

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 松山 弘典

マイクロ RNA (microRNA, miRNA) は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。miRNA は細胞内で多段階の生合成過程を経て産生されるが、最終的には, Ago タンパク質に取り込まれ RNA 誘導型サイレンシング複合体 (RNA-induced silencing complex: RISC) を形成することで機能する。産生された一本鎖成熟型 miRNA は, 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し, 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 は多数の mRNA を標的とする。

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 の発現上昇と, がん抑制的に働く miRNA の発現減少がみられ, 2011 年に Weinberg らによって提唱されたがんの hallmark にも, 多くの miRNA が関与していることが明らかとなってきた。さらに, miRNA の発現ががん遺伝子である c-Myc またはがん抑制遺伝子である p53 などによって制御されていることも明らかとされている。今回我々は, がんにおける miRNA の役割を深く理解することががんを制御する上で非常に重要な要因である可能性があると考えた。そこで, がん遺伝子の一つで, チロシンキナーゼ活性を有する Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (NPM-ALK) 陽性の未分化大細胞リンパ腫 (anaplastic large cell lymphoma, ALCL) において, NPM-ALK による miRNA の発現制御および miRNA の ALK 陽性 ALCL の表現型への関与を解明することを目的に研究を行った。

これまでの報告において ALCL で発現が亢進しているとされた miRNA である miR-21, miR-27a, および miR-135b の発現量を検討した。この中で成熟型 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認められず, その一方で ALCL 細胞株では顕著に発現量が高かった。miR-135b 遺伝子は LEM domain containing 1 (LEMD1) 遺伝子の第一イントロンに存在しており, LEMD1 の発現量も miR-135b と同様に ALCL 細胞株において発現量が高かった。さらに, ALCL 患者検体を用いた検討により, 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, miR-135b の高発現がみられた。一方で, ALK の異常を持つ肺がんおよび神経芽腫の細胞株ではその発現は低いレベルであった。

ALK 阻害剤, および NPM-ALK 野生型およびキナーゼ活性を失わせた NPM-ALK K210R 変異体を用いた検討から, ALCL 細胞で NPM-ALK のキナーゼ活性を介して LEMD1 と miR-135b が誘導されていることが示唆された。次に, NPM-ALK の下流で活性化されるシグナル経路である STAT3, Ras-Erk, および PI3K の miR-135b の発現誘導に対する関与を検討したところ, STAT3 が主に miR-135b の発現に寄与していることが示唆された。また, レポーター実験により, ALCL 細胞株において内在性の miR-135b が強い遺伝子制御活性を有していることを確認した。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。

ALK 陽性 ALCL における miR-135b の役割を明らかとするために内在性かつ機能的な標的遺伝子の探索を行った。*in silico* 標的遺伝子予測プログラムおよび 3' UTR ルシフェラーゼレポーターアッセイを組み合わせ, LZTS1, LATS2, および FOXO1 が標的遺伝子候補であることが見出した。その中で, miRNA の機能を特異的に阻害する RNA デコイ (TuD RNA) システムを用いた解析, および miR-135b の導入実験により, miR-135b が FOXO1 の発現を抑制し, 下流の細胞周期阻害因子 p21 と p27 を調節することが明らかとなった。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, 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ところ, Cytosine β -D-arabinofuranoside (Ara-C) に対する耐性が上昇した。これらの結果は, ALK 陽性 ALCL 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。

さらなる miR-135b の標的遺伝子を明らかとするために, 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 を行い, 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。さらに, ALCL を含む末梢 T 細胞リンパ腫-非特定型における遺伝子発現プロファイルの解析より, ALCL がヘルパー T (Th) 17 細胞関連分子の高発現などで特徴づけられることが報告されているが, そのデータを再解析することで 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。レポーターアッセイと TuD RNA システムを用いた検討により, STAT6 および GATA3 が ALCL 細胞における miR-135b の内在性の標的であることを明らかとした。

Th1 細胞と Th2 細胞のエフェクターサイトカインは 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。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。TuD RNA システムを用いて miR-135b を抑制すると、IL-17A と IL-17F の転写産物の発現レベルが減弱し、IL-17F はタンパク質産生の低下もみられた。さらに、Th17 細胞への分化の重要な制御因子として同定された I κ B ξ の発現も抑制された。また、炎症性サイトカインである IL-6 および IL-8 と細胞傷害性分子である granzyme B と perforin 1 の発現低下も認められた。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 Th17 細胞に似た IL-17 産生性免疫学的表現型を誘導し 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。

miR-135b による IL-17 産生性免疫学的表現型の形成が ALCL におけるがんの進展にどのように寄与しているかを検討した。*in vitro* における非接触の共培養実験により、ALCL 細胞との共培養がヒト線維芽細胞の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) の発現を増強させること、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。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示唆した。さらに、*in vivo* での検討では、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 ALCL 細胞株の皮下腫瘍の増殖が抑制され、この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。これらの結果により、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が示唆された。

本研究より、ALCL において NPM-ALK は STAT3 を介して LEMD1 と miR-135b の発現を誘導することが明らかとなった。さらに、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 を標的とすることを明らかとした。FOXO1 の抑制は、ALCL の抗がん剤に対する薬剤感受性の調節に、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、それぞれ関与していると考えられる。さらに、IL-17 産生免疫学的表現型の確立は傍分泌型炎症反応の調節に関与し、ALCL の進展に有利ながん微小環境の形成に寄与している可能性が示唆された。以上の結果より、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微小環境の変化という、新しい miRNA の腫瘍の進展への寄与のメカニズムが明らかになった。