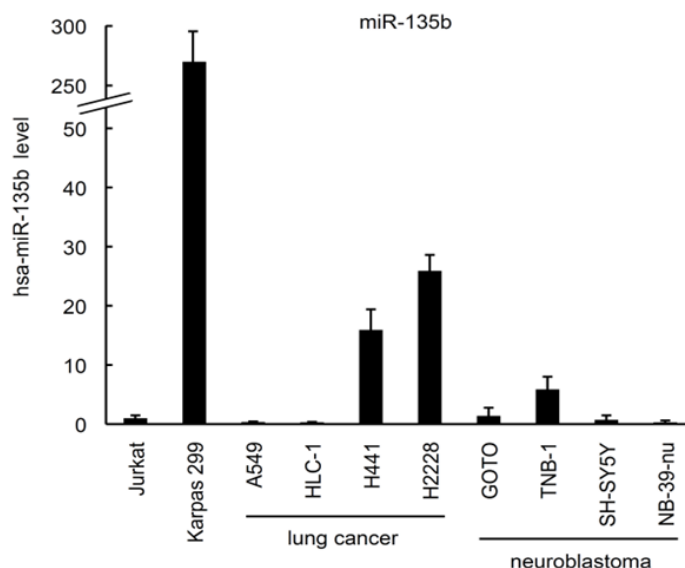


図 11. ALK 異常を有する肺がんおよび神経芽腫細胞株における miR-135b の発現

ALK 異常を有する肺がんおよび神経芽腫細胞株における成熟型 miR-135b の発現量を qRT-PCR により評価した。

4-2 STAT3 活性化を介した NPM-ALK による LEMD1/miR-135b の発現誘導

ALK 阻害剤を用いた検討により (図 9), ALCL 細胞で miR-135b が NPM-ALK によって誘導されていることが示唆された。この可能性をさらに検証するために NPM-ALK およびキナーゼ領域の 210 番目のアミノ酸をアスパラギンからアルギニンに置換し, キナーゼ活性を失わせた NPM-ALK K210R 変異体を作製し, これらをヒト T 細胞性白血病細胞株 Jurkat 細胞に導入し, LEMD1 と miR-135b の発現レベルの変動を調べた。NPM-ALK を導入した Jurkat 細胞においては LEMD1 と成熟型 miR-135b の発現が誘導された一方で, NPM-ALK K210R 変異体を導入した細胞株では誘導は認められなかった (図 12 A)。この結果は NPM-ALK がキナーゼ活性を介して miR-135b とその宿主遺伝子である LEMD1 の発現を上昇させることを支持するものであった。過去の報告により, NPM-ALK は STAT3, Ras-Erk, および PI3K などの下流のシグナル経路を活性化させることが報告されている (40)。そこで次にこれらの経路の関与について検討した。その結果, ALCL 細胞において NPM-ALK もしくは STAT3 をノックダウンすると LEMD1 と miR-135b の発現が抑制され, 一方で Erk または PI3K の阻害ではこれらの発現が抑制されることはなかった (図 12 B-D)。

NPM-ALK による miR-135b 誘導における STAT3 の役割をさらに解析するために, Jurkat 細胞に恒常活性型 STAT3 (constitutively active STAT3, ca-STAT3) を導入したところ, ca-STAT3 の導入により LEMD1 および成熟型 miR-135b の発現上昇が認められ

た (図 13 A)。さらに、LEMD1 遺伝子座において、ヒトとマウスの間で配列が保存されている領域に注目して潜在的な STAT3 結合部位を予測解析し、得られた 3 つの予想結合部位への STAT3 の結合をクロマチン免疫沈降アッセイを用いて評価した (図 13 B)。その結果、ALCL 細胞株において 3 つの予想結合部位に対する STAT3 の結合が認められた (図 13 B-C)。

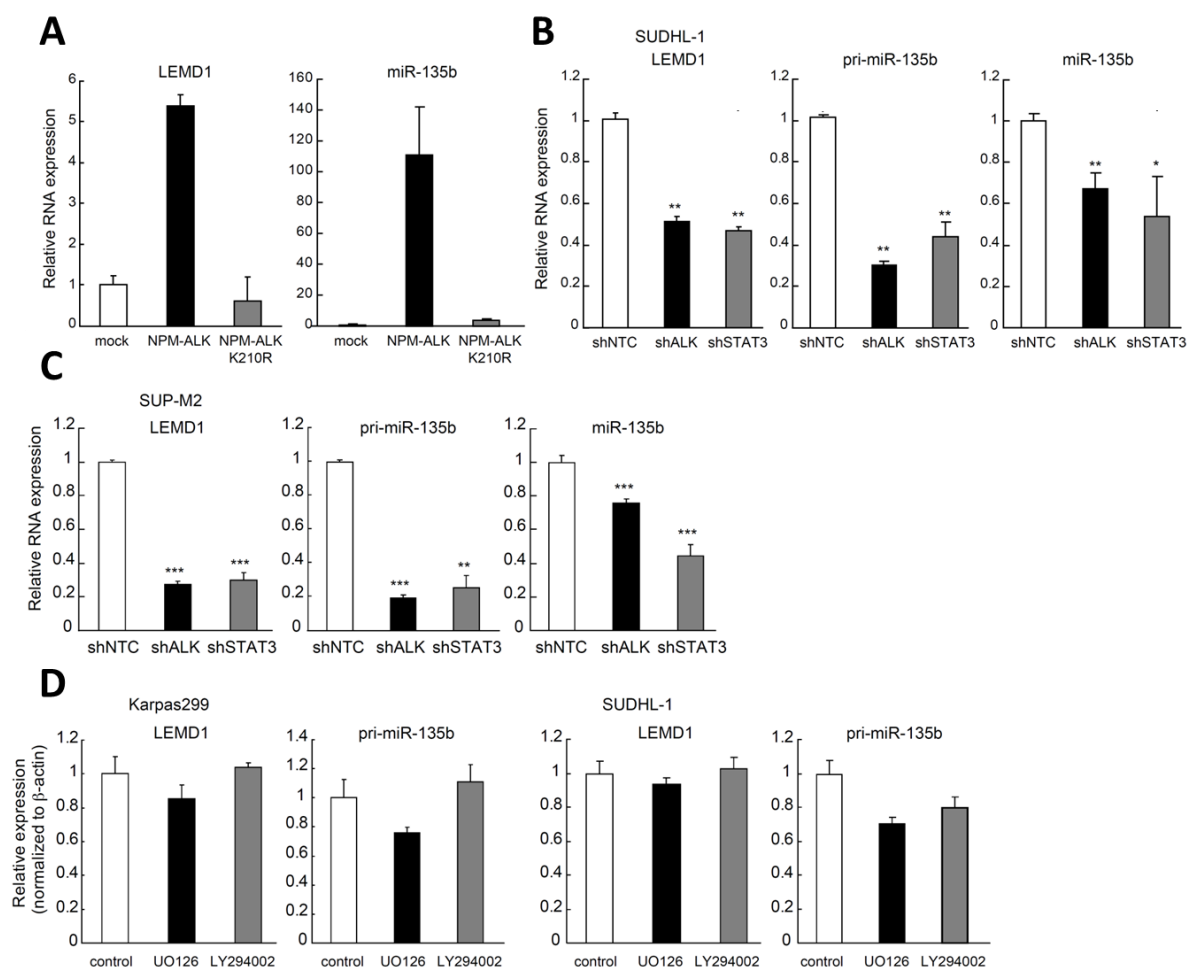


図 12. miR-135b 誘導における NPM-ALK 下流シグナルの検討

(A) レンチウイルスを用いて NPM-ALK または NPM-ALK K210R 変異体を導入した Jurkat 細胞における LEMD1 および成熟型 miR-135b の発現量を qRT-PCR により評価した。
 (B-C) NPM-ALK もしくは STAT3 に対する shRNA を導入した SUDHL-1 細胞 (B) または SUP-M2 細胞 (C) における LEMD1, pri-miR-135b, および成熟型 miR-135b の発現量を qRT-PCR により評価した (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)。

(D) MEK 阻害剤である U0126 (10 μ M) もしくは PI3K 阻害剤である LY294002 (10 μ M) で処理した Karpas 299 細胞と SUDHL-1 細胞における LEMD1 と pri-miR-135b の発現量を qRT-PCR により評価した。

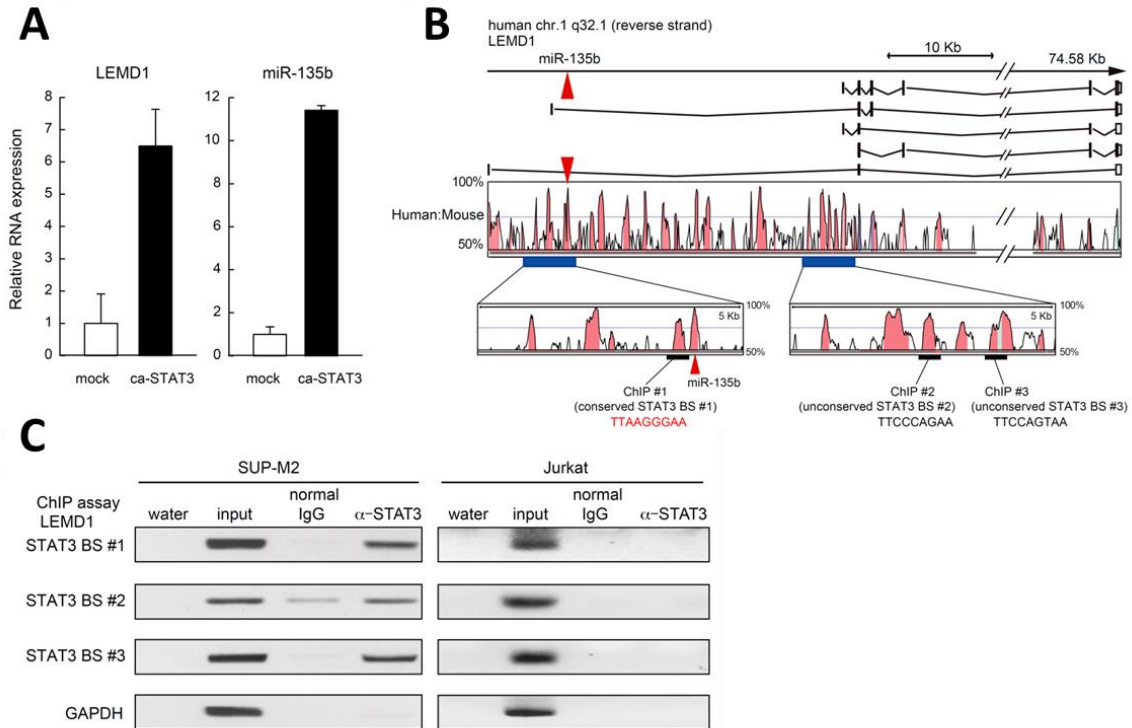


図 13. STAT3 による miR-135b の誘導メカニズムの解析

- (A) レンチウイルスを用いてマウス恒常活性化型 STAT3 (ca-STAT3) を導入した Jurkat 細胞における LEMD1 と成熟型 miR-135b の発現量を qRT-PCR により評価した。
- (B) LEMD1 遺伝子座における STAT3 結合部位の探索。上図はヒト LEMD1 遺伝子と miR-135b のゲノム上の配置を示す。中央の図は Vista 解析におけるヒトとマウス間での遺伝子配列の保存率を示す。下図は STAT3 結合予想部位を示す。赤字で示した TTAAGGGAA はヒトとマウス間で配列が保存されている。
- (C) SUP-M2 細胞 (左図) または Jurkat 細胞 (右図) において、LEMD1 ゲノム領域の STAT3 の予測結合部位に対する STAT3 の結合をクロマチン免疫沈降アッセイを用いて評価した。免疫沈降前の総クロマチンを PCR の陽性対照として、また Jurkat 細胞は陰性対照として使用した。

ALCL 細胞で発現の高い miR-135b が実際に遺伝子発現に対して強い影響をもって

いることを確認するために、miR-135b に対する相補配列をルシフェラーゼ遺伝子の 3'

UTR に組み込んだセンサーベクターを用いたレポーター実験を行ったところ、ALCL 細胞株（Karpas 299 細胞および SUDHL-1 細胞）ではコントロールベクターと比較して miR-135b センサーベクター由来のルシフェラーゼの発現レベルが著しく減少したが、一方で Jurkat 細胞では変化が認められなかった（図 14）。これらの結果より、miR-135b は ALK 陽性 ALCL において NPM-ALK/STAT3 シグナルによって強く誘導され、高い活性を有していることが明らかとなった。

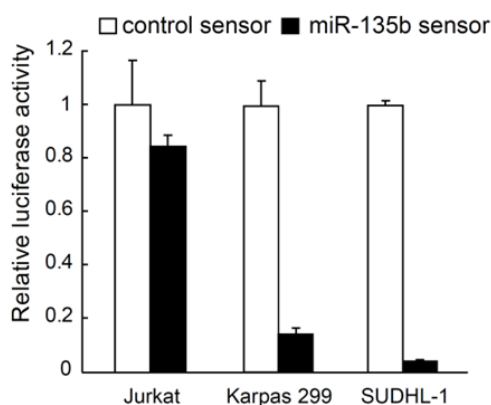


図 14. ALCL 細胞における miR-135b の活性の評価

miRNA センサーをトランスフェクションした Jurkat 細胞、Karpas 299 細胞、および SUDHL-1 細胞における miR-135b の活性をルシフェラーゼアッセイを用いて評価した。

4-3 miR-135b による FOXO1 の発現抑制および薬剤感受性の制御

個々の miRNA の標的遺伝子は、これまでに開発されてきた複数の *in silico* 標的遺伝子予測プログラムを用いて予測することができる。代表的な予測プログラムである TargetScan (version 5.2) を用いたところ (60)、miR-135b の潜在的な標的遺伝子に、

APC, LZTS1, LATS2, CREG1, および FOXO1 などの腫瘍抑制活性をもつと考えられる複数の遺伝子が含まれていた。APC は既に miR-135b の標的として報告されており (61), その他の LZTS1, LATS2, および FOXO1 が標的である可能性を 3' UTR ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて評価した (図 15)。結果として, APC と同様に LZTS1, LATS2, および FOXO1 の 3' UTR も miR-135b により抑制されることが確認された。

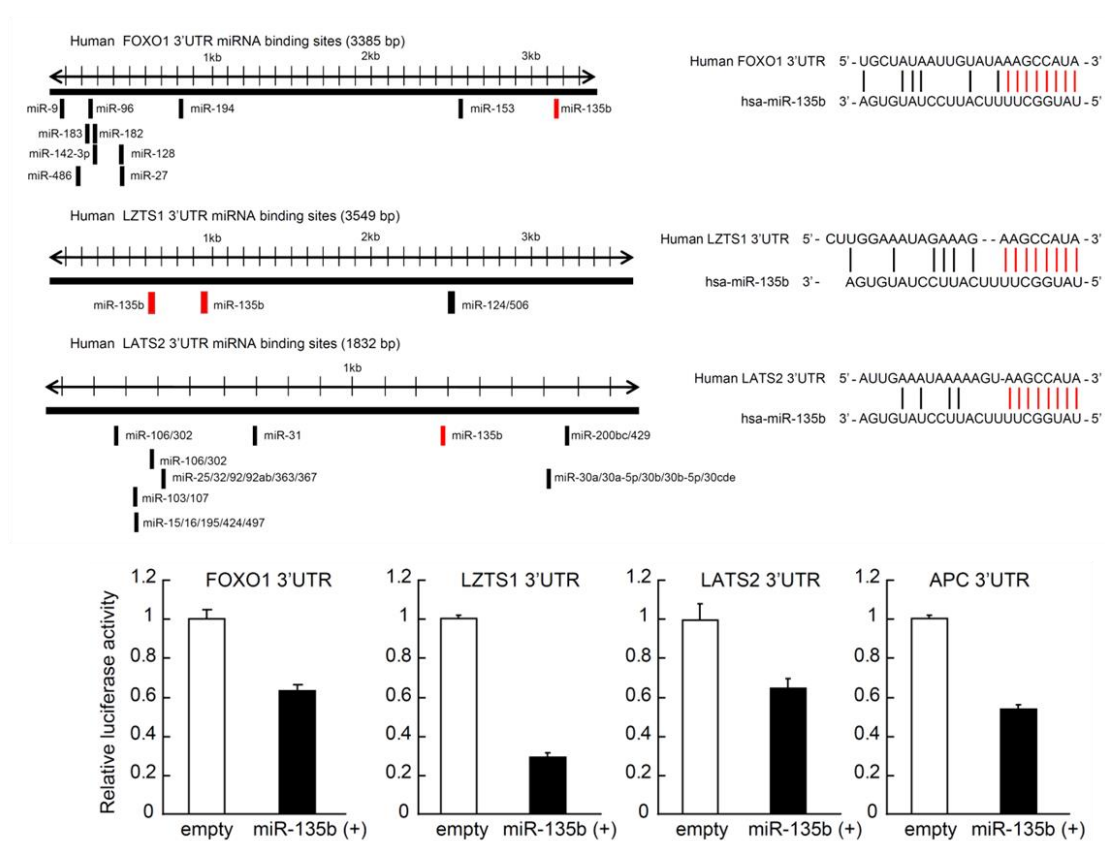


図 15. 3' UTR ルシフェラーゼレポーターアッセイによる miR-135b 予測標的遺伝子の検討

上部左図は FOXO1, LZTS1, および LATS2 の 3' UTR における miRNA の標的部位を示す。上部右図は miR-135b と予想結合部位間の配列アラインメントを示す。下図では, FOXO1, LZTS1, LATS2, もしくは APC の 3' UTR レポーターコンストラクトおよび empty または pri-miR-135b 発現ベクターをトランスフェクションし 48 時間経過した HEK293T 細胞を用いて, これらの候補が miR-135b の標的であるかをルシフェラーゼレポーターアッセイにより検討した。なお, APC は既に miR-135b の標的であると他の報告で示されている (61)。

さらに ALCL 細胞における miR-135b の内在性かつ機能的な標的遺伝子を見出すために、個々の miRNA の機能を特異的に阻害する RNA デコイ (TuD RNA) システムを用いて、miR-135b の効率的・長期的な抑制を試みた (図 16 A) (53)。TuD RNA システムでは、RNA ポリメラーゼ III により、対象とする miRNA の機能を阻害する RNA デコイ分子が産生される。既報を参考に miR-135b に対する TuD RNA を設計し、TuD RNA を ALCL 細胞株 Karpas 299 細胞に導入したところ、実際に qRT-PCR における miR-135b の発現レベルの低下と miR-135b 活性の強い抑制が認められた (図 16 B)。miR-135b に対する TuD RNA の効果は、他の 2 つの ALCL 細胞株である SUDHL-1 細胞と SUP-M2 細胞でも qRT-PCR 法により確認を行った (図 16 C)。

FOXO1 と miR-135b の関係について、さらに詳細な検討と TuD RNA を用いた ALCL 細胞株での検討を行った。FOXO1 の 3' UTR には図 17 A に示すように、miR-135b の結合部位が存在するが、この結合部位に変異を導入した 3' UTR ルシフェラーゼレポーターを作製し、miR-135b がこの結合部位依存的に FOXO1 の 3' UTR を抑制することを確認した (図 17 A)。さらに、外因性 miR-135b の導入により FOXO1 タンパク質発現が抑制されることを見出した (図 17 B)。続いて、TuD RNA を用いた解析により、SUDHL-1 細胞と SUP-M2 細胞において、miR-135b を阻害すると FOXO1 のタンパク質発現の上昇がみられ、FOXO 依存的な細胞周期阻害因子 p21 と p27 のタンパク質発現の上昇もみられた (図 18 A)。これらの結果より、FOXO1 が miR-135b の新規標的

かつ ALCL 細胞における内在性の標的であることが明らかになった。Karpas 299 細胞では FOXO1 がほとんど発現していないが, miR-135b ノックダウンにより p27 および FOXO1 以外の p27 の正の制御因子である CREG1 のタンパク質発現量が増加した (図 18 B) (62)。CREG1 も miR-135b の予測標的遺伝子の一つである。

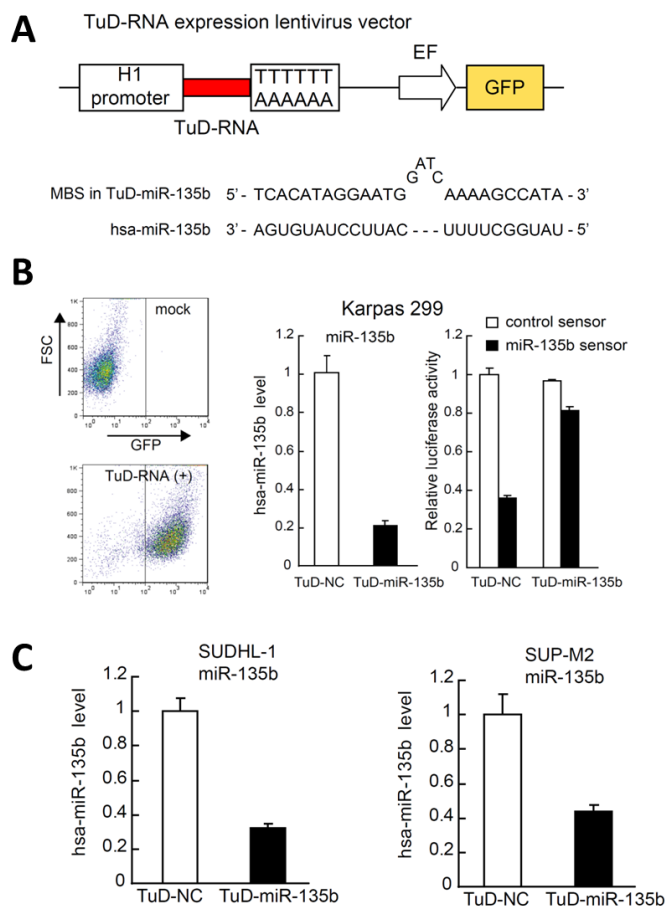


図 16. TuD RNA システムによる miR-135b の抑制

- (A) TuD RNA 発現ベクターの構造を示す。miR-135b に対する TuD RNA は miR-135b と部分的に相補性を持った miRNA-binding site (MBS) を有している。
- (B) Karpas 299 細胞への TuD RNA の導入効率を flow cytometer を用いて解析した (左図)。FSC は forward scatter を示す。TuD-RNA-miR-135b の導入による成熟型 miR-135b の発現量の変化を qRT-PCR により, miR-135b 活性の変化をルシフェラーゼアッセイにより解析した (右図)。NC は negative control を示す。
- (C) SUDHL-1 細胞 (左図) または SUP-M2 細胞 (右図) に TuD-RNA-miR-135b を導入した際の成熟型 miR-135b の発現量の変化を qRT-PCR で解析した。

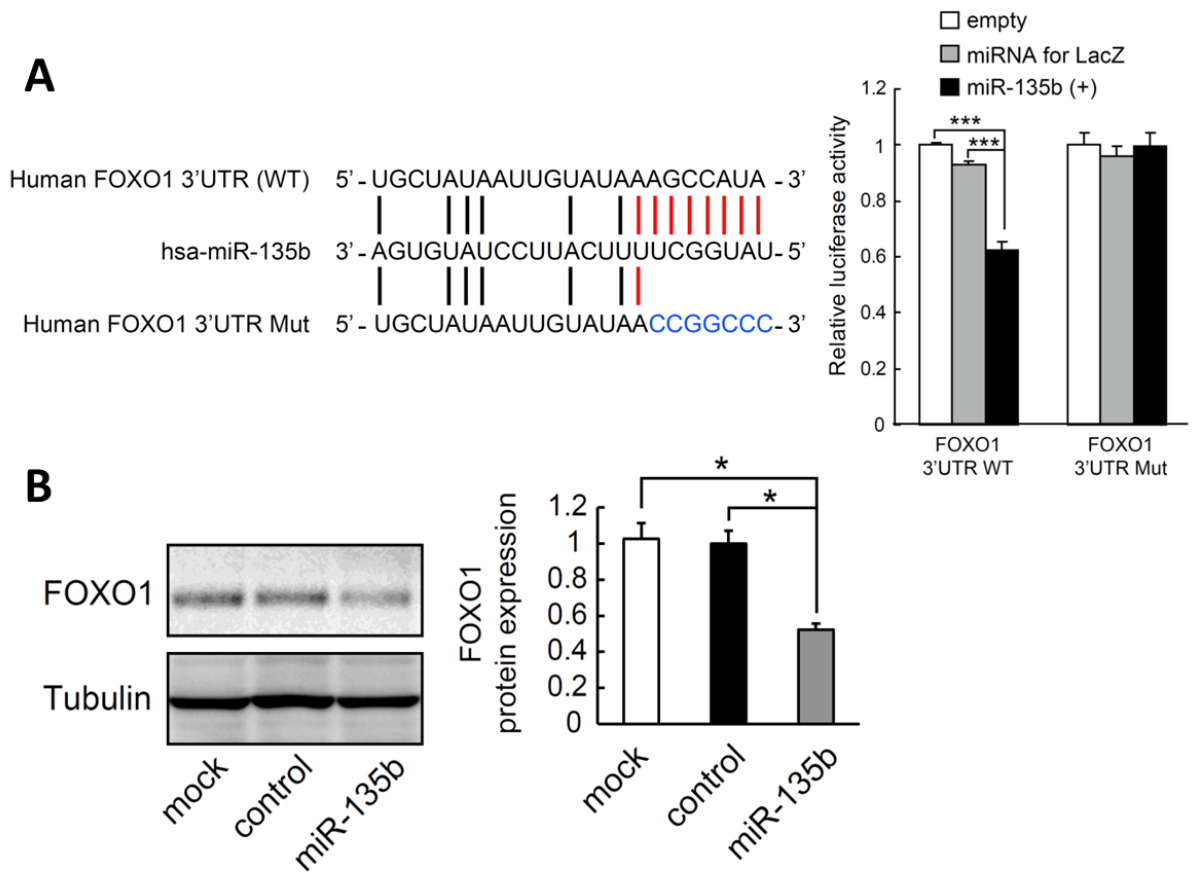


図 17. FOXO1 は miR-135b の新規標的遺伝子である

(A) miR-135b と FOXO1 の FOXO1 3'UTR 上の推定結合部位間の配列アラインメントを示す (左図)。また、標的部位に変異を導入した変異型 FOXO1 3'UTR との配列アラインメントも示す。HEK293T 細胞に、野生型もしくは変異型 FOXO1 3'UTR を含むルシフェラーゼレポーター、および empty ベクター、miRNA-lacZ 発現コントロールベクター (miRNA for lacZ)、または pri-miR-135b 発現ベクター [miR-135b (+)] を同時にトランスフェクションした。トランスフェクション 48 時間後にルシフェラーゼアッセイで評価した (***) $P < 0.001$ (右図)。

(B) miR-135b を一過性に導入した HeLa 細胞を用いて FOXO1 タンパク質発現量をウェスタンブロット解析で評価した (左図)。定量化した結果を右図に示す (* $P < 0.05$)。

Karpas 299 細胞では、miR-135b のノックダウンにより NPM-ALK の下流分子である STAT3, Erk, Akt のタンパク量およびリン酸化状態の大きな変化は認められなかった (図 18 C)。NPM-ALK は Akt の活性によって FOXO3a のリン酸化を促進することで

FOXO3a の活性を阻害することが報告されている (63)。今回の検討において、複数の ALCL 細胞株で FOXO1 およびその下流分子が miR-135b によって調節されていたことをあわせて考慮すると、NPM-ALK は幅広い FOXO ファミリータンパクの活性をタンパク修飾および転写後調節を介して制御している可能性が示唆された。

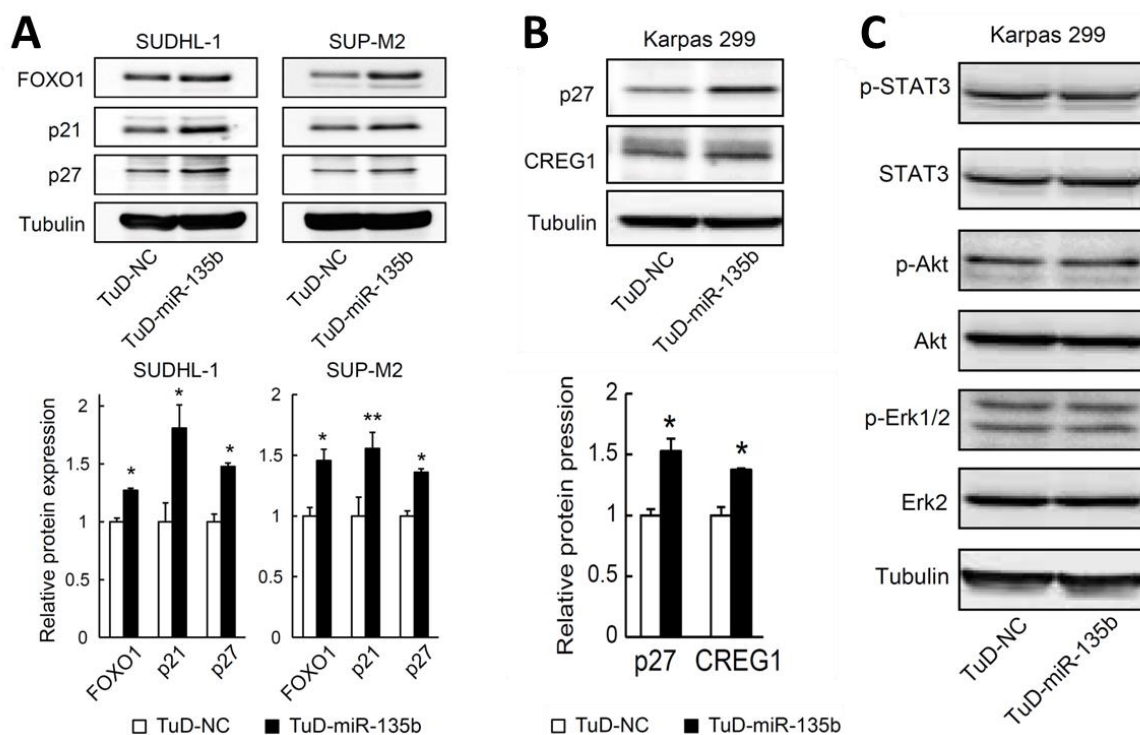


図 18. FOXO1 は ALCL 細胞株における miR-135b の内在性標的遺伝子である

- (A) レンチウイルスを用いて TuD-NC もしくは TuD-miR-135b を発現させた SUDHL-1 細胞と SUP-M2 細胞を用いて FOXO1, p21, もしくは p27 のタンパク質発現量をウエスタンブロット解析で評価した。定量化した結果を下図に示す (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)。
- (B) レンチウイルスを用いて TuD-NC もしくは TuD-miR-135b を発現させた Karpas 299 細胞を用いて, p27 と CREG1 のタンパク質発現量をウエスタンブロット解析で評価した。定量化した結果を下図に示す (* $P < 0.05$)。
- (C) レンチウイルスを用いて TuD-NC もしくは TuD-miR-135b を発現させた Karpas 299 細胞を用いて, STAT3, Akt, または Erk タンパク質の発現量と各リン酸化タンパク質の発現量をウエスタンブロット解析で評価した。

FOXO は DNA ダメージを含む様々なストレスに対する増殖抑制反応における主要なメディエーターであることから (64), 外因性 miR-135b 導入による FOXO1 のタンパク質発現量低下に伴う抗がん剤に対する反応性の変化を検討した。miR-135b 過剰発現は通常条件下における Jurkat 細胞の増殖能およびアポトーシスには影響を与えなかった一方で, Cytosine β -D-arabino-furanoside (AraC) に対する耐性を上昇させた (図 19)。これらの結果は, ALCL 細胞において miR-135b は FOXO1 の発現制御を介して薬剤耐性に寄与している可能性を示唆した。

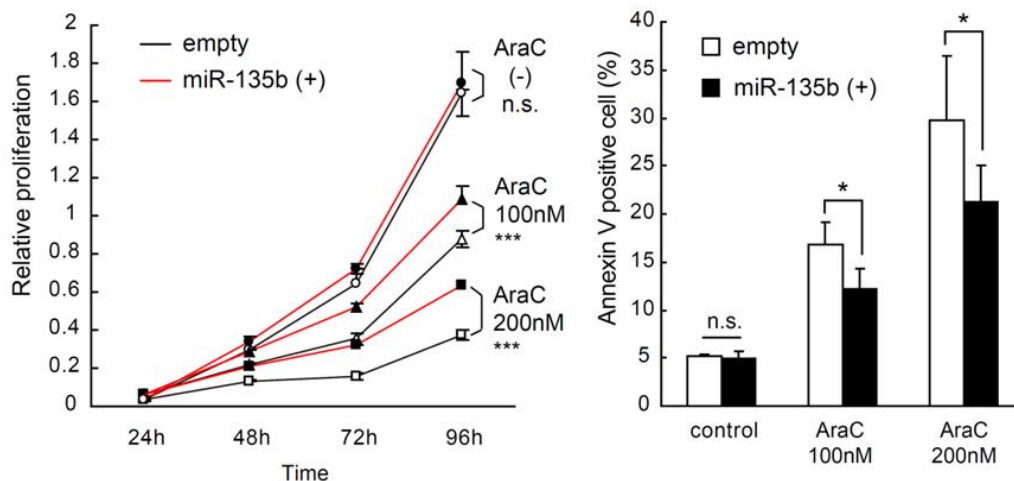


図 19. miR-135b による FOXO1 の発現制御を介した薬剤感受性の調節

レンチウイルスを用いて empty または pri-miR-135b ベクターを安定導入した Jurkat 細胞を Cytosine β -D-arabino-furanoside (AraC) 100 nM もしくは 200 nM で処理し, 細胞増殖 (左図) とアポトーシス (右図) を評価した (*P < 0.05; ***P < 0.001; n.s., not significant)。

4-4 miR-135b による Th2 調節因子 STAT6 および GATA3 の制御

これまでの報告で ALK キメラタンパク質の持続的活性化は細胞形質転換および ALK 陽性 ALCL 細胞の生存に不可欠であることが示されている (40)。また, ALCL の病態において, 遺伝子発現プロファイルによる研究により, ALK は再現性のあるトランスクリプトームの変化をもたらすことが報告されている (54)。NPM-ALK により誘導される遺伝子発現の変化と miR-135b による遺伝子発現の変化の全体的な関連性を検討するために, 既報における shRNA を用いて NPM-ALK の発現を抑制した場合としない場合の 2 通りの ALCL 細胞の遺伝子発現プロファイルの比較データについて, miR-135b の予測標的遺伝子セットを用いた gene set enrichment analysis (GSEA) を行った (54, 58)。GSEA により NPM-ALK の抑制により miR-135b の予測標的遺伝子群の発現が全体として上昇する傾向を示すことを見出した。これは, miR-135b が NPM-ALK の下流で活性化し, その標的を全体的に抑制していることを示唆している (図 20)。この解析により新たに TGFBR1, SIRT1, cyclin G2, CREG1, BCL11B, および STAT6 が NPM-ALK/miR-135b 経路の標的候補として示唆された。

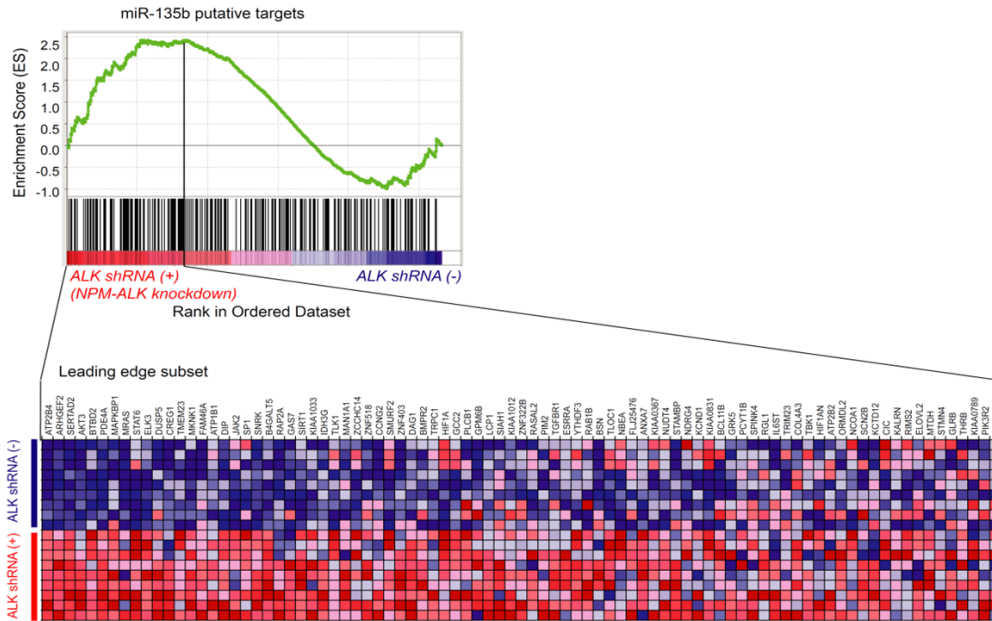


図 20. NPM-ALK 依存的な遺伝子発現変化と miR-135b 標的遺伝子の関係

マイクロアレイデータ (dataset GSE6184) を GSEA を用いて解析した。NPM-ALK を knockdown した際の miR-135b 標的遺伝子群の全体的な変化を示す。NPM-ALK を knockdown した際に発現上昇する代表的な miR-135b 標的遺伝子に TGFBR1, SIRT1, cyclin G2, CREG1, BCL11B, および STAT6 などが含まれる。

T リンパ球を起源とする ALCL は、T 細胞の表現型を有するか、あるいは、正常リンパ球に対応するはっきりした表現型を示さない、さらに、T 細胞受容体の再構成が生じているにもかかわらず CD3εや ZAP70 などの T 細胞受容体複合体関連因子の発現が認められないといった特徴を有することが知られている (48)。図 21 に示すように、ALCL の遺伝子発現プロファイル解析でも実際に CD3εや ZAP70 などの発現低下がみられる (57)。一方で、ALCL を含む PTCL における最近の遺伝子発現プロファイル解析により、ALCL 細胞が Th17 細胞関連分子 (IL-17A, IL-17F, および retinoic acid-related orphan receptor [ROR]) の高発現、GATA3 の低発現、および T 細胞受容体複合

体関連因子の発現低下などの特徴をもつことが報告されている (57)。Th17 細胞関連分子の高発現は、IL-17 を産生するヘルパーT 細胞の一種である Th17 細胞と ALCL 細胞の免疫学表現型の類似性を示唆する。これらの特徴的な遺伝子発現パターンを既報における PTCL の遺伝子発現プロファイルの結果を再解析し、図 21 にまとめた。

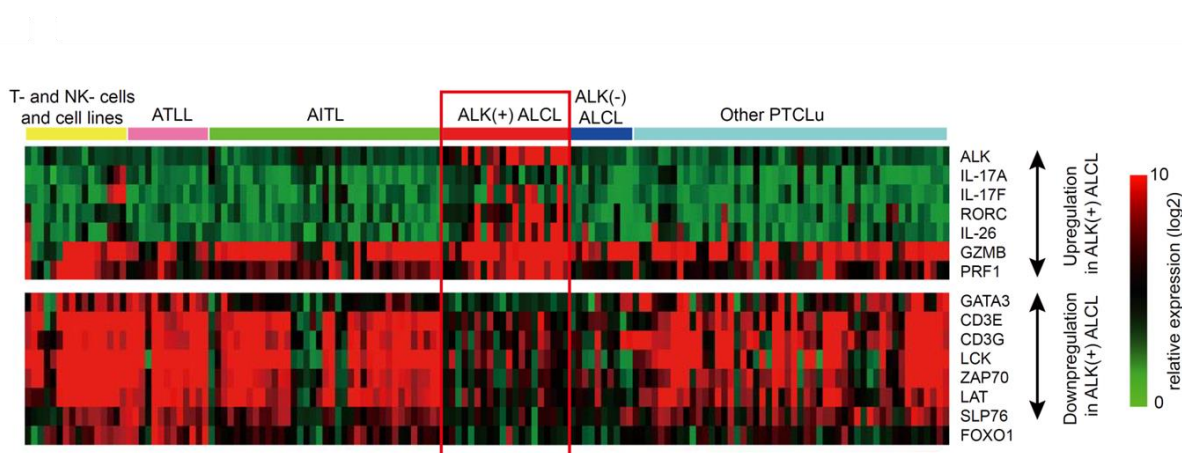


図 21. 末梢性 T 細胞リンパ腫における Th17 関連分子、GATA3、FOXO1、および他の ALCL 関連遺伝子 (GZMB、PRF1、および TCR 関連遺伝子) の発現

末梢性 T 細胞リンパ腫における Th17 関連分子、GATA3、FOXO1、および他の ALCL 関連遺伝子 (GZMB、PRF1、および TCR 関連遺伝子) の発現を Heatmap を用いて示した。遺伝子発現のデータセットは GSE19069 を用いた。ATLL: adult T-cell leukemia/lymphoma (成人 T 細胞白血病リンパ腫)、AITL: angioimmunoblastic T-cell lymphoma (血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫)、PTCLu: peripheral T-cell lymphoma -unclassifiable (末梢性 T 細胞性リンパ腫-非特異型)。

ヘルパーT細胞のそれぞれのサブセットへの分化は他のサブセットへの分化に対して抑制的に働くことが知られている。例えば、Th1 細胞と Th2 細胞への分化過程は Th17 細胞への分化と拮抗すること、Th2 細胞分化のマスター制御因子である GATA3 は Th17 細胞への分化を抑制することが示されている (65)。そこで、miR-135b の *in silico* 標的予想を再評価したところ、miR-135b の潜在的な標的に GATA3 と STAT6 と

いう 2 つの Th2 マスター制御因子が含まれていることが明らかになった (図 22 A)。

GSEA の結果も STAT6 が miR-135b の標的である可能性を示唆していた (図 20)。これらの知見から、次のような仮説を立てた。先に述べたように ALCL 細胞が、T 細胞受容体複合体関連因子の発現低下などに加えて、Th17 細胞関連分子 (IL-17A, IL-17F, および ROR γ) の高発現や GATA3 の低発現といった Th17 細胞の免疫学的表現型との類似性を示すことが報告されており (57)、さらに、Th1 細胞と Th2 細胞のエフェクターサイトカイン (IFN- γ と IL-4) は Th17 細胞への分化と拮抗し (65)、GATA3 と T-bet は Th17 への分化を抑制することが報告されている (66, 67)。そこで、miR-135b が転写因子 GATA3 や STAT6 によって制御される Th2 細胞への分化を司る転写プログラムを抑制することで、ALCL 細胞を Th17 細胞に類似した免疫学的表現型に方向付けるという仮説を立てた (図 23)。この仮説を検証するために、まず GATA3 や STAT6 が miR-135b の内在性の標的であるかについて検討した。3' UTR ルシフェラーゼレポーターアッセイにより miR-135b が STAT6 と GATA3 両方の 3' UTR を標的としていることを明らかとした (図 22 B)。さらに、STAT6 と GATA3 の 3' UTR の miR-135b 標的部位に変異を導入したところ、miR-135b の各 3' UTR への抑制効果が減弱した (図 22 B)。これは、miR-135b と STAT6 および GATA3 の 3' UTR との直接的な相互作用 (結合) を示唆している。さらに、Karpas 299 細胞、SUDHL-1 細胞、SUP-M2 細胞の 3 種の ALCL 細胞株すべてにおいて miR-135b の抑制により実際に STAT6 および GATA3

のタンパク質発現量が上昇したことから、STAT6 および GATA3 は ALCL 細胞における miR-135b の内在性の標的であることが明らかとなった (図 24)。

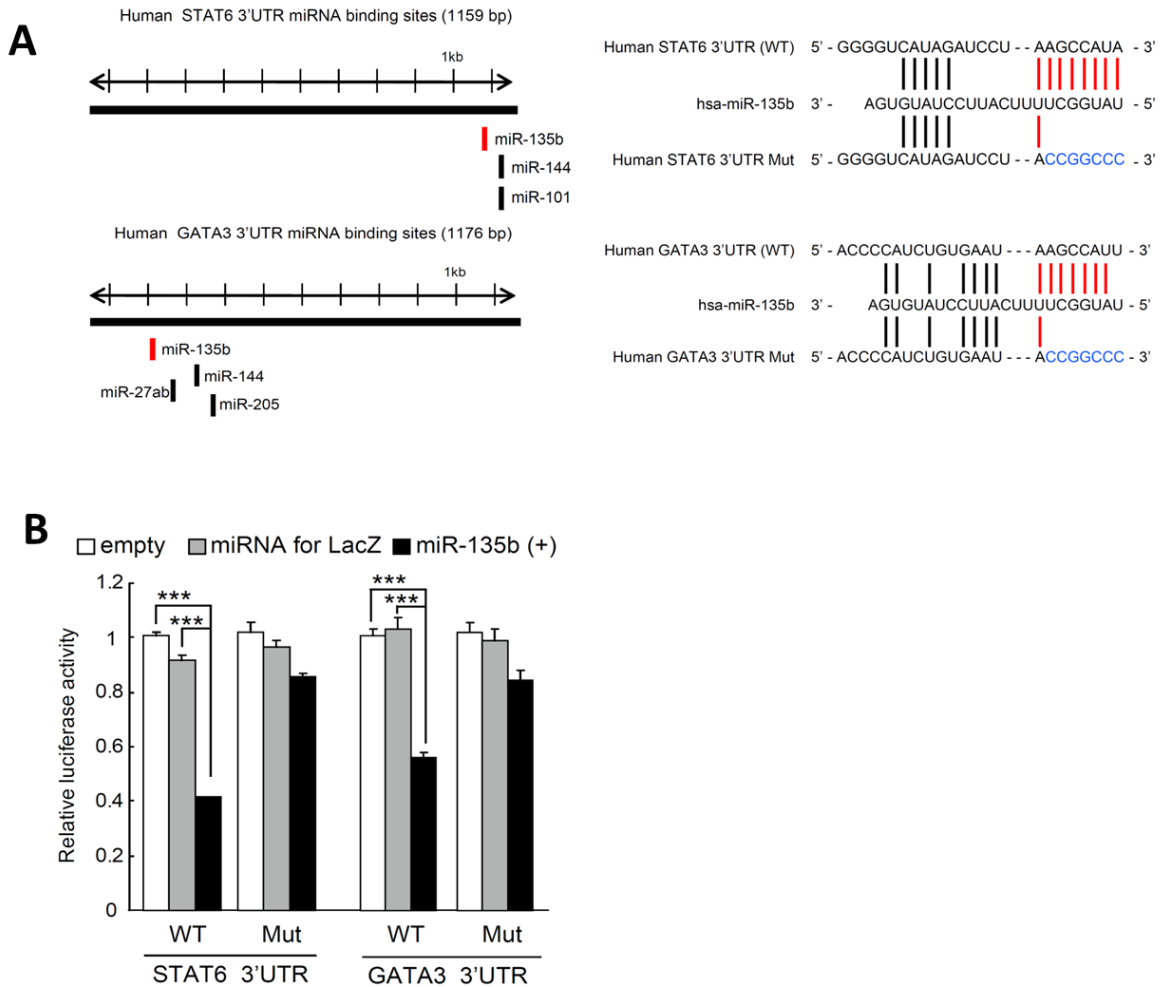


図 22. miR-135b による STAT6 および GATA3 の 3' UTR の制御

(A) 左図は STAT6 および GATA3 の 3' UTR における miRNA の標的部位を示す。右図は miR-135b と miR-135b の STAT6 および GATA3 の 3' UTR 上における推定結合部位間の配列アラインメントを示す。また、標的部位に変異を導入した変異型 3' UTR との配列アラインメントも示す。

(B) HEK293T 細胞に、STAT6 または GATA3 の野生型もしくは変異型 3' UTR (パネル A 参照) を含むルシフェラーゼレポーター、および empty ベクター、miRNA-lacZ 発現コントロールベクター (miRNA for lacZ)、または pri-miR-135b 発現ベクター [miR-135b (+)] を同時にトランスフェクションした。トランスフェクション 48 時間後にルシフェラーゼアッセイで評価した (**P < 0.001)。

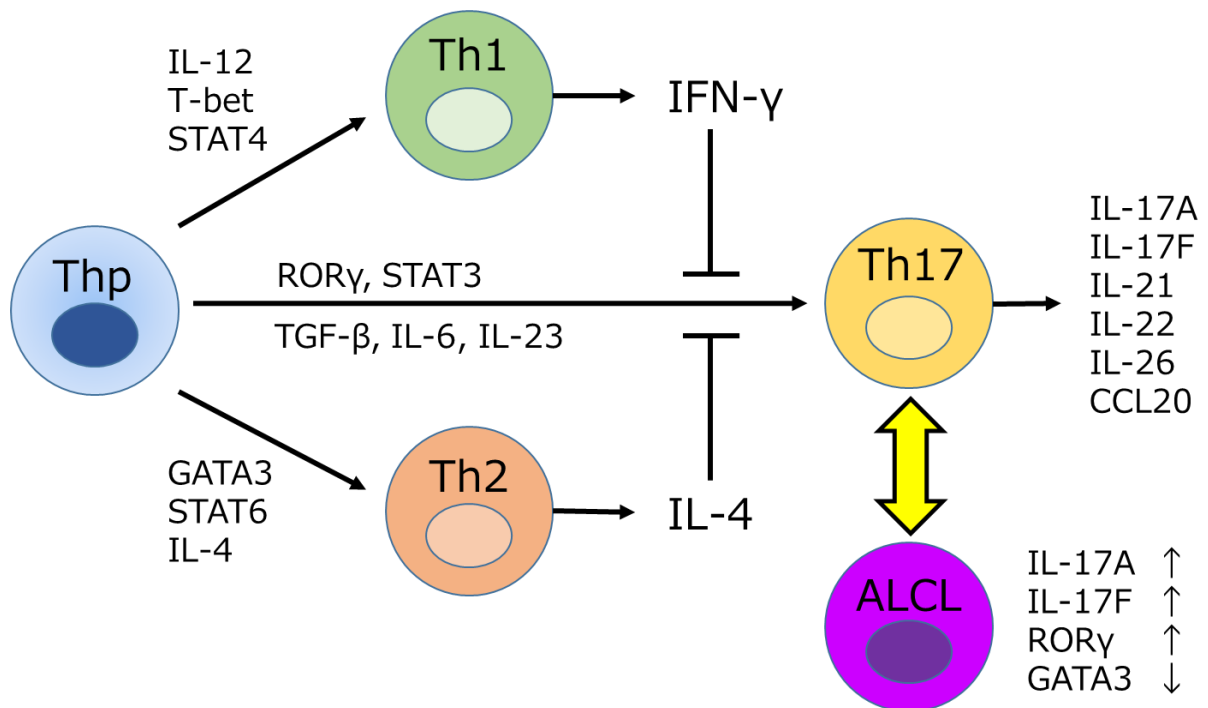


図 23. STAT6 と GATA3 によるヘルパーT 細胞の分化制御と ALCL 細胞の免疫学的表現型の関係に関する仮説

図は、ALCL 細胞の免疫学的表現型とヘルパーT 細胞の分化制御における GATA3 と STAT6 の役割との関係性を示す。IL-4-STAT6 経路と GATA3 は正常リンパ球の Th2 細胞への分化において非常に重要な働きを持つこと、Th1 細胞と Th2 細胞のエフェクターサイトカイン (IFN- γ と IL-4) は Th17 細胞への分化と拮抗し、GATA3 と T-bet は Th17 への分化を抑制することが報告されている。さらに、ALCL 細胞は Th17 関連遺伝子の発現上昇および GATA3 の発現減少といった Th17 細胞の免疫学的表現型と類似性を示すことが報告されている。これらの知見に基づき、miR-135b が転写因子 GATA3 や STAT6 によって制御される Th2 細胞への分化を司る転写プログラムを抑制することで、ALCL 細胞を Th17 細胞に類似した免疫学的表現型に方向付けるという仮説を立てた。

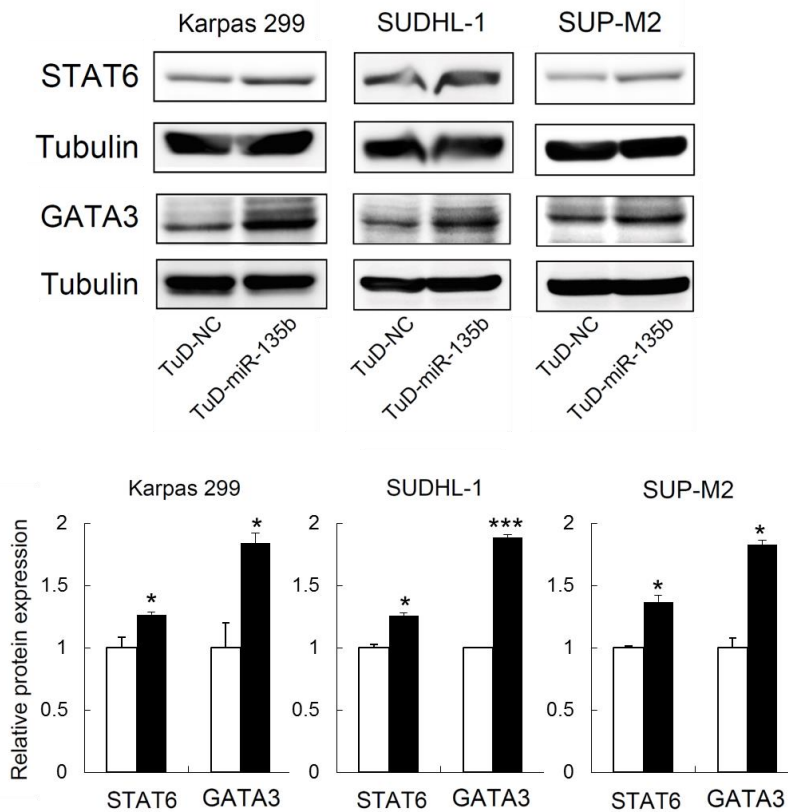


図 24. ALCL における miR-135b による STAT6 および GATA3 の制御

TuD RNA により miR-135b を抑制した ALCL 細胞株 (Karpas 299 細胞, SUDHL-1 細胞, および SUP-M2 細胞) における STAT6 と GATA3 のタンパク質発現をウェスタンブロットにより評価した。下図はイムノブロットを定量化したグラフを示す (* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$)。

4-5 ALCL 細胞における miR-135b による IL-17 の産生調節

IL-4-STAT6 経路と GATA3 は正常リンパ球の Th2 細胞への分化において非常に重要な働きを持つことが知られている (68)。正常リンパ球の分化において、細胞系譜に特異的な転写因子は分化を活性化することも抑制することもできることが報告されている (66, 69)。実際 GATA3 は Th2 細胞への分化を促進すると同時に Th1 細胞への分化を抑制し、一方で Th1 制御因子の T-bet はこの GATA3 とは反対の作用を有してい

る (68)。これに近い関係性が Th1/Th2 細胞への分化過程と Th17 細胞への分化過程の間にも存在している。先述した通り、Th1 細胞と Th2 細胞のエフェクターサイトカイン (IFN- γ と IL-4) は Th17 細胞への分化と拮抗し (65)、GATA3 と T-bet は Th17 への分化を抑制することが報告されている (66, 67)。GATA3 と STAT6 が miR-135b の内在性の標的であることが明らかとなったため、次に立てた仮説 (図 23) に則り、miR-135b の抑制が Th17 関連分子の発現に与える影響を検討した。ALCL 細胞株の Karpas 299 細胞では内因性の IL-17 の発現が認められるが、TuD RNA システムを用いて miR-135b を抑制することでそのうちの IL-17A と IL-17F の転写産物の発現レベルが減弱した (図 25 A)。これは GATA3 による Th17 細胞への分化抑制と合致する結果であった (67)。同時に、miR-135b の阻害は Th17 への分化の重要な制御因子として同定された I κ B ζ の発現も抑制したが (70)、ROR α 、ROR γ 、および aryl hydrocarbon receptor (AHR) の発現量には影響がなかった (図 25 A)。また、miR-135b の抑制により炎症性サイトカインである IL-6 および IL-8 の発現量低下も認められた (図 25 B)。さらに、IL-17F の産生を ELISA を用いて測定したところ、miR-135b の抑制は Karpas 299 細胞における IL-17F の産生を抑制することも明らかになった (図 26)。これらの結果から、GATA3 および STAT6 を抑制することによって NPM-ALK/STAT3/miR-135b 経路は ALCL 細胞が Th17 細胞に似た IL-17 産生性免疫学的表現型を有するように方向付けを行っている可能性が示された。加えて、IL-21、IL-23、TGF- β 1 の発現については

影響が認められなかったが、ALCL 細胞で高発現している細胞傷害性分子である granzyme B と perforin 1 (57) の発現が miR-135b のノックダウンにより抑制されたことから (図 27), miR-135b は ALCL の免疫学的表現型に対して幅広く影響を与えていることが示唆された。

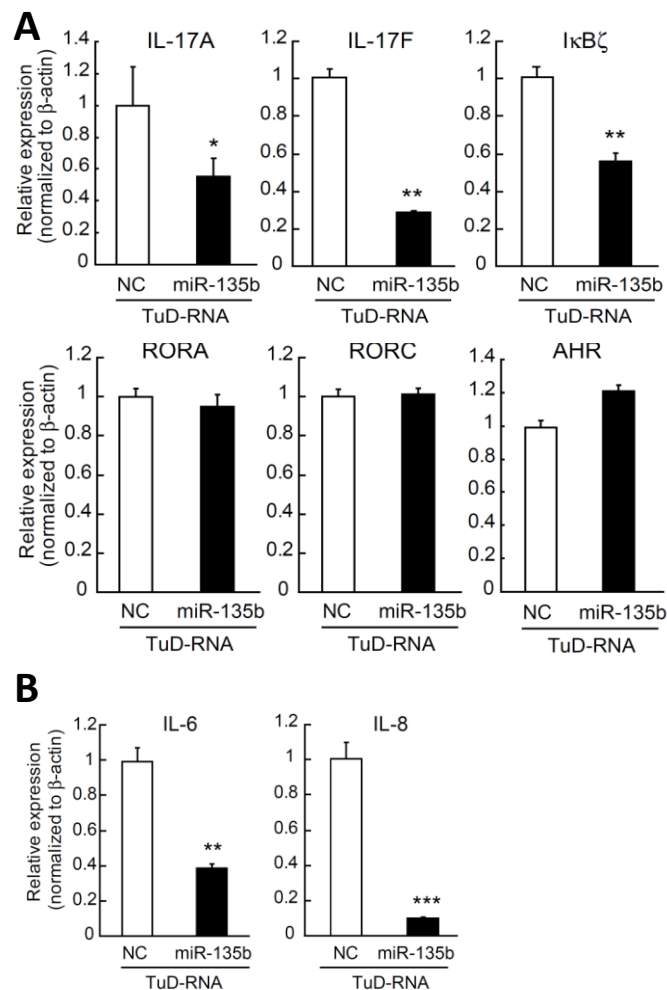


図 25. miR-135b 阻害による IL-17 産生の抑制および ALCL 免疫学的表現型の修飾

(A) レンチウイルスを用いて TuD-NC もしくは TuD-miR-135b を発現させた Karpas 299 細胞を用いて、Th17 関連分子の発現量を qRT-PCR を用いて解析した (*P < 0.05; **P < 0.01)。

(B) パネル A と同サンプルを用いて IL-6 と IL-8 の発現量を qRT-PCR を用いて解析した (**P < 0.01; ***P < 0.001)。

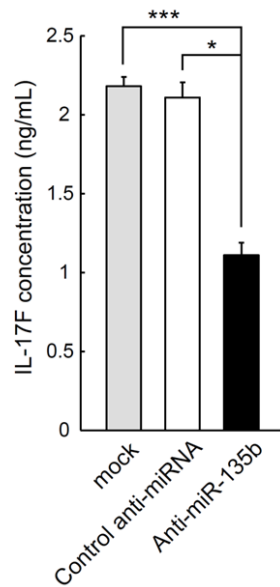


図 26. ELISA による IL-17F 産生量の検討

Control anti-miRNA もしくは anti-miR-135b オリゴヌクレオドリオをトランスフェクションした Karpas 299 細胞の上清中の IL-17F の産生量を ELISA を用いて測定した (* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$)。

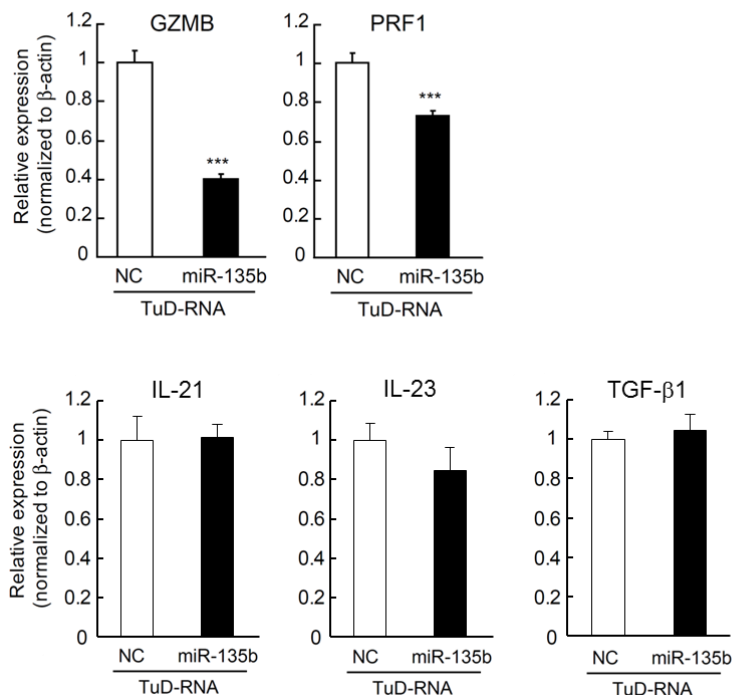


図 27. miR-135b による細胞傷害性分子の制御

図 25 A と同サンプルを用いて granzyme B (GZMB), perforin 1 (PRF1), IL-21, IL-23, および TGF-β1 の発現量を qRT-PCR を用いて解析した (** $P < 0.001$)。

4-6 miR-135b による ALCL の傍分泌型炎症反応と造腫瘍性の調節

IL-17 は線維芽細胞, 内皮細胞, および好中球などの多くの種類の細胞からの様々な炎症性サイトカイン (例: IL-1 β , IL-6, IL-8, G-CSF, および GM-CSF) やケモカイン (例: CCL2, CCL7, CCL20, CXCL1, および CXCL2) の産生を刺激する炎症惹起性サイトカインであり, 自己免疫疾患に関与すると考えられている (71)。がんにおける IL-17 の重要性は未だ未解明な点が多く, またその重要性はがんの種類などに依存する可能性がある一方で, いくつかの研究において IL-17 による炎症促進および血管新生誘導ががんの促進に関与しているとの報告がある (72-75)。これらの報告の一つで, IL-17 は血管新生を促進するケモカインである CXCL1 および CXCL5 の産生を増強することが示されている (75)。そこで, 続いて ALCL におけるがんの進展への miR-135b の役割を検討した。

まず, Karpas 299 細胞と WI-38 ヒト線維芽細胞を非接触的に共培養することにより, Karpas 299 細胞との共培養が線維芽細胞の炎症性サイトカインおよびケモカインの産生能にどのように影響を与えるかを, Jurkat 細胞との比較, miR-135b の抑制を組み合わせることで検討した。この共培養の検討により, Karpas 299 細胞との共培養が, 共培養しない条件および Jurkat 細胞との共培養に比べて, WI-38 ヒト線維芽細胞における炎症促進性サイトカイン (IL-1 β , IL-6, および IL-8) とケモカイン (CCL2, CCL7, CCL20, および CXCL1/2) の産生を増強させること, かつその誘導が miR-135b に依

存していることが明らかとなった (図 28)。この結果は、miR-135b が ALCL 細胞による傍分泌型の炎症反応に関与していることを強く示唆している。

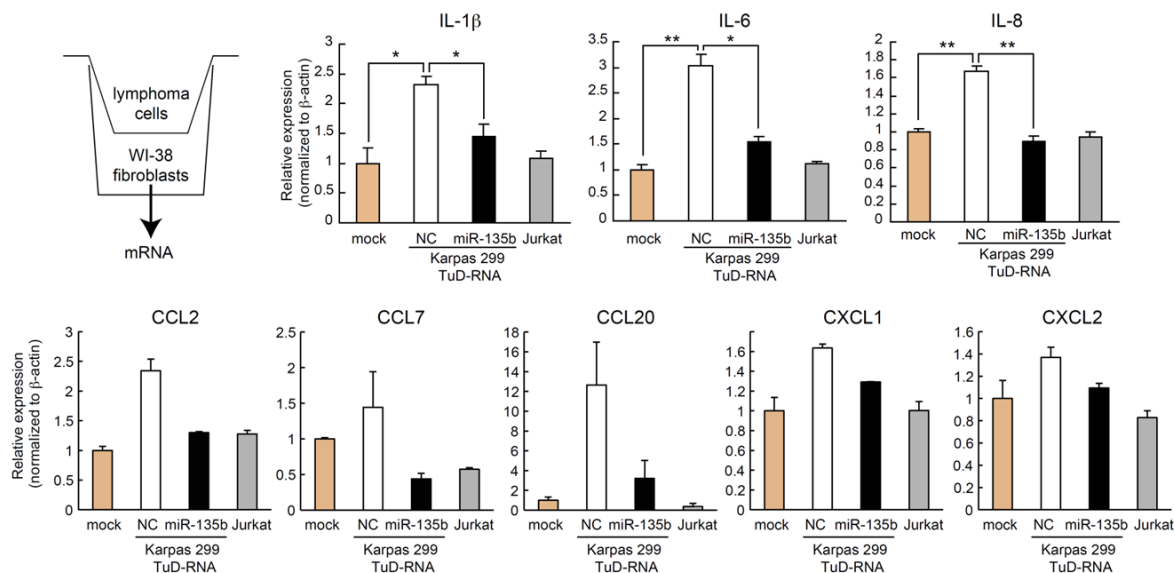


図 28. miR-135b は ALCL 細胞の傍分泌型炎症反応を促進する

Karpas 299 細胞または Jurkat 細胞と共培養した WI-38 ヒト線維芽細胞の炎症誘導性サイトカイン (IL-1β, IL-6, および IL-8) とケモカイン (CCL2, CCL7, CCL20, CXCL1, および CXCL2) の発現量を qRT-PCR を用いて解析した (*P < 0.05; **P < 0.01)。

次に、*in vivo* における ALCL の腫瘍形成能に対する miR-135b の役割についても検討した。異種移植モデルにおいて、Locked nucleic acids (LNA) を用いた miR-135b のアンチセンスオリゴヌクレオチドをアテロコラーゲンとともに局所投与することで Karpas 299 の皮下腫瘍の増殖が抑制された (図 29 A)。さらに、この miR-135b アンチセンスオリゴヌクレオチドによる腫瘍増殖の阻害は同時に腫瘍の血管新生の減少も伴っていた (図 29 B)。これらの結果は miR-135b による傍分泌型炎症反応の調節が微小環境をがんにとって有利な方向へと変化させていることを示唆しており、さらに

miR-135b により調節されるこのがん微小環境の変化は治療の標的となる可能性が示唆された。

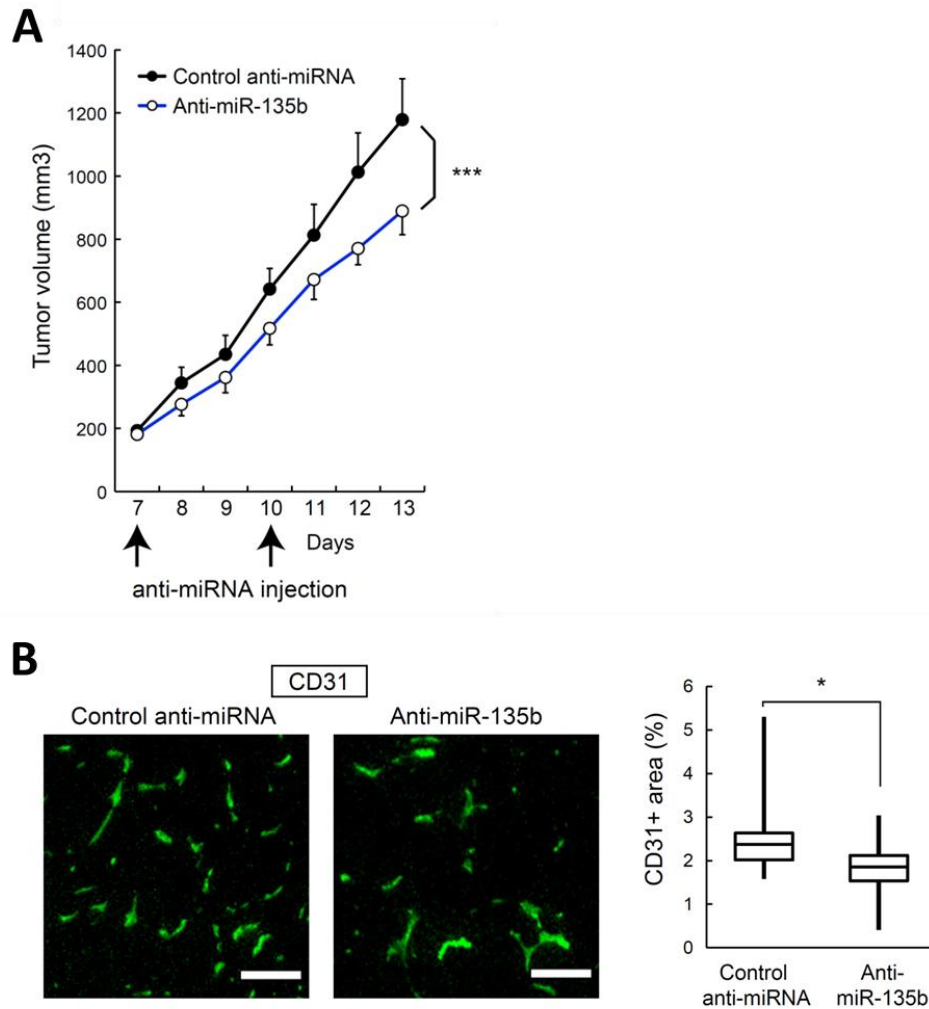


図 29. miR-135b による ALCL 細胞の造腫瘍性の調節

(A) SCID マウスの皮下に移植した Karpas 299 細胞の増殖曲線を示す。移植後 7 日目に無作為に群分けを行い (n=6/群), 移植後 7 日目と 10 日目にアテロコラーゲンとともに LNA ベースのアンチセンスオリゴヌクレオチド (5 M) を腫瘍周辺の皮下に投与した。移植後 7 日目から 13 日目まで皮下腫瘍の長径と短径を測定し, 腫瘍体積を算出した (平均値 ± 標準誤差, ***P < 0.001)。

(B) 腫瘍の血管新生に対する miR-135b 阻害の影響を示す。腫瘍の CD31 免疫染色像 (左図) と CD31 陽性部分の定量化結果 (右図) を示す。画素密度は ImageJ.36b ソフトウェアを用いて, 各群 6 匹の腫瘍の複数イメージより数値化した。スケールバーは 100 μm を表す (*P < 0.05)。

5. 考察

5-1 ALK 陽性 ALCL における miRNA の機能異常

本研究において、私は ALK 陽性 ALCL において NPM-ALK の主要な下流シグナル経路の一つにあたる STAT3 経路が miR-135b および LEMD1 の発現を誘導していることを明らかにした (図 30)。肺がんでは miR-135b の発現が NF- κ B により制御されていることが報告されているが (76), ALK 陽性 ALCL においては NF- κ B の活性が抑制されているともいわれており (77), miR-135b の発現調節機構はがん種特異的なものであることが推察される。これまでの報告において miR-135b は胚性幹細胞および大腸がんと前立腺がんを含む他のがん種で高発現していることが示されている (61, 78, 79)。STAT3 が胚性幹細胞での必須の役割をもつことおよびがん化において中心的な機能を持つことを考慮すると (80), STAT3/miR-135b 経路は胚性幹細胞や上記のがんにおいて幅広く機能している可能性が示唆される。実際に、大腸がんでは miR-135b は APC を標的とし、その発現を抑制することで下流の Wnt シグナル経路を活性化させることなどが示されている (61)。さらに、非小細胞性肺がんでは miR-135b はがん抑制遺伝子である LZTS1, Hippo 経路に属する LATS2, β -TrCP および NDR2 の発現を抑制し、非小細胞性肺がんの進展に関与するとともに、miR-135b 高発現群では低発現群と比較して全生存期間の短縮がみられることが報告されている (76)。また、本研究

において ALK の異常を持つ肺がんおよび神経芽腫の細胞株における miR-135b の発現レベルを測定したところ (図 11), 神経芽腫においては測定したすべての細胞株で miR-135b の発現は非常に低いものであった。ALK の異常を有する細胞株を含む様々な神経芽腫の細胞株において STAT3 の恒常的活性化はみられないことが報告されており (81), このことによって神経芽腫の細胞株における miR-135b の低発現が部分的に説明できるかもしれない。また, 神経芽腫で発現している ALK に結合する膜タンパク質 Flotillin-1 が ALK と下流シグナルを抑制しているという報告もあり (82), このような調節因子ががん種特異的な ALK の下流シグナルの制御に関与している可能性もある。一方で, 肺がんにおいては, EML4-ALK 融合遺伝子を有する H2228 肺腺がん細胞である程度の miR-135b の発現が認められた。H2228 肺腺がん細胞ではその下流で STAT3 が活性化していることが知られており (83), これが miR-135b の発現に関与している可能性も考えられるが, ALCL と比較すると miR-135b の発現量が低い点を含めてがん種特異的な発現調節機構がある可能性があり, より詳細な検討が必要である。さらに, ALK に変異を有する他のがん種における病態形成への miR-135b の関与も今後の検討が必要であると考えられる。

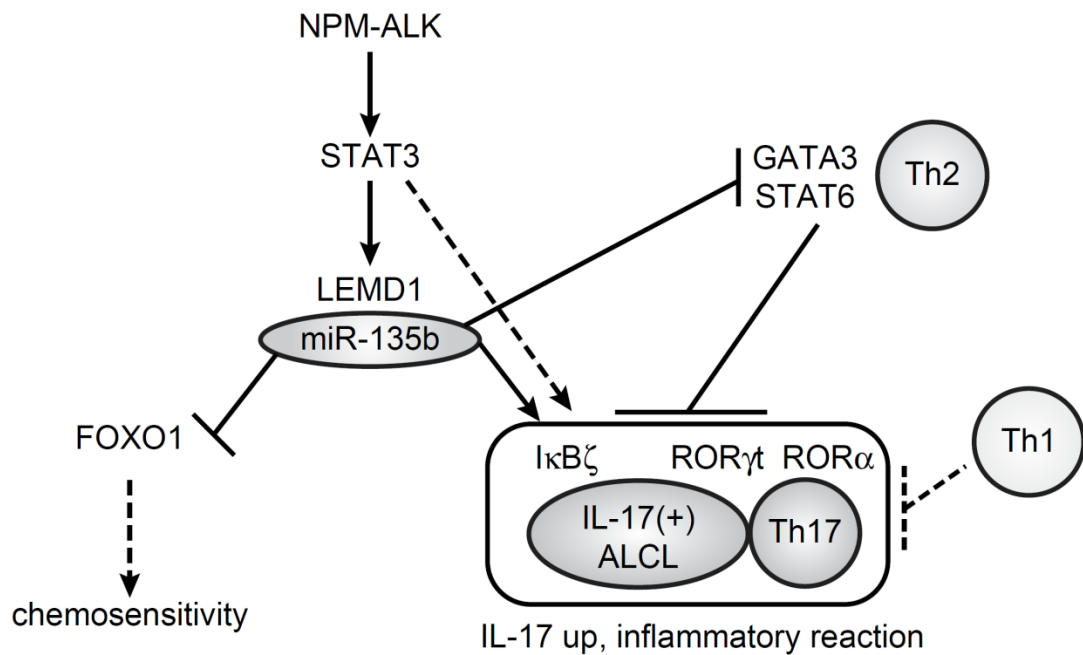


図 30. ALCL の病態形成における miR-135b の役割

ALCL において NPM-ALK は STAT3 を介して LEMD1 と miR-135b の発現を誘導する。miR-135b は FOXO1 および 2 つの Th2 マスター調節因子である GATA3 と STAT6 を標的として、その発現を抑制する。FOXO1 の抑制により、ALCL の抗がん剤に対する薬剤感受性が調節される。GATA3 および STAT6 の抑制は、ALCL の IL-17 産生性免疫学的表現型の確立に関与していると考えられる。

miR-135b は宿主遺伝子 LEMD1 の第一イントロンに存在しており、miR-135b のがん化における役割は宿主遺伝子の LEMD1 の発現上昇と密接に関係しているかもしれない。例として、LEMD1 は cancer/testis antigen 50 としても知られており、miR-135b の高発現がしばしばみられる大腸がんにおいて LEMD1 の高発現や LEMD1 をコードする 1q32.1 のコピー数の上昇がみられることが報告されている (84, 85, 86)。これらの知見は、がんにおいて miR-135b と LEMD1 の発現上昇が密接に関係している可能性を示唆している。一方で、先述した NF-κB により miR-135b の発現が誘導さ

れる肺がんにおいては、LEMD1 の発現についての報告がなく (76), miR-135b と LEMD1 の発現量ががん種によらず関係性を持つかは今後の検討が必要である。また, LEMD1 自体の生物学的な機能はほとんど解明されていないが, 口腔扁平上皮がんにおいて LEMD1 の高発現が腫瘍進行や予後不良と相関すること, およびそのノックダウンによって浸潤能が低下することが報告されている (87)。ALCL における LEMD1 自体の機能は不明ではあるが, LEMD1 も miR-135b と同様に NPM-ALK によるがん化に関与しているかもしれない。

NPM-ALK 下流の PI3K/Akt 経路と FOXO3a 活性の阻害との関連性を示した他の報告から考察すると (63), NPM-ALK は自身により誘導されるがん化ストレスにより主要な腫瘍抑制経路が活性化されることを防ぐために, miRNA をはじめとした noncoding RNAs を含む多くの因子を利用しているのかもしれない。実際, miR-135b 以外の多くの miRNA が ALK 陽性 ALCL で発現が変動していることがその後のいくつかの研究により報告されている。まず, miR-135b 同様に ALK 陽性 ALCL で発現が上昇している miRNA として, miR-17-92 および miR-203 が報告されている (88-90)。前者は STAT3 を介して BIM を標的とし抗アポトーシスに, 後者は SOCS3 を標的とし, STAT シグナル経路の増幅に関与していると考えられる。逆に, ALK 陽性 ALCL で発現が減少している主な miRNA として, miR-16, miR-26a, miR-29a, miR-101, miR-150, miR-219, および miR-96 が報告されている (52, 91-96)。これらの miRNA の標的は

VEGF, inducible nitric oxide synthase (iNOS), myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1), mammalian target of rapamycin (mTOR), MYB, inducible T-cell co-stimulator (ICOS, 別名 CD278), および ALK であり, これらの miRNA はがんの増殖・生存に関与する因子およびがん微小環境の関連因子を調節し, また ALK 自身の発現抑制を回避させることで, がんの形成・進展・維持・転移に寄与していると考えられる。

5-2 ALK 陽性 ALCL における miR-135b のがんとがん微小環境の制御

NPM-ALK は STAT3, Ras-Erk, および PI3K などの様々な下流のシグナル経路を介して, ALCL 細胞の悪性形質転換を調節している一方で, 今回の研究は ALCL の病態形成において NPM-ALK の下流で miR-135b が FOXO1 を標的としたがん促進性作用をもつことを明らかとした (図 30)。内在性 miR-135b の機能を抑制する TuD RNA システムを導入することにより, miR-135b の抑制によって FOXO1 の発現が上昇し, かつその下流の p21 または p27 の発現が増加することを明らかにした。miR-135b の抑制によって *in vitro* で p27 の上昇が認められた Karpas 299 細胞において, 明らかな G1 arrest または sub G1 の増加などの細胞周期への影響は認められなかった。ただし, *in vivo* においては miR-135b 阻害により Karpas 299 の造腫瘍性が抑制された一因に p27 の発現上昇が関与している可能性が考えられる。さらに, miR-135b の過剰発現により抗がん剤処理によるアポトーシスの誘導が抑制され, 抗がん剤感受性が減弱すること

を見出した。これらのことから NPM-ALK/STAT3/miR-135b/FOXO1 経路が、がん細胞の生存・増殖に寄与している可能性が示唆された。

さらに、GSEA と miRNA と標的 mRNA 間の相互作用を重み付けをつけて解析する手法である Functional Assignment of miRNAs via Enrichment (FAME) を組み合わせることにより、miRNA と mRNA 間の相互作用の *in silico* 推定フレームワーク (GSEA-FAME analysis) を構築し、これを用いて ALK 陽性 ALCL における miR-135b の標的を探索している (97, 98)。この結果、miR-135b が DNA 障害誘導に伴う p53 の脱リン酸化および安定化にかかわるプロテインフォスファターゼ 2A 調節性サブユニット B56 γ (PPP2R5C) を標的とし p53 を抑制することを見出している (97, 98)。この結果は FOXO1 のみならず PPP2R5C-p53 経路などの複数のがん抑制経路を制御することで、ALK 陽性 ALCL において miR-135b ががん促進性 miRNA としての作用を發揮していることを示唆するものである。

次に本研究において、私は miR-135b の興味深い免疫学的表現型の調節作用を明らかにした。NPM-ALK によって誘導される遺伝子発現パターンの変化と miR-135b の関係に注目し、miR-135b は Th2 細胞分化の主要調節因子である STAT6 と GATA3 が標的に含まれることを見出した。これまでに ALCL 細胞が、T 細胞受容体複合体関連因子の発現低下などに加えて、Th17 細胞関連分子 (IL-17A, IL-17F, および ROR γ) の高発現や GATA3 の低発現といった Th17 細胞の免疫学的表現型との類似性を示す

ことが報告されている (57)。さらに, Th1 細胞と Th2 細胞のエフェクターサイトカイン (IFN- γ と IL-4) は Th17 細胞への分化と拮抗し (65), GATA3 と T-bet は Th17 への分化を抑制することが報告されている (66, 67)。そこで, miR-135b が転写因子 GATA3 や STAT6 によって制御される Th2 細胞への分化を司る転写プログラムを抑制することで, ALCL 細胞を Th17 細胞に類似した免疫学的表現型に方向付けるという仮説を立てた (図 23)。実際, ALCL 細胞では Th17 細胞関連分子が miR-135b の阻害により発現が低下することおよび IL-17 産生が抑制されることを見出した。これらの結果は, miR-135b が ALK 陽性 ALCL 細胞を Th17 細胞様の免疫学的表現型へと誘導させる役割を持っている可能性を強く示唆している。ALK 陽性 ALCL は従来 T 細胞の表現型を有するか, 正常リンパ球に対応したはっきりした表現型を示さないと考えられてきた。ALCL では $\alpha\beta$ -TCR ヘテロダイマーや CD3 ϵ の発現減少がしばしばみられるが, これらの T 細胞表現型の消失は NPM-ALK シグナルによる変化により部分的に媒介されることが示されている (48)。一方, ALCL の正常カウンターパートは成熟した活性型の細胞傷害性 T 細胞であると想定されている。これは, ALCL は通常 CD8 陰性であり, CD4 は 70%の ALCL で陽性であるにも関わらず, TIA1, granzyme B, perforin 1 といった細胞傷害顆粒の関連分子の発現が認められるためである (45)。これらの特徴的な表現型に加えて, 多様な PTCL サブタイプを対象とした網羅的な遺伝子発現プロファイルの研究により, 血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫 (AITL), ALK 陰性 ALCL,

成人 T 細胞白血病 (ATLL), および末梢性 T 細胞性リンパ腫—非特異型 (PTCL-unclassifiable) などの他のリンパ腫サブタイプと比較して, ALCL は先述したように, Th17 細胞の免疫学的表現型と類似性を示す (57)。この特徴的な免疫学的表現型と合致して, 未治療の ALK 陽性 ALCL 患者の血清中では IL-17, IL-8, および IL-22 のレベルが上昇している一方で, 化学療法後に完全寛解した患者の血清中ではこれらのサイトカインが検出されなかったことが報告されている (99)。種々のリンパ腫の免疫学的表現型を決定する基礎的なメカニズムはそのほとんどが明らかとなっていないが, 本研究は NPM-ALK というドライバーがん遺伝子の異所性の発現によって誘発されるシグナルネットワークとその下流の miRNA が ALCL 細胞の異常な免疫学的表現型に寄与しているというユニークなメカニズムを明らかにした (図 30)。

リンパ腫の悪性化におけるがん微小環境の重要性はホジキンリンパ腫を含む B 細胞リンパ腫において詳細な研究がなされている (100)。IL-17 陽性細胞は PTCL-unclassifiable よりも AITL において頻繁に観察されること, および Th17 とマスト細胞の両方の細胞が AITL におけるリンパ腫に関連した炎症促進性の微小環境の形成に寄与していることが報告されている (101)。一方で, ALCL は自ら IL-17 を産生している点においてユニークであり, これにより ALCL はリンパ腫のサブタイプ間でも他と異なる臨床的特徴を有していると考えられる。IL-17 は好中球に対して強い作用をもつが, このことは, リンパ腫ではなく炎症性疾患として間違った診断が下されること

がある neutrophil-rich ALCL と称される ALCL の特殊なグループで広範囲な好中球の浸潤が認められることと関係しているかもしれない (102-104)。また、ALCL における B 症状の頻発もこの IL-17 産生性の免疫学的表現型と関係しているかもしれない。

本研究では、*in vivo* 担がんモデルにおいて、アンチセンスオリゴヌクレオチドの投与による miR-135b の阻害によって、腫瘍血管新生および増殖の抑制が認められた (図 29)。この腫瘍血管新生の抑制は、既報において IL-17 が血管新生誘導能を有している点と合致している (73, 74)。これまでの報告では IL-17 または Th17 細胞が状況依存的に腫瘍促進性と腫瘍抑制性の異なる機能を持ち得ることが提案されているが (71, 72), miR-135b 阻害による腫瘍抑制効果は IL-17 産生 ALCL 細胞の局所的な炎症促進能が血管新生の促進などを介して、ALCL 細胞に適したがん微小環境を作り出すことに寄与している可能性を示唆している。さらに、miR-135b の阻害による Karpas 299 細胞における p27 の発現上昇が *in vivo* での造腫瘍性の変化に影響を及ぼしている可能性も考えられる。薬剤耐性、cancer initiating 細胞の維持、および転移を含むがんに関連した様々なプロセスが miRNA の機能と関連性があることが明らかとなってきた (31)。本研究は、miR-135b によるリンパ腫細胞の免疫学的表現型の調節とそれに伴うがんとがん微小環境の変化という、これまでとは異なる miRNA の腫瘍の進展への寄与のメカニズムを浮き彫りにした。

数百の miRNA のうち、miR-326 が Th17 細胞分化の調節因子として同定されており、miR-326 は標的の ETS1 (v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1) の発現を調節することで Th17 分化を促進すると報告されている (105)。さらに、CD4 陽性 T 細胞において miR-155 が Th17 細胞への分化を促進させることも報告されている (106)。これは miR-155 が Th2 細胞分化のプロモーターである c-Maf を標的としているという報告と合致している (107)。本研究は、他のヘルパーT 細胞への分化を抑制することにより Th17 細胞への分化を制御しうる他の miRNA が存在しうることを示唆している。一般的に、ヘルパーT 細胞の分化において、細胞系列に特異的な転写因子およびサイトカインは他のヘルパーT 細胞サブセットへの分化に干渉する。正常リンパ球の分化とリンパ腫細胞表現型のメカニズムの違いについては十分に考慮する必要があるが、本研究は miRNA がヘルパーT 細胞の分化における制御機構に幅広く関与している可能性も示唆しているといえるだろう。例として、ALK 陽性 ALCL 細胞における miR-135b による GATA3 と STAT6 の抑制が Th17 関連分子の発現を誘導している可能性についての関連報告はなされていないが、miR-135b とほぼ同じ配列を有した miR-135a がマウスのアレルギー性鼻炎モデルにおいて Th1/Th2 バランスを制御することが 2014 年に報告されている (108)。この報告では、卵白アルブミンを用いたマウスのアレルギー性鼻炎モデルの鼻粘膜で GATA3 と IL-4 の発現上昇と miR-135a, T-bet, および IFN- γ の発現低下がみられること、そして外来性 miR-135a の投与

により鼻粘膜における GATA3 と IL-4 の発現低下と T-bet と IFN- γ の発現上昇が誘導され、卵白アルブミンに対する血中 IgE 濃度も低下することが報告されている。

本研究によって明らかになった STAT3/miR-135b/GATA3-STAT6 経路は、既に報告されている Th17 細胞への分化に対する Th1 細胞分化と Th2 細胞分化の抑制性の影響とは逆の方向性のメカニズムであり、これらのメカニズムが相互排他的にそれぞれの細胞の分化状態を確立・維持しているのかもしれない (65, 69)。

5-3 miRNA によるがん微小環境の調節

本研究で ALCL のがん微小環境における miRNA の役割が明らかになったが、さまざまな他の研究により、miRNA ががん細胞自体もしくは間質からのサイトカインやケモカインの産生を制御することでがん微小環境の形成に寄与していることが明らかとなってきている (109)。

がん細胞に対する miRNA の関与の一例として、乳がんにおいて、がん遺伝子である MYC と MYCN により誘導される miR-9 が E-cadherin を標的とすることで、がん細胞の浸潤性を亢進させることが報告されている (110)。この浸潤性の亢進は miR-9 により E-cadherin の発現が抑制されることで β -カテニンシグナルが活性化され、VEGF-A の発現上昇および腫瘍血管新生の活性化が誘導されることによると考えられている (110)。また、予後良好な luminal タイプ乳がんでは GATA3 の発現が高く、

GATA3 陽性細胞では転移が著しく減少することが知られているが、この現象は GATA3 による miR-29b の発現上昇を介して、miR-29b の標的である VEGF-A, Angiopoietin-like 4 (ANGPTL4), Matrix metalloproteinase (MMP) 9, および Lysyl oxidase (LOX) などの発現が抑制され、結果として血管新生、がん細胞の浸潤、および細胞外基質のリモデリングの低下というがん微小環境の修飾が起きるためであることが示唆されている (111)。GATA3 の発現が抑制されている ALK 陽性 ALCL においても miR-29b の発現低下が認められることから、GATA3/miR-29b 経路は様々ながん種において、がん微小環境の形成に関与しているかもしれない (109)。

次に、間質に対する miRNA の関与の一つにがん関連線維芽細胞 (CAF) への影響が複数報告されている (109)。卵巣がんにおいて、miR-31 と miR-214 の発現低下と miR-155 の発現上昇により正常線維芽細胞から CAF への可逆的な変換が起こっている可能性が示唆されている (112)。この変換により生じる CAF は特に miRNA リプログラミング CAF (miR-CAF) と称され、通常の CAF と協調して CCL5, CCL20, および IL-8 を多く産生し、腫瘍の進展に貢献していることが報告されている (112)。また、多くのがんで発現が抑制されているがん抑制遺伝子の PTEN (phosphatase and tensin homolog Deleted from Chromosome 10) の下流で miR-320 がそのがん抑制の働きの一端を担っていることが明らかとなっている (113)。すなわち、PTEN の発現低下・欠損により、miR-320 の発現が低下し、その標的である転写因子である ETS2 および MMP9

の発現が上昇することで、その下流の因子の活性化と、血管新生およびがん細胞の浸潤能の活性化が引き起こされることが報告されている (113)。

他にも、がん細胞と CAF の両方で発現の低下が認められる miRNA として、miR-15a および miR-16-1 が報告されている (114)。これまでに miR-15a と miR-16-1 は BCL-2 を標的とし、がん抑制的に働くことが報告されているが (33)、新たに FGF2 およびその受容体である FGFR1 を標的とし、がん細胞ならびに CAF の増殖・遊走を抑制することが明らかとされている (114)。すわなち、がん細胞のみならずがん微小環境に対して抑制的に働く miRNA が存在することが明らかとなっており、今後のより詳細な検討も期待されるところである。

5-4 miRNA を標的としたがん治療の可能性

本研究において *in vivo* における miR-135b の阻害が腫瘍増殖および血管新生を抑制したことから、新たな治療標的としての可能性が示唆される。近年、miRNA を標的とした薬剤の臨床試験が行われており、その中で対象疾患ががんである 2 つの臨床候補品として、MRX34 と Cobomarsen (MRG-106) が挙げられる (115, 116)。MRX34 はがん抑制性 miRNA である miR-34a をリポソームに内包したリポソーム製剤であり、進行性肝細胞がん患者を対象に第一相試験が行われた。2013 年より臨床試験が開始されたが、残念ながら 2016 年に副作用が原因で開発中止となっている。副作用とし

では、グレード4のサイトカイン放出症候群などの免疫関連の有害事象が報告されている。原因は明らかとなっていないが、リポソームによる全身投与（静脈内投与）であったことおよび標的が一つではないという miRNA の性質によるものが原因として疑われている。

Cobomarsen (MRG-106) は LNA ベースの miR-155 阻害剤であり、現在血液腫瘍を対象に第一相試験が行われている。miR-155 はがん促進性 miRNA の一つであり、多くのがん種でその発現量が高いことが知られており、今回対象疾患となっている血液がんにおいてはびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (diffuse large B-cell lymphoma) をはじめとした B 細胞リンパ腫において発現亢進が認められている (117)。in vivo において LNA ベースの miR-155 阻害剤が抗腫瘍効果を発揮することが報告されていることから (118)、今後の臨床試験の結果報告が待たれるところである。

がん以外での治療標的としての miRNA の利用として、miR-122 阻害剤の C 型肝炎治療への応用がある。miR-122 は肝臓で最も発現量の多い miRNA の一つであり、C 型肝炎ウイルス (HCV) の安定化と複製に必要であることが報告されている (119)。miR-122 阻害剤 (miravirsen) は現在第二相試験が行われており、投与用量依存的な血中のウイルス量の低下が認められている (120)。

以上のように、治療薬としての miRNA ベースの薬剤は未だ上市には至っていないが、現在もがんのみならず他の疾患も対象として臨床試験が進められている。臨床で

の効果の確度を上げるためには、多角的な面からの基礎試験が必要となってくることから、本研究の結果がその一端を担うことがあれば幸いである。

6. 結語

1. ALK 陽性 ALCL 細胞において、miR-135b は NPM-ALK/STAT3 経路によって発現が誘導されている。
2. miR-135b は FOXO1 を標的として、その下流の p21 および p27 の発現を低下させがん細胞の増殖に寄与するとともに、抗がん剤感受性を制御しがん細胞の生存に寄与している。
3. miR-135b は Th2 細胞分化の主要制御因子である GATA3 と STAT6 の発現の抑制を介して、ALK 陽性 ALCL 細胞の Th17 関連因子 (IL-17A, IL-17F, および I κ B ζ) の発現上昇に寄与し、ALK 陽性 ALCL の IL-17 産生性免疫学的表現型の形成に関与している。
4. miR-135b は IL-17 産生を介して、炎症性サイトカインおよびケモカインの産生を促し、がん微小環境の調節に関与している。
5. NPM-ALK/STAT3/miR-135b 経路は ALK 陽性 ALCL 細胞の免疫学的表現型の調節とそれに伴うがん微小環境の変化を誘導することおよびがん細胞の細胞周期関連因子を調節することで、がんの増殖に影響を及ぼしていると考えられる。

7. 謝辞

本学位論文は東京大学大学院医学系研究科病因・病理学専攻分子病理学分野で筆者が実施した研究結果を中心にまとめたものである。同研究室の宮園浩平教授には本研究実施の機会を与えていただくとともに、遂行に当たりご指導，ご鞭撻をいただきましたこと拝謝申し上げます。名古屋大学大学院医学系研究科附属神経疾患・腫瘍分子医学研究センター分子腫瘍学の鈴木洋教授には，本研究の立案，遂行，論文の作成にあたり終始細部にわたりご指導いただき心より感謝申し上げます。研究に対する数多くの御助言いただきました JR 東京総合病院の杉本耕一副院長に感謝申し上げます。

本研究で使用した臨床サンプルを提供いただきました順天堂大学医学部附属浦安病院血液内科の野口雅章教授，順天堂大学大学院医学研究科・人体病理病態学講座の八尾隆史主任教授，順天堂大学医学部附属順天堂医院血液内科の小松則夫主任教授，および東京大学大学院医学系研究科分子細胞生物学専攻細胞情報学分野兼国立がん研究センター研究所長の間野博行教授に深く御礼申し上げます。本研究で使用したがん細胞株とプラスミドをいただきました北里大学医学部生化学講座の堺隆一教授および慶応義塾大学医学部生理学講座の故三好浩之特任准教授に深く御礼申し上げます。

最後に，様々な面で大変お世話になりました分子病理学分野の皆様感謝の意を表します。本当にありがとうございました。

8. 文献

1. Bianconi E, Piovesan A, Facchin F, Beraudi A, Casadei R, Frabetti F, Vitale L, Pelleri MC, Tassani S, Piva F, Perez-Amodio S, Strippoli P, Canaider S. An estimation of the number of cells in the human body. *Ann Hum Biol.* 40(6):463-71 (2013).
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144(5):646-74 (2011).
3. Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol.* 14(10):1014-22 (2013).
4. Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene.* 27(45):5904-12 (2008).
5. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 141(1):52-67 (2010).
6. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell.* 21(3):309-22 (2012).
7. Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature.* 501(7467):346-54 (2013).
8. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis.

- Nat Med. 19(11):1423-37 (2013).
9. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. Cell. 141(1):39-51 (2010).
 10. Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. Cell. 124(2):263-6 (2006).
 11. Goswami S, Sahai E, Wyckoff JB, Cammer M, Cox D, Pixley FJ, Stanley ER, Segall JE, Condeelis JS. Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. Cancer Res. 65(12):5278-83 (2005).
 12. Coniglio SJ, Eugenin E, Dobrenis K, Stanley ER, West BL, Symons MH, Segall JE. Microglial stimulation of glioblastoma invasion involves epidermal growth factor receptor (EGFR) and colony stimulating factor 1 receptor (CSF-1R) signaling. Mol Med. 18:519-27 (2012).
 13. Kalluri R, Zeisberg M Fibroblasts in cancer. Nat Rev Cancer. 6(5):392-401 (2006).
 14. Marsh T, Pietras K, McAllister SS. Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis. Biochim Biophys Acta. 1832(7):1070-8 (2013).
 15. Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park EC, Lu N, Selig M, Nielsen G, Taksir T, Jain RK, Seed B. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. Cell.

- 94(6):715-25 (1998).
16. Erez N, Truitt M, Olson P, Arron ST, Hanahan D. Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. *Cancer Cell*. 17(2):135-47 (2010).
 17. Fang H, Declerck YA. Targeting the tumor microenvironment: from understanding pathways to effective clinical trials. *Cancer Res*. 73(16):4965-77 (2013).
 18. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 12(4):252-64 (2012).
 19. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 75(5):843-54 (1993).
 20. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 75(5):855-62 (1993).
 21. Ambros V, Chen X. The regulation of genes and genomes by small RNAs. *Development*. 134(9):1635-41 (2007).
 22. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 116(2):281-97 (2004).
 23. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*.

- 15(8):509-24 (2014).
24. Suzuki HI, Miyazono K. Emerging complexity of microRNA generation cascades. *J Biochem.* 149(1):15-25 (2011).
25. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature.* 432(7014):231-5 (2004).
26. Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature.* 432(7014):235-40 (2004).
27. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science.* 305(5689):1437-41 (2004).
28. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell.* 120(1):15-20 (2005).
29. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19(1):92-105 (2009).
30. Miranda KC, Huynh T, Tay Y, Ang YS, Tam WL, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I. A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and

- their corresponding heteroduplexes. *Cell*. 126(6):1203-17 (2006).
31. Suzuki HI, Miyazono K. Dynamics of microRNA biogenesis: crosstalk between p53 network and microRNA processing pathway. *J Mol Med (Berl)*. 88(11):1085-94 (2010).
 32. He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ, Hammond SM. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*. 435(7043):828-33 (2005).
 33. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(24):15524-9 (2002).
 34. Suzuki HI, Yamagata K, Sugimoto K, Iwamoto T, Kato S, Miyazono K. Modulation of microRNA processing by p53. *Nature*. 460(7254):529-33 (2009).
 35. Shah MY, Ferrajoli A, Sood AK, Lopez-Berestein G, Calin GA. microRNA Therapeutics in Cancer - An Emerging Concept. *EBioMedicine*. 12:34-42 (2016).
 36. Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, Lee KH, Feldmann G, Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ, Arking DE, Beer MA, Maitra A, Mendell JT. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes

- apoptosis. *Mol Cell*. 26(5):745-52 (2007).
37. Tsunoda T, Takashima Y, Yoshida Y, Doi K, Tanaka Y, Fujimoto T, Machida T, Ota T, Koyanagi M, Kuroki M, Sasazuki T, Shirasawa S. Oncogenic KRAS regulates miR-200c and miR-221/222 in a 3D-specific manner in colorectal cancer cells. *Anticancer Res*. 31(7):2453-9 (2011).
38. Korpál M, Lee ES, Hu G, Kang Y. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J Biol Chem*. 283(22):14910-4 (2008).
39. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, Fujiwara S, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Bando M, Ohno S, Ishikawa Y, Aburatani H, Niki T, Sohara Y, Sugiyama Y, Mano H. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 448(7153):561-6 (2007).
40. Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, Piva R, Inghirami G. The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nat Rev Cancer*. 8(1):11-23 (2008).
41. Zhao Z, Verma V, Zhang M. Anaplastic lymphoma kinase: Role in cancer and therapy perspective. *Cancer Biol Ther*. 16(12):1691-701 (2015).
42. Holla VR, Elamin YY, Bailey AM, Johnson AM, Litzemberger BC, Khotskaya YB, Sanchez NS, Zeng J, Shufean MA, Shaw KR, Mendelsohn J, Mills GB, Meric-Bernstam

- F, Simon GR. ALK: a tyrosine kinase target for cancer therapy. *Cold Spring Harb Mol Case Stud.* 3(1):a001115 (2017).
43. Iwahara T, Fujimoto J, Wen D, Cupples R, Bucay N, Arakawa T, Mori S, Ratzkin B, Yamamoto T. Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene.* 14(4):439-49 (1997).
44. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Fourth Edition, Lyon, IARC Press; 2008.
45. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood.* 127(20):2375-90 (2016).
46. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, Look AT. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science.* 263(5151):1281-4 (1994).
47. Hallberg B, Palmer RH. Mechanistic insight into ALK receptor tyrosine kinase in human cancer biology. *Nat Rev Cancer.* 13(10):685-700 (2013).
48. Ambrogio C, Martinengo C, Voena C, Tondat F, Riera L, di Celle PF, Inghirami

- G, Chiarle R. NPM-ALK oncogenic tyrosine kinase controls T-cell identity by transcriptional regulation and epigenetic silencing in lymphoma cells. *Cancer Res.* 69(22):8611-9 (2009).
49. Pearson JD, Lee JK, Bacani JT, Lai R, Ingham RJ. NPM-ALK and the JunB transcription factor regulate the expression of cytotoxic molecules in ALK-positive, anaplastic large cell lymphoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 4(2):124-33 (2011).
50. Ambrogio C, Voena C, Manazza AD, Martinengo C, Costa C, Kirchhausen T, Hirsch E, Inghirami G, Chiarle R. The anaplastic lymphoma kinase controls cell shape and growth of anaplastic large cell lymphoma through Cdc42 activation. *Cancer Res.* 68(21):8899-907 (2008).
51. Lawrie CH, Saunders NJ, Soneji S, Palazzo S, Dunlop HM, Cooper CD, Brown PJ, Troussard X, Mossafa H, Enver T, Pezzella F, Boulwood J, Wainscoat JS, Hatton CS. MicroRNA expression in lymphocyte development and malignancy. *Leukemia.* 22(7):1440-6 (2008).
52. Merkel O, Hamacher F, Laimer D, Sift E, Trajanoski Z, Scheideler M, Egger G, Hassler MR, Thallinger C, Schmatz A, Turner SD, Greil R, Kenner L. Identification of differential and functionally active miRNAs in both anaplastic lymphoma kinase (ALK)⁺ and ALK⁻ anaplastic large-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci*

- U S A. 107(37):16228-33 (2010).
53. Haraguchi T, Ozaki Y, Iba H. Vectors expressing efficient RNA decoys achieve the long-term suppression of specific microRNA activity in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 37(6):e43 (2009).
54. Piva R, Pellegrino E, Mattioli M, Agnelli L, Lombardi L, Boccalatte F, Costa G, Ruggeri BA, Cheng M, Chiarle R, Palestro G, Neri A, Inghirami G. Functional validation of the anaplastic lymphoma kinase signature identifies CEBPB and BCL2A1 as critical target genes. *J Clin Invest.* 116(12):3171-82 (2006).
55. Anastasov N, Klier M, Koch I, Angermeier D, Höfler H, Fend F, Quintanilla-Martinez L. Efficient shRNA delivery into B and T lymphoma cells using lentiviral vector-mediated transfer. *J Hematop.* 2(1):9-19 (2009).
56. Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE Jr. Stat3 as an oncogene. *Cell.* 98(3):295-303 (1999).
57. Iqbal J, Weisenburger DD, Greiner TC, Vose JM, McKeithan T, Kucuk C, Geng H, Deffenbacher K, Smith L, Dybkaer K, Nakamura S, Seto M, Delabie J, Berger F, Loong F, Au WY, Ko YH, Sng I, Armitage JO, Chan WC; International Peripheral T-Cell Lymphoma Project. Molecular signatures to improve diagnosis in peripheral T-cell lymphoma and prognostication in angioimmunoblastic T-cell lymphoma.

- Blood. 115(5):1026-36 (2010).
58. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. Proc Natl Acad Sci U S A. 102(43):15545-50 (2005).
59. Marzec M, Kasprzycka M, Ptasznik A, Wlodarski P, Zhang Q, Odum N, Wasik MA. Inhibition of ALK enzymatic activity in T-cell lymphoma cells induces apoptosis and suppresses proliferation and STAT3 phosphorylation independently of Jak3. Lab Invest. 85(12):1544-54 (2005).
60. Saito T, Saetrom P. MicroRNAs--targeting and target prediction. N Biotechnol. 27(3):243-9 (2010).
61. Nagel R, le Sage C, Diosdado B, van der Waal M, Oude Vrielink JA, Bolijn A, Meijer GA, Agami R. Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer. Cancer Res. 68(14):5795-802 (2008).
62. Kuiper RP, Schoenmakers EF, van Reijmersdal SV, Hehir-Kwa JY, van Kessel AG, van Leeuwen FN, Hoogerbrugge PM. High-resolution genomic profiling of childhood ALL reveals novel recurrent genetic lesions affecting pathways involved in lymphocyte differentiation and cell cycle progression. Leukemia. 21(6):1258-66 (2007).

63. Gu TL, Tothova Z, Scheijen B, Griffin JD, Gilliland DG, Sternberg DW. NPM-ALK fusion kinase of anaplastic large-cell lymphoma regulates survival and proliferative signaling through modulation of FOXO3a. *Blood*. 103(12):4622-9 (2004).
64. Greer EL, Brunet A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene*. 24(50):7410-25 (2005).
65. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 6(11):1123-32 (2005).
66. Lazarevic V, Chen X, Shim JH, Hwang ES, Jang E, Bolm AN, Oukka M, Kuchroo VK, Glimcher LH. T-bet represses T_H17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding ROR γ t. *Nat Immunol*. 12(1):96-104 (2011).
67. van Hamburg JP, Mus AM, de Bruijn MJ, de Vogel L, Boon L, Cornelissen F, Asmawidjaja P, Hendriks RW, Lubberts E. GATA-3 protects against severe joint inflammation and bone erosion and reduces differentiation of Th17 cells during experimental arthritis. *Arthritis Rheum*. 60(3):750-9 (2009).
68. Zhou M, Ouyang W. The function role of GATA-3 in Th1 and Th2 differentiation. *Immunol Res*. 28(1):25-37 (2003).
69. McGeachy MJ, Cua DJ. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity*.

- 28(4):445-53 (2008).
70. Okamoto K, Iwai Y, Oh-Hora M, Yamamoto M, Morio T, Aoki K, Ohya K, Jetten AM, Akira S, Muta T, Takayanagi H. $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ regulates $\text{T}_\text{H}17$ development by cooperating with ROR nuclear receptors. *Nature*. 464(7293):1381-5 (2010).
71. Yang XO, Chang SH, Park H, Nurieva R, Shah B, Acero L, Wang YH, Schluns KS, Broaddus RR, Zhu Z, Dong C. Regulation of inflammatory responses by IL-17F. *J Exp Med*. 205(5):1063-75 (2008).
72. Ji Y, Zhang W. Th17 cells: positive or negative role in tumor? *Cancer Immunol Immunother*. 59(7):979-87 (2010).
73. Zou W, Restifo NP. $\text{T}_\text{H}17$ cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 10(4):248-56 (2010).
74. Numasaki M, Fukushi J, Ono M, Narula SK, Zavodny PJ, Kudo T, Robbins PD, Tahara H, Lotze MT. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood*. 101(7):2620-7 (2003).
75. Numasaki M, Watanabe M, Suzuki T, Takahashi H, Nakamura A, McAllister F, Hishinuma T, Goto J, Lotze MT, Kolls JK, Sasaki H. IL-17 enhances the net angiogenic activity and in vivo growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis. *J Immunol*. 175(9):6177-89

- (2005).
76. Lin CW, Chang YL, Chang YC, Lin JC, Chen CC, Pan SH, Wu CT, Chen HY, Yang SC, Hong TM, Yang PC. MicroRNA-135b promotes lung cancer metastasis by regulating multiple targets in the Hippo pathway and LZTS1. *Nat Commun.* 4:1877 (2013).
77. Horie R, Watanabe M, Ishida T, Koiwa T, Aizawa S, Itoh K, Higashihara M, Kadin ME, Watanabe T. The NPM-ALK oncoprotein abrogates CD30 signaling and constitutive NF- κ B activation in anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Cell.* 5(4):353-64 (2004).
78. Lin CH, Jackson AL, Guo J, Linsley PS, Eisenman RN. Myc-regulated microRNAs attenuate embryonic stem cell differentiation. *EMBO J.* 28(20):3157-70 (2009).
79. Tong AW, Fulgham P, Jay C, Chen P, Khalil I, Liu S, Senzer N, Eklund AC, Han J, Nemunaitis J. MicroRNA profile analysis of human prostate cancers. *Cancer Gene Ther.* 16(3):206-16 (2009).
80. Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene.* 19(21):2474-88 (2000).
81. Ara T, Nakata R, Sheard MA, Shimada H, Buettner R, Groshen SG, Ji L, Yu H, Jove R, Seeger RC, DeClerck YA. Critical role of STAT3 in IL-6-mediated drug

- resistance in human neuroblastoma. *Cancer Res.* 73(13):3852-64 (2013).
82. Tomiyama A, Uekita T, Kamata R, Sasaki K, Takita J, Ohira M, Nakagawara A, Kitanaka C, Mori K, Yamaguchi H, Sakai R. Flotillin-1 regulates oncogenic signaling in neuroblastoma cells by regulating ALK membrane association. *Cancer Res.* 74(14):3790-801 (2014).
83. Koivunen JP1, Mermel C, Zejnullahu K, Murphy C, Lifshits E, Holmes AJ, Choi HG, Kim J, Chiang D, Thomas R, Lee J, Richards WG, Sugarbaker DJ, Ducko C, Lindeman N, Marcoux JP, Engelman JA, Gray NS, Lee C, Meyerson M, Jänne PA. EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. *Clin Cancer Res.* 14(13):4275-83 (2008).
84. Yuki D, Lin YM, Fujii Y, Nakamura Y, Furukawa Y. Isolation of LEM domain-containing 1, a novel testis-specific gene expressed in colorectal cancers. *Oncol Rep.* 12(2):275-80 (2004).
85. Jones AM, Douglas EJ, Halford SE, Fiegler H, Gorman PA, Roylance RR, Carter NP, Tomlinson IP. Array-CGH analysis of microsatellite-stable, near-diploid bowel cancers and comparison with other types of colorectal carcinoma. *Oncogene.* 24(1):118-29 (2005).
86. Douglas EJ, Fiegler H, Rowan A, Halford S, Bicknell DC, Bodmer W, Tomlinson

- IP, Carter NP. Array comparative genomic hybridization analysis of colorectal cancer cell lines and primary carcinomas. *Cancer Res.* 64(14):4817-25 (2004).
87. Sasahira T, Kurihara M, Nakashima C, Kirita T, Kuniyasu H. LEM domain containing 1 promotes oral squamous cell carcinoma invasion and endothelial transmigration. *Br J Cancer.* 115(1):52-8 (2016).
88. Liu C, Iqbal J, Teruya-Feldstein J, Shen Y, Dabrowska MJ, Dybkaer K, Lim MS, Piva R, Barreca A, Pellegrino E, Spaccarotella E, Lachel CM, Kucuk C, Jiang CS, Hu X, Bhagavathi S, Greiner TC, Weisenburger DD, Aoun P, Perkins SL, McKeithan TW, Inghirami G, Chan WC. MicroRNA expression profiling identifies molecular signatures associated with anaplastic large cell lymphoma. *Blood.* 122(12):2083-92 (2013).
89. Spaccarotella E, Pellegrino E, Ferracin M, Ferreri C, Cuccuru G, Liu C, Iqbal J, Cantarella D, Taulli R, Provero P, Di Cunto F, Medico E, Negrini M, Chan WC, Inghirami G, Piva R. STAT3-mediated activation of microRNA cluster 17~92 promotes proliferation and survival of ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Haematologica.* 99(1):116-24 (2014).
90. Steinhilber J, Bonin M, Walter M, Fend F, Bonzheim I, Quintanilla-Martinez L. Next-generation sequencing identifies deregulation of microRNAs involved in both

innate and adaptive immune response in ALK+ ALCL. PLoS One. 10(2):e0117780

(2015).

91. Dejean E, Renalier MH, Foisseau M, Agirre X, Joseph N, de Paiva GR, Al Saati T, Soulier J, Desjobert C, Lamant L, Prósper F, Felsher DW, Cavaillé J, Prats H, Delsol G, Giuriato S, Meggetto F. Hypoxia-microRNA-16 downregulation induces VEGF expression in anaplastic lymphoma kinase (ALK)-positive anaplastic large-cell lymphomas. *Leukemia*. 25(12):1882-90 (2011).
92. Zhu H, Vishwamitra D, Curry CV, Manshoury R, Diao L, Khan A, Amin HM. NPM-ALK up-regulates iNOS expression through a STAT3/microRNA-26a-dependent mechanism. *J Pathol*. 230(1):82-94 (2013).
93. Desjobert C, Renalier MH, Bergalet J, Dejean E, Joseph N, Kruczynski A, Soulier J, Espinos E, Meggetto F, Cavaillé J, Delsol G, Lamant L. MiR-29a down-regulation in ALK-positive anaplastic large cell lymphomas contributes to apoptosis blockade through MCL-1 overexpression. *Blood*. 117(24):6627-37 (2011).
94. Hoareau-Aveilla C, Valentin T, Daugrois C, Quelen C, Mitou G, Quentin S, Jia J, Spicuglia S, Ferrier P, Ceccon M, Giuriato S, Gambacorti-Passerini C, Brousset P, Lamant L, Meggetto F. Reversal of microRNA-150 silencing disadvantages crizotinib-resistant NPM-ALK⁺ cell growth. *J Clin Invest*. 125(9):3505-18 (2015).

95. Zhang Q, Wang H, Kantekure K, Paterson JC, Liu X, Schaffer A, Paulos C, Milone MC, Odum N, Turner S, Marafioti T, Wasik MA. Oncogenic tyrosine kinase NPM-ALK induces expression of the growth-promoting receptor ICOS. *Blood*. 118(11):3062-71 (2011).
96. Vishwamitra D, Li Y, Wilson D, Manshouri R, Curry CV, Shi B, Tang XM, Sheehan AM, Wistuba II, Shi P, Amin HM. MicroRNA 96 is a post-transcriptional suppressor of anaplastic lymphoma kinase expression. *Am J Pathol*. 180(5):1772-80 (2012).
97. Suzuki HI, Mihira H, Watabe T, Sugimoto K, Miyazono K. Widespread inference of weighted microRNA-mediated gene regulation in cancer transcriptome analysis. *Nucleic Acids Res*. 41(5):e62 (2013).
98. Suzuki HI, Matsuyama H, Noguchi M, Yao T, Komatsu N, Mano H, Sugimoto K, Miyazono K. Computational dissection of distinct microRNA activity signatures associated with peripheral T cell lymphoma subtypes. *Leukemia*. 27(10):2107-11 (2013).
99. Savan R, McFarland AP, Reynolds DA, Feigenbaum L, Ramakrishnan K, Karwan M, Shirota H, Klinman DM, Dunleavy K, Pittaluga S, Anderson SK, Donnelly RP, Wilson WH, Young HA. A novel role for IL-22R1 as a driver of inflammation. *Blood*. 117(2):575-84 (2011).

100. Küppers R. The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer*. 9(1):15-27 (2009).
101. Tripodo C, Gri G, Piccaluga PP, Frossi B, Guarnotta C, Piconese S, Franco G, Vetri V, Pucillo CE, Florena AM, Colombo MP, Pileri SA. Mast cells and Th17 cells contribute to the lymphoma-associated pro-inflammatory microenvironment of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am J Pathol*. 177(2):792-802 (2010).
102. Mann KP, Hall B, Kamino H, Borowitz MJ, Rataj H. Neutrophil-rich, Ki-1-positive anaplastic large-cell malignant lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 19(4):407-16 (1995).
103. Tamiolakis D, Georgiou G, Prassopoulos P, Simopoulos C, Venizelos J, Papadopoulos N. Neutrophil-rich anaplastic large cell lymphoma (NR-ALCL) mimicking lymphadenitis: a study by fine-needle aspiration biopsy. *Leuk Lymphoma*. 45(6):1309-10 (2004).
104. Engsig FN, Møller MB, Hasselbalch HK, Mahdi B, Obel N. Extreme neutrophil granulocytosis in a patient with anaplastic large cell lymphoma of T-cell lineage. *APMIS*. 115(6):778-83 (2007).
105. Du C, Liu C, Kang J, Zhao G, Ye Z, Huang S, Li Z, Wu Z, Pei G. MicroRNA miR-326 regulates T_H-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Immunol*. 10(12):1252-9 (2009).

106. O'Connell RM, Kahn D, Gibson WS, Round JL, Scholz RL, Chaudhuri AA, Kahn ME, Rao DS, Baltimore D. MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. *Immunity*. 33(4):607-19 (2010).
107. Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR, van Dongen S, Grocock RJ, Das PP, Miska EA, Vetrie D, Okkenhaug K, Enright AJ, Dougan G, Turner M, Bradley A. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science*. 316(5824):608-11 (2007).
108. Luo Y, Deng Y, Tao Z, Chen S, Xiao B, Ren J, Chen Z, Han J, Kong Y, Xu Y, Deng M. Regulatory effect of microRNA-135a on the Th1/Th2 imbalance in a murine model of allergic rhinitis. *Exp Ther Med*. 8(4):1105-1110 (2014).
109. Suzuki HI, Katsura A, Matsuyama H, Miyazono K. MicroRNA regulons in tumor microenvironment. *Oncogene*. 34(24):3085-94 (2015).
110. Ma L, Young J, Prabhala H, Pan E, Mestdagh P, Muth D, Teruya-Feldstein J, Reinhardt F, Onder TT, Valastyan S, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J, Weinberg RA. miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat Cell Biol*. 12(3):247-56 (2010).
111. Chou J, Lin JH, Brenot A, Kim JW, Provot S, Werb Z. GATA3 suppresses metastasis and modulates the tumour microenvironment by regulating microRNA-29b expression.

Nat Cell Biol. 15(2):201-13 (2013).

112. Mitra AK, Zillhardt M, Hua Y, Tiwari P, Murmann AE, Peter ME, Lengyel E.

MicroRNAs reprogram normal fibroblasts into cancer-associated fibroblasts in ovarian cancer. *Cancer Discov.* 2(12):1100-8 (2012).

113. Bronisz A, Godlewski J, Wallace JA, Merchant AS, Nowicki MO, Mathsyaraja H,

Srinivasan R, Trimboli AJ, Martin CK, Li F, Yu L, Fernandez SA, Pécot T, Rosol TJ,

Cory S, Hallett M, Park M, Piper MG, Marsh CB, Yee LD, Jimenez RE, Nuovo G,

Lawler SE, Chiocca EA, Leone G, Ostrowski MC. Reprogramming of the tumour

microenvironment by stromal PTEN-regulated miR-320. *Nat Cell Biol.* 14(2):159-67

(2011).

114. Musumeci M, Coppola V, Addario A, Patrizii M, Maugeri-Saccà M, Memeo L,

Colarossi C, Francescangeli F, Biffoni M, Collura D, Giacobbe A, D'Urso L, Falchi M,

Veneri MA, Muto G, De Maria R, Bonci D. Control of tumor and microenvironment

cross-talk by miR-15a and miR-16 in prostate cancer. *Oncogene.* 30(41):4231-42 (2011).

115. Beg MS, Brenner AJ, Sachdev J, Borad M, Kang YK, Stoudemire J, Smith S6,

Bader AG, Kim S, Hong DS. Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic,

administered twice weekly in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs.*

35(2):180-188 (2017).

116. Kreth S, Hübner M, Hinske LC. MicroRNAs as Clinical Biomarkers and Therapeutic Tools in Perioperative Medicine. *Anesth Analg*. 126(2):670-681 (2018).
117. Due H, Svendsen P, Bødker JS, Schmitz A, Bøgsted M, Johnsen HE, El-Galaly TC, Roug AS, Dybkær K. miR-155 as a Biomarker in B-Cell Malignancies. *Biomed Res Int*. 2016:9513037 (2016).
118. Zhang Y, Roccaro AM, Rombaoa C, Flores L, Obad S, Fernandes SM, Sacco A, Liu Y, Ngo H, Quang P, Azab AK, Azab F, Maiso P, Reagan M, Brown JR, Thai TH, Kauppinen S, Ghobrial IM. LNA-mediated anti-miR-155 silencing in low-grade B-cell lymphomas. *Blood*. 120(8): 1678-86 (2012).
119. Lieberman J, Sharp PA. Harnessing RNA interference for therapy: the silent treatment. *JAMA*. 313(12):1207-8 (2015).
120. Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, van der Meer AJ, Patick AK, Chen A, Zhou Y, Persson R, King BD, Kauppinen S, Levin AA, Hodges MR. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med*. 368(18):1685-94 (2013).