

【別紙2】

審査の結果の要旨

氏名 松山 弘典

本研究はがん遺伝子の一つで、チロシンキナーゼ活性を有する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によるマイクロRNA（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い、下記の結果を得ている。

1. 既報においてALK陽性ALCLで発現が亢進しているとされたmiRNAの中で成熟型miR-135bはヒト正常T細胞およびT細胞性白血病細胞株では発現が認められない一方でALK陽性ALCL細胞株では顕著に発現量が高いことが示された。miR-135b遺伝子はLEMD 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ALK陽性ALCL細胞株において発現量が高いことが示された。さらに、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の高発現が認められた。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ALK陽性ALCL細胞株と比較すると低いレベルであることが示された。
2. ALK阻害（低分子およびshRNAによる発現抑制）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変異体を用いた試験により、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、ALK陽性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。以上の結果より、miR-135bはALK陽性ALCLにおいてNPM-ALK/STAT3シグナルによって誘導され、高い活性を有していることが示された。
3. ALK陽性ALCLにおけるmiR-135bの内在性かつ機能的な標的遺伝子の探索のため、*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た試験を実施し、LZTS1、LATS2、およびFOXO1が標的遺伝子候補であることが見出された。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。これらの結果より、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が示唆された。

4. さらに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と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再解析により、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を明らかとした。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ALK陽性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。次に、TuD RNAシステムを用いてALK陽性ALCL細胞株において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認められた。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IkB δ 、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。
5. 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への影響を検証するためにin vitroにおける非接触の共培養実験を実施し、ALCL細胞との共培養により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）の発現が増強させること、かつその発現誘導がmiR-135bに依存していることが明らかとし、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が示唆された。さらに、in vivoでの検討において、miR-135bのアンチセンスオリゴヌクレオチドの腫瘍内への局所投与によりALCL細胞株の皮下腫瘍の増殖が抑制された。この際、腫瘍内の血管新生の減少が認められた。これらの結果より、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。

以上、本論文はALK陽性ALCLにおいて、NPM-ALK/STAT3経路がmiR-135bの発現を誘導していること、高発現したmiR-135bが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・進展に影響を及ぼしていると考えられる。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。