

Figure 3. Loss of miR-31 is Responsible for Constitutive NF-κB Activation, Abnormal Cell Growth, and Resistance to Apoptotic Cell Death in ATL Cells

(A) Expression levels of miR-31 and NIK in individual ATL patients and normal controls using data set obtained by quantitative RT-PCR. Pearson's correlation coefficient within ATL samples was described in the graph.

adjacent to clusters of the *CDKN2* and *IFNA* families, and is a well-known hotspot of genomic loss in several types of human cancers. We performed genome-wide scans of genetic lesions in 168 ATL samples and demonstrated that 21 ATL cases (12.5%) had genomic deletion of 9p21.3 containing the *hsa-miR-31* coding region (Figure 4A; Figure S3A). All of these cases also have genomic defect in *CDKN2A* region. A major proportion of ATL cases that are without genetic deletion and somatic mutation in the *hsa-miR-31* region showed remarkable loss of miR-31 expression (Figure 4B). Detailed expression profiling revealed drastic downregulation of *Pri-miR-31* transcription in the primary ATL cells (Figure 4C). There was a strong correlation between the levels of mature miR-31 and primary transcript ($r = 0.9414$, $p = 5.45 \times 10^{-8}$). *hsa-miR-31* is located in intronic region of *LOC554202* gene. However, *LOC554202* mRNA levels were very low in primary T cells and there was no significant difference between ATL and normal cells, strongly suggesting that loss of miR-31 expression is due to specific transcriptional suppression in ATL cells. Using computational analysis, we identified a putative TATA box and transcriptional start site (TSS) 2500 bp upstream of the miR-31 coding region (Figure 4D). Although no CpG islands were found in this region, we unexpectedly discovered an assembly of YY1-binding motifs upstream of the miR-31 region in human and mouse (Figure 4D; Figure S3C). YY1 is a pivotal transcription factor and a recruiter of the Polycomb repressive complex (PRC) (Simon and Kingston, 2009). Convergence of the YY1 binding sequence, especially the repressive motif (Figure S3D), seems to be evolutionarily conserved, suggesting that YY1 is important in the regulation of miR-31 transcription. We further performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) to evaluate repressive histone hallmarks, including di- and trimethylated H3K9 (H3K9me2 and H3K9me3) and trimethylated H3K27 (H3K27me3). The results showed higher levels of methylation at H3K9 and H3K27 in a broad area containing the miR-31 coding region (Figure 4E). As shown in Figures S3E–S3G, there was an inverse correlation between the levels of miR-31 expression and repressive histone methylation. These data allowed us to hypothesize that histone methylation, especially that of Polycomb family-dependent H3K27me3, may contribute to miR-31 repression. To confirm our hypothesis, we performed a YY1 knockdown experiment using a specific shRNA (Figures 4F–4I). As expected, knockdown of YY1 led to an increase in the levels of *Pri-miR-31* and mature miR-31 (Figures 4F and 4G). Furthermore, ChIP assays showed that

YY1 occupied the miR-31 region, especially in the upstream region of TSS, where there is an array of YY1 binding sites (Figures 4D and 4H). The results also demonstrated that decreased occupancy of YY1 and concomitant derecruitment of EZH2, a key component of PRC2, were induced by YY1 knockdown, indicating involvement of EZH2 in the repressive complex recruited to the miR-31 region (Figures 4H and 4I; Figure S3H). These results collectively suggest that YY1 regulates PRC2 localization and initiates miR-31 suppression. Indeed, we found significant escalation of methylated histone H3K9 and H3K27 at the miR-31 locus of peripheral blood lymphocytes of ATL patients (Figure 4J), indicating that aberrant abundance of suppressive histone methylation may be responsible for the loss of miR-31 in the primary ATL cells.

Overexpression of PRC2 Components Leads to miR-31 Repression

Given that Polycomb-mediated repressiveness affects miR-31 level, our findings imply that the amount of EZH2 is related to miR-31 expression (Figure 4I; Figures S3G and S4A). We found a significantly upregulated expression of PRC2 components, especially EZH2 and SUZ12, in the primary ATL cells (Figures 5A and 5B; Table S3). Quantitative RT-PCR revealed that miR-31 levels inversely correlated with both *EZH2* and *SUZ12*, respectively (Figure 5C). miR-101 and miR-26a, which are putative negative regulators of EZH2, seem to be associated with this relationship in ATL cells (Figures S4B–S4E). To further confirm our hypothetical mechanism linking the epigenetic machinery and miR-31 expression, we performed a "loss-of-PRC2-function" assay. Retroviral delivery of shSUZ12 and shEZH2 in the ATL cell lines resulted in a great increase in the levels of *Pri-miR-31* and its mature form (Figure 5D; Figure S4F). Knockdown of PRC2 induced histone demethylation at H3K27 in the miR-31 region, which is concomitant with the decrease in H3K9me3 levels, EZH2 occupancy, and HDAC1 recruitment (Figure 5E), suggesting that this multimeric complex leads to a completely closed chromatin architecture as a result of histone modifications in the miR-31 genomic region.

To further examine whether the proposed mechanism holds true in other human cancers, we analyzed a couple of carcinoma cell lines, including HeLa cells and nonmetastatic and metastatic breast carcinoma cell lines, MCF7 and MDA-MB-453 cells, respectively. qRT-PCR revealed that expression of *EZH2* and *SUZ12* inversely correlated with miR-31 levels (Figure S4G).

(B) miR-31 restoration by retroviral vector inhibits *NIK* RNA accumulation in TL-Om1 cells. The results of *NIK* and mature miR-31 quantifications are shown ($n = 3$, mean \pm SD).

(C) miR-31 or shNIK expression downregulates *NIK* protein expression and inhibits downstream pathway of noncanonical NF- κ B in TL-Om1 cells.

(D) Reduced nuclear translocation of RelA and RelB proteins in miR-31- or shNIK-expressing TL-Om1 cells.

(E) miR-31-dependent downregulation of NF- κ B activity in TL-Om1 cells examined by EMSA.

(F) NF- κ B-luciferase reporter assays ($n = 5$, mean \pm SD). FLAG-*NIK* plasmid was transiently introduced 48 hr prior to the assay.

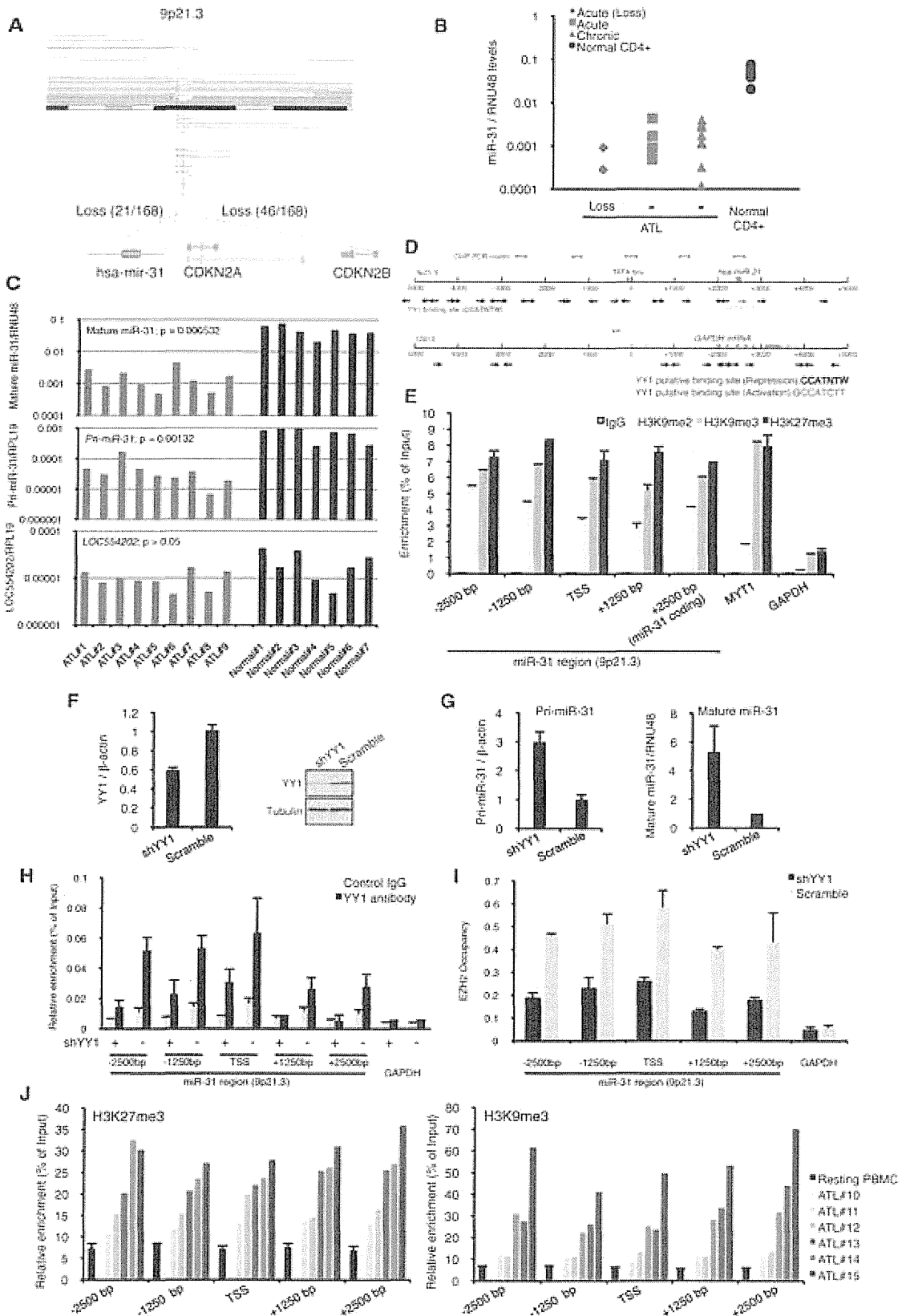
(G) miR-31 level is relevant to proliferation of ATL cells. Cell proliferation curve of TL-Om1 cells were evaluated in two FCS conditions ($n = 3$, mean \pm SD).

(H) Apoptosis-related gene expression in TL-Om1 cells analyzed by qRT-PCR ($n = 3$, mean \pm SD) and western blots.

(I) Lentivirus-mediated *NIK* depletion promotes basal and Fas antibody-mediated apoptosis. Venus-positive population represented lentivirus-infected cells. Apoptotic cells were determined by PE-Annexin V / 7-AAD stainings ($n = 4$). Representative FACS analyses are shown.

(J) miR-31 activates Caspase 3/7 determined by FACS ($n = 3$).

(K) miR-31 expression and *NIK* depletion induce tumor cell death. Primary tumor cell from ATL patient and healthy CD3+ T cells were infected with lentivirus and analyzed by FACS. The apoptotic cells were defined by sequential gating beginning with FSC-SSC to select intact lymphocytes, subgating on the Venus-positive population, and calculating the PE-Annexin V and 7-AAD profilings. Representative result is shown and summarized data are presented in Figure 6J. See also Figure S2.



ChIP assays detected higher levels of trimethylated H3K27 and EZH2 occupancy in cells showing lower expression levels of miR-31 (Figure S4H). Furthermore, knockdown of EZH2 or SUZ12 restored miR-31 transcription in MDA-MB-453 and MCF7 cells (Figures 5F and 5G; Figure S4K, respectively), which are consistent with the results obtained with ATL cells. These results indicate a link between Polycomb-mediated epigenetic regulation and miR-31 transcription in ATL and breast cancer cell lines.

Polycomb Group Regulates NF- κ B Pathway by Controlling miR-31 Expression

Based on our findings, we considered an aspect of the biological communication between epigenetic silencing and the NF- κ B pathway through miR-31 regulation. The microarray data sets showed positive correlations between PRC2 components and miR-31 target gene, *NIK* expression (Figure 6A). The results also suggested that these factors tend to show higher levels in the aggressive subtype (acute type) than in the indolent subtypes (chronic and smoldering types), implying that these genes may play important roles in the clinical phenotype and prognosis of ATL. To examine this notion, we performed PRC2 knockdown in ATL cell lines. Western blots of these cells demonstrated decreased levels of NIK, p52, and phospho-I κ B α (Figure 6B; Figure S5A), suggesting suppression of both canonical and noncanonical NF- κ B cascade and activity (Figure 6C; Figures S5B and S5C). These results are consistent with those of miR-31 overexpression (Figures 3C–3F). Then, we tested whether exogenous manipulation of miR-31 could restore the effect of PRC2 loss. Anti-miR-31 treatment rescued impaired NF- κ B activity in PRC2-disrupted cells (Figure 6D). On the other hand, overexpression of EZH2 induced NF- κ B activation, which was partially canceled by the introduction of miR-31 precursor (Figure 6E; Figure S5D). These results suggest that Polycomb-mediated miR-31 suppression leads to NF- κ B activation. Indeed, knockdown of the PRC2 complex led to reduced levels of cell proliferation and greater sensitivity to serum deprivation in ATL cells (Figure 6F; Figure S5E). In addition, PRC2 disruption showed a reduction in cell migration (Figure S5F).

To gain further insight into this general network, we studied the functions of miR-31 and the PRC2 complex in breast cancer cell lines. NF- κ B activity was downregulated by knockdown of

PRC2 components in MDA-MB-453 cells (Figure 6G; Figures S5G and S5H), although no significant differences were observed in cell proliferation (data not shown). Repression of NF- κ B activity induced by knockdown of PRC2 components was partially restored by treatment with a miR-31 inhibitor, suggesting that PRC2 knockdown-mediated relief of NF- κ B repression is at least a part of the result of the miR-31 induction. In addition, knockdown of PRC2 components resulted in a reduced level of receptor-initiated accumulation of NIK in B cells (Figure 6H). Our findings indicate a common molecular mechanism comprising Polycomb-mediated epigenetic regulation, miR-31 expression and the NF- κ B signaling pathway.

Regulation of NF- κ B by Polycomb family may in turn control the cellular apoptosis responses. We found that lentivirus-mediated EZH2 knockdown led to increased apoptotic sensitivity in TL-Om1 cells (Figure 6I). Additional expression of NIK inhibited the cell death induced by EZH2 knockdown, suggesting the reciprocal relationship between Polycomb and NF- κ B cascades. By using primary tumor cells from patient, we tested the killing effect induced by miR-31, NIK knockdown, and EZH2 knockdown (Figure 6J; Figures S5I and S5J). All tested samples showed strong death response, demonstrating that survival of ATL cells was closely associated with miR-31, NIK, and EZH2, all of which show deregulated expression in ATL cells.

By qRT-PCR we finally examined the expression levels of some genes involved in the noncanonical NF- κ B pathway. As shown in Figure 6K, the results clearly demonstrated higher expression levels of positive regulators such as *NIK*, *CD40*, and *LTBR*, and lower expression levels of the negative regulators such as *BIRC2/3* (*clAP1/2*), which are involved in proteasomal degradation of NIK (Zarnegar et al., 2008a). These observations are in line with a previous report on Multiple Myeloma cells (Annunziata et al., 2007). In addition to these data, we obtained convincing evidence for a molecular aspect of NIK accumulation in ATL cells. Polycomb-dependent epigenetic gene silencing may be associated with miR-31 loss, followed by NF- κ B activation and other signaling pathways (Figure 7).

DISCUSSION

Constitutive activation of NF- κ B contributes to abnormal proliferation and inhibition of apoptotic cell death in cancer cells,

Figure 4. Genetic and Epigenetic Abnormalities Cause miR-31 Loss in ATL Cells

(A) Genomic loss of chromosome 9p21.3 in primary ATL cells. Copy number analyses revealed tumor-associated deletion of miR-31 region (21/168) and *CDKN2* region (46/168). Recurrent genetic changes are depicted by horizontal lines based on CNAG output of the SNP array analysis.

(B) miR-31 expression in various sample sets. Expression levels were evaluated by real-time PCR.

Loss, samples with genomic loss of the miR-31 region; (–) samples without genomic loss of the miR-31 region.

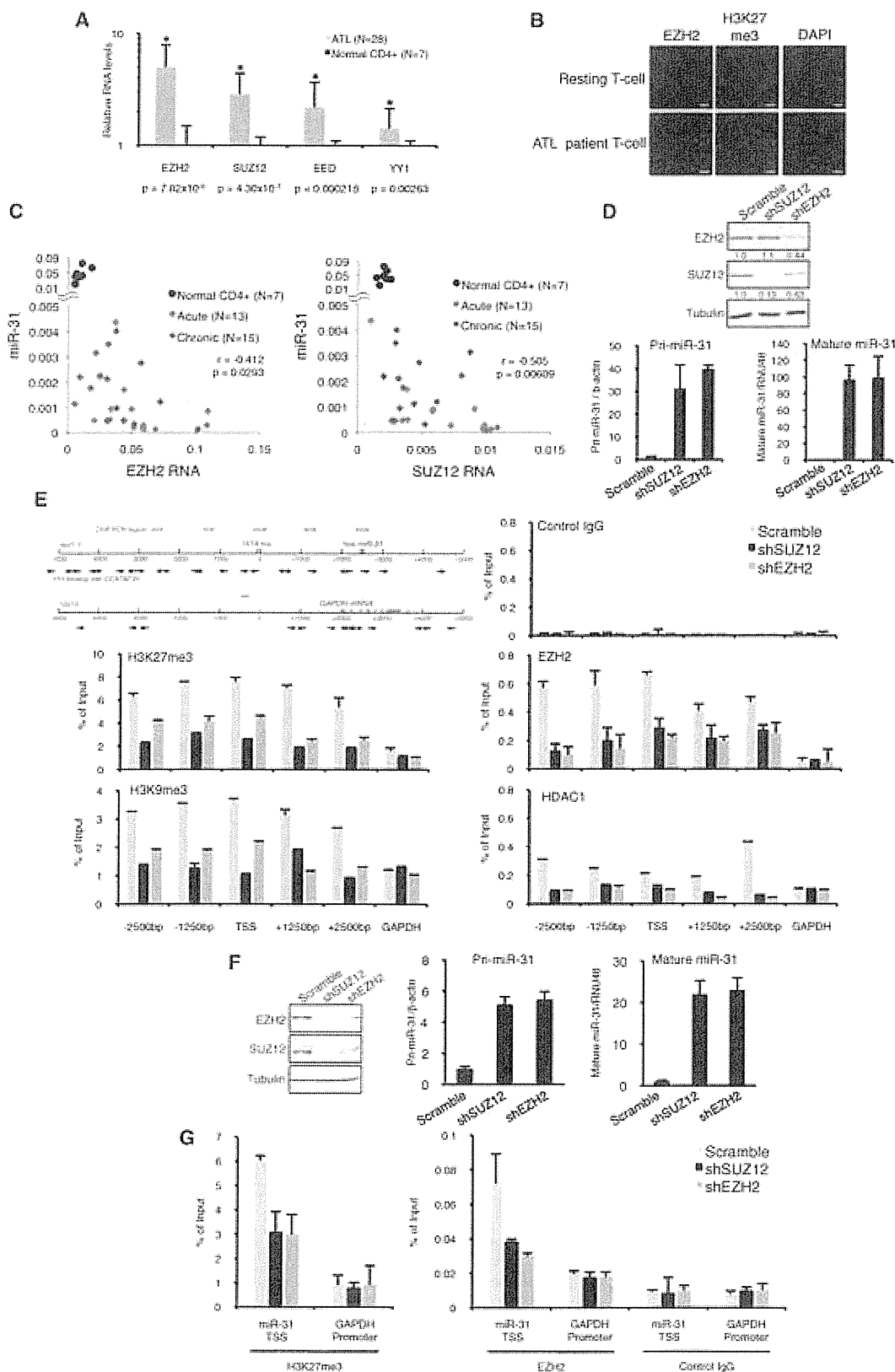
(C) PCR-based miR-31 quantifications in primary ATL samples. ATL samples without genomic loss in miR-31 region ($n = 9$, Figure S3B), and normal CD4+ T cells ($n = 7$) were tested. p values (ATL versus normal) are shown.

(D) YY1 binding motif cluster around transcriptional start site (TSS) of miR-31 region. Arrows represent positions of the motifs. Regions of PCR amplification for ChIP assay are shown.

(E) Repression-associated histone methylation in miR-31 region determined by ChIP assay ($n = 3$, mean \pm SD). The results of relative enrichment against input control are presented and distance from miR-31 TSS is described. *MYT1* and *GAPDH* promoters are as positive or negative controls, respectively.

(F–I) YY1-dependent EZH2 occupancy in miR-31 locus. (F) YY1 knockdown in TL-Om1 cells. qRT-PCR (left, $n = 3$, mean \pm SD) and western blotting (right) showed decreased YY1 level. (G) YY1 knockdown led to both primary and mature miR-31 restoration in TL-Om1 cells ($n = 3$, mean \pm SD). (H) YY1 occupancy in miR-31 region analyzed by ChIP ($n = 3$, mean \pm SD). YY1 occupancy in miR-31 locus was reduced by YY1 knockdown. (I) EZH2 occupancy in miR-31 region analyzed by ChIP ($n = 3$, mean \pm SD). YY1 knockdown inhibited EZH2 recruitment in miR-31 region.

(J) Aberrant accumulation of repression-associated histone methylations widely in miR-31 region of primary ATL cells. PBMCs freshly isolated from ATL patients ($n = 6$) were analyzed by ChIP assay. PBMC from healthy adults were used for normal controls. See also Figure S3.



including ATL, diffuse large B cell lymphoma (DLBCL), Hodgkin lymphoma, breast cancer, prostate cancer and others (Prasad et al., 2010). NF- κ B is also essential for various cell functions, including inflammation, innate immunity, and lymphocytic development (Hayden and Ghosh, 2008). Identification of NF- κ B determinants will lead to marked progress in understanding molecular pathology.

Our global analyses demonstrated an interesting miRNA expression signature as well as an aberrant mRNA expression profile, which may be associated with leukemogenesis in the primary ATL cells (Figures 1 and 6A). We revealed downregulation of tumor-suppressive miRNA including Let-7 family, miR-125b, and miR-146b, which can contribute to aberrant tumor cell signaling. Recent studies have suggested unique expression profiles of miRNAs in ATL (Yeung et al., 2008; Bellon et al., 2009), but loss of miR-31 has not been focused. Cellular amount of miRNAs may be susceptible to various environments such as transcriptional activity, maturation processing, and also epigenetic regulation. The end results appear to be affected by methodology employed and conditions and types of samples used. Our integrated expression profiling of primary ATL cells are based on a significantly larger number of samples and fruitfully provides intriguing information that may be useful in improving the understanding of T cell biology as well as in the identification of biomarkers for diagnosis.

Pleiotropy of miR-31 was first reported by Valastyan et al. (2009). The authors elegantly demonstrated the function of miR-31 in vivo and also identified several target genes that contribute to cell migration and invasiveness. In the present study, we focused on the functional significance of miR-31 in the regulation of NF- κ B signaling that contributes to tumor cell survival.

Overexpression of NIK acts as an oncogenic driver in various cancers. In the present study, NIK was identified as a miR-31 target based on several lines of evidence. First, luciferase-3' UTR reporter assay showed that NIK 3' UTR sequence has a role for negative regulation (Figure S1B). By combining a specific inhibitor and mutations in miR-31-binding site, we demonstrated that miR-31 recognizes and negatively regulates the NIK 3' UTR (Figures 2A and 2D). Second, by introducing a miR-31 precursor or inhibitor, we showed that amount of miR-31 inversely correlates with levels of NIK expression and downstream signaling (Figures 2E–2K). Third, genetic evidence indicated strong base pairing and biological conservation (Bartel, 2009) (Figures S1L–S1O). Our experimental approach illustrated that *mmu-miR-31* regulates mouse *Map3k14* gene. Fourth, individual assessments using gene expression data

clearly revealed an inverse correlation between the expression levels of miR-31 and NIK (Figure 3A). Collectively, we provide definitive evidence for the notion that miR-31 negatively regulates NIK expression and activity.

It is well known that the NIK level directly regulates NF- κ B activity in various cell types (Thu and Richmond, 2010). We experimentally showed that miR-31 regulates noncanonical NF- κ B activation stimulated by BAFF and CD40L, both of which are major B cell activating cytokines. Since signals from receptors are essential for the development and activity of B cells, the negative role of miR-31 in cytokines-induced NIK accumulation appears to be widely important in the noncanonical regulation of NF- κ B in B cells and other cell types (Figures 2H–2K). Again, our findings revealed the role of NIK in the regulation of canonical NF- κ B pathway. Strict regulation of NIK appears to be closely associated with the fate of lymphocytes.

The level of miR-31 was drastically suppressed in all tested primary ATL cells, and its magnitude is greater than that which has been reported in other cancers. Our results demonstrated a profound downregulation of miR-31 (fold change, 0.00403; Figure 1B) in all ATL cases, suggesting that miR-31 loss is a prerequisite for ATL development. Restoration of miR-31-repressed NF- κ B activity in ATL cells, resulting in impairment of the proliferative index and apoptosis resistance (Figure 3). Furthermore, our results demonstrate that inhibition of NF- κ B promotes tumor cell death in cell lines and also primary tumor cells from ATL patients (Figures 3 and 6), which are consistent with our previous observation (Watanabe et al., 2005). Since it is highly possible that miR-31 and relevant factors are pivotal in cancers, their expressions would have a great importance in view of biomarkers for the aberrant signaling and clinical outcomes.

By studying clinical samples and in vitro and ex vivo models, we obtained several biologically interesting results. First, we identified the Polycomb protein complex as a strong suppressor of miR-31. Generally, the Polycomb group constitutes a multimeric complex that negatively controls a large number of genes involved in cellular development, reproduction, and stemness (Sparmann and van Lohuizen et al., 2006). However, the key molecules involved in cancer development, progression, and prognosis are not yet fully understood. In breast and prostate cancers, oncogenic functions of EZH2 and NF- κ B activation were reported independently (Kleer et al., 2003; Varambally et al., 2002; Suh and Rabson, 2004). Interestingly, these tumors show low miR-31 levels (Valastyan et al., 2009; Schaefer et al., 2010). Recently, Min et al. (2010) reported that EZH2 activates NF- κ B by silencing the DAB2IP gene in prostate cancer cells.

Figure 5. Amount of PRC2 Components Epigenetically Links to miR-31 Expression in T Cells and Epithelial Cells

(A) Overexpression of PRC2 components in primary ATL cells measured by qRT-PCR (ATL, n = 28; normal, n = 7; mean \pm SD). These results were supported by the data of gene expression microarray (Table S3).

(B) Escalation of EZH2 protein and trimethylated H3K27 levels in primary ATL cells illustrated by immunocytochemistry (n = 4, a representative result is shown). Resting T cells were as normal control. Scale bars = 20 μ m.

(C) Statistical correlation among the levels of miR-31, EZH2, and SUZ12 in individual ATL samples. Correlation coefficients within ATL samples are shown in the graphs.

(D and E) Loss of PRC2 function causes chromatin rearrangement and miR-31 upregulation. (D) TL-Om1 cells expressing shSUZ12, shEZH2, and scrambled RNA were established by retroviral vector. The levels of EZH2, SUZ12, Pri-miR-31, and mature miR-31 were measured by western blotting and qRT-PCR (n = 3, mean \pm SD). (E) Results of ChIP assays with indicated antibodies (n = 3, mean \pm SD). Amounts of immunoprecipitated DNA were analyzed by region-specific PCR. GAPDH promoter served as a region control.

(F and G) Knockdown of Polycomb family proteins in MDA-MB-453 cells. (F) EZH2 and SUZ12 are shown by western blot. miR-31 level was examined by qRT-PCR (n = 3, mean \pm SD). (G) Histone methylation and EZH2 occupancy evaluated by ChIP assay (n = 3, mean \pm SD). See also Table S3 and Figure S4.

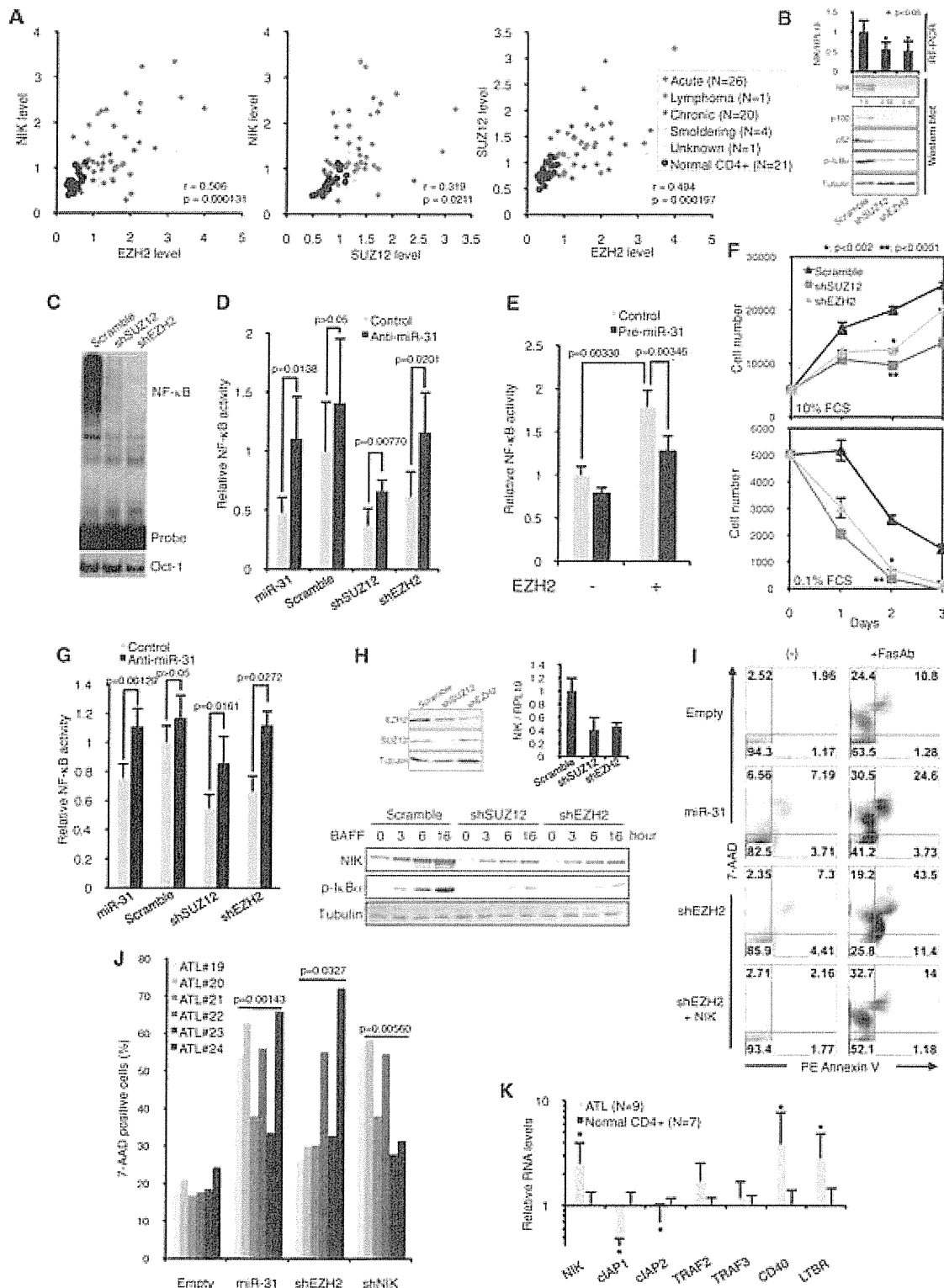


Figure 6. Epigenetic Change Driven by Polycomb Group Mediates NF- κ B Signaling through miR-31 Regulation (A) Reciprocal relationship of mRNA expression between *NIK* and Polycomb group in primary samples. Pearson's correlation coefficients among ATL samples are shown.

(B) PRC2 knockdown negatively affects NF- κ B signaling in TL-OM1 cells. After establishment of PRC2 knockdown, the levels of *NIK* RNA ($n = 4$, mean \pm SD) and proteins of *NIK*, *p52/p100*, and phospho-*I κ B α* were examined.

(C) Downregulation of NF- κ B activity in PRC2-disrupted cells detected by EMSA.

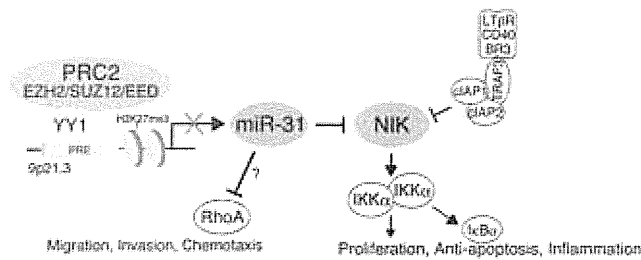


Figure 7. Proposed Model for ATL and Other Tumor Cells
Polycomb repressive factors are linked to NIK-dependent NF- κ B activation via miR-31 regulation.

In the present study, we found that the Polycomb group regulates miR-31 expression and that elevated expression of EZH2 leads to NF- κ B activation via NIK-miR-31 regulation in ATL and breast cancer cells (Figure 6). We also showed that restoration of miR-31 partially impaired Polycomb-mediated NF- κ B operation (Figures 6D, 6E, and 6G), suggesting that miR-31 is involved in this relationship. Furthermore, a connection between NIK and PRC2 was observed in B cells (Figure 6H). Polycomb group proteins are essential in lymphocyte development and activation (Su et al., 2003, 2005). Further, given the NF- κ B is a pivotal transcription regulator in normal and oncogenic functions, practical participations of epigenetic regulators and miR-31 in NF- κ B signaling will increase our understanding of the molecular mechanisms of T cell functions. For generalization of the molecular axis in other cancers and normal cells, further study will be needed.

Second, YY1 is a recruiter of PRC2 to the miR-31 region. In humans, the Polycomb response element (PRE) has not been precisely identified. A good candidate for a mammalian recruiter of PRC2 is YY1, the homolog of *D. melanogaster* PHO (Simon and Kingston, 2009). We found an assembly of the YY1 binding motif in the miR-31 locus and demonstrated that YY1 knockdown dislodged EZH2 in this region (Figure 4I), which supports previous findings (Caretta et al., 2004). The detailed mechanism by which YY1 mediates recruitment of the Polycomb family may be important in the context of epigenetic regulation of orchestrated gene expression and T cell functions.

Third, Polycomb family proteins can control miRNA expression in an epigenetic fashion. The amount of PRC2 factors strongly influenced the degree of suppression of miR-31 expres-

sion (Figure 5). We speculate that, in addition to controlling the transcription, the Polycomb group can modulate translation via miRNA regulation. Furthermore, miR-101 and miR-26a are known to regulate EZH2 expression (Sander et al., 2008; Varambally et al., 2008), which is supported by our observation (Figure S4C). This signaling circuit will permit multiple gene regulation. Whereas genetic loss at the miR-31 locus is observed in some cases of ATL (Figure 4A), no genetic deletion in the miR-101-1 or miR-101-2 region was detected in ATL, which is not consistent with a previous finding in prostate cancer. Our results also suggested putative association between Let-7 family and EZH2 (Figure S4). Aberrant downregulations of these miRNAs in the primary ATL cells will be the next important questions to be addressed in efforts to improve understanding of the oncogenic signaling network.

By collaborative profiling of miRNA and mRNA expression, we identified a notable relationship between ATL subtypes and a gene cluster that contains miR-31, NIK, EZH2, and SUZ12. This finding suggests that an aberrant gene expression pattern correlates with the malignant phenotype, and this provides important clues about clinical manifestations and may help identify therapeutic targets against ATL cells (Figure 6A). Although HDAC inhibitors did not show effective responses (Figures S4I and S4J), emerging epigenetic drug such an EZH2 inhibitor (Fiskus et al., 2009) may pave a pathway leading to cures for various malignancies that involve constitutive activation of NF- κ B.

In summary, we show that genetic and epigenetic loss of miR-31 is responsible for oncogenic NF- κ B activation and malignant phenotypes in ATL. This provides evidence for the idea that miR-31 is an important tumor suppressor. An emerging pathway involving an epigenetic process, miR-31, and NF- κ B will provide a conceptual advance in epigenetic reprogramming, inflammatory signaling, and oncogenic addiction.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Lines and Primary ATL Cells

The primary peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from ATL patients and healthy volunteers used in the present work were a part of those collected with an informed consent as a collaborative project of the Joint Study on Prognostic Factors of ATL Development (JSPFAD). The project was approved by the Institute of Medical Sciences, the University of Tokyo (IMSUT) Human Genome Research Ethics Committee. Additional ATL clinical samples for copy number analysis were provided by Drs. Y. Yamada, Nagasaki University,

(D) NF- κ B activity evaluated by reporter assays in the presence or absence of miR-31 inhibitor ($n = 5$, mean \pm SD). Anti-miR-31 treatment partially rescued the NF- κ B activity in PRC2 knockdown TL-Om1 cells.

(E) Overexpressed EZH2 activates NF- κ B via miR-31. Jurkat cells were transfected with an EZH2 plasmid together with miR-31 precursor or control RNA ($n = 5$, mean \pm SD).

(F) PRC2 dysfunction changes TL-Om1 cell proliferation and response to serum starvation. Under conditions of 10% or 0.1% of FCS, cell growth curves were examined ($n = 3$, mean \pm SD). PRC2 downregulation decreased cell growth with statistical significance.

(G) NF- κ B activity in PRC2-knockdown MDA-MB-453 cells in the presence or absence of miR-31 inhibitor were examined ($n = 5$, mean \pm SD).

(H) PRC2 disruption inhibits BAFF-dependent NIK accumulation and I κ B α phosphorylation in BJAB cells.

(I) Apoptotic cell death induced by lentivirus-mediated EZH2 knockdown in TL-Om1. Venus-positive populations were analyzed by Annexin V/7-AAD stainings ($n = 3$) and representative of FACS data are shown.

(J) Summary of primary tumor cell death. Lentivirus-based miR-31 expression, NIK knockdown, and EZH2 knockdown showed killing effects in six primary ATL samples. Statistical significances are shown in the graph. Results of FACS and qRT-PCR are shown in Figures S5I and S5J.

(K) Expression levels of genes involved in noncanonical NF- κ B pathway in primary ATL cells (ATL, $n = 9$; normal, $n = 7$; mean \pm SD). Relative expression levels were tested by qRT-PCR ($p < 0.05$). See also Figure S5.

and K. Ohshima, Kurume University, where the projects were approved by the Research Ethics Committees of Nagasaki University and Kurume University, respectively. PBMC were isolated by Ficoll separation. ATL cells, primary lymphocytes, and all T cell lines were maintained in RPMI1640 supplemented with 10% of FCS and antibiotics. Clinical information of ATL samples is provided in Table S1.

Expression Analyses

Clinical samples for microarrays were collected by a collaborative study group, JSPFAD (Iwanaga et al., 2010). Gene expression microarray was used 4x44K Whole Human Genome Oligo Microarray (Agilent Technologies) and miRNA microarray was used Human miRNA microarray kit v2 (Agilent Technologies), respectively. Quantitative RT-PCR was performed with SYBRGreen (TAKARA). Mature miRNA assays were purchased from Applied Biosystems.

Copy Number Analyses

Genomic DNA from ATL patients was provided from the material bank of JSPFAD, Nagasaki University, and Kurume University, and was analyzed by Affymetrix GeneChip Human Mapping 250K Nsp Array (Affymetrix). Obtained data were analyzed by CNAG/AsCNAR program (Chen et al., 2008).

Oligonucleotides, Plasmids, and Retrovirus Vectors

All RT-PCR primers and oligonucleotides are described in Supplemental Experimental Procedures. miRNA precursor and inhibitor were from Applied Biosystems. Transfection of small RNA and other plasmid DNA were performed by Lipofectamine2000 (Invitrogen). For miRNA or shRNA expression, retroviral vectors (pSINsi-U6, TAKARA) were used.

3' UTR-Conjugated miR-31 Reporter Assay

HeLa cells were cotransfected with 3' UTR-inserted pMIR-REPORT firefly plasmid (Ambion), RSV-Renilla luciferase plasmid, and miRNA inhibitor. The cells were collected at 24 hr posttransfection, and Dual-luciferase reporter assay was performed (Promega).

Analysis of NF- κ B Pathway

NF- κ B activity was evaluated by EMSA and reporter assays as previously described (Horie et al., 2004). Antibodies for western blots are described in supplemental information. Cell proliferative assay was performed by Cell Counting Kit-8 (Dojindo).

Lentivirus Vectors and Apoptosis Analysis

A lentivirus vector (CS-H1-EVBSd) was provided from RIKEN, BRC, Japan. Lentivirus solution was produced by cotransfection with packaging plasmid (pCAG-HIVgp) and VSV-G- and Rev-expressing plasmid (pCMV-VSV-G-RSV-Rev) into 293FT cells. After infection of lentivirus, the apoptotic cell was evaluated by PE Annexin V / 7-AAD staining (BD Pharmingen) and analyzed by FACS Calibur (Becton, Dickinson). Collected data were analyzed by FlowJo software (Tree Star).

ChIP Assay

ChIP assay was previously described (Yamagishi et al., 2009). Briefly, cells were crosslinked with 1% of formaldehyde, sonicated, and subjected to chromatin-conjugated IP using specific antibodies. Precipitated DNA was purified and analyzed by real-time PCR with specific primers (see Supplemental Experimental Procedures).

Computational Prediction

To identify miR-31 target genes, we integrated the output results of multiple prediction programs: TargetScan, PicTar, miRanda, and PITA. RNAhybrid was for secondary structure of miRNA-3' UTR hybrid. TSSG program was for TATA box and TSS predictions. DNA methylation site was predicted by CpG island Searcher.

Statistical Analyses

Data were analyzed as follows: (1) Welch's t test for Gene Expression Microarray (p value cutoff at 10^{-3}) and miRNA Microarray (p value cutoff at 10^{-5}); (2) Pearson's correlation for two-dimensional hierarchical clustering analysis

and individual assessment of microarray data sets; (3) two-tailed paired Student's t test with $p < 0.05$ considered statistically significant for in vitro cell lines and primary cells experiments, including luciferase assay, RT-PCR, ChIP assay, cell growth assay, and migration assay. Data are presented as mean \pm SD.

ACCESSION NUMBERS

Coordinates have been deposited in Gene Expression Omnibus database with accession numbers, GSE31629 (miRNA microarray), GSE33615 (gene expression microarray), and GSE33602 (copy number analyses).

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes three tables, five figures, and Supplemental Experimental Procedures and can be found with this article online at doi:10.1016/j.ccr.2011.12.015.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. M. Iwanaga, Mr. M. Nakashima, and Ms. T. Akashi for support and maintenance of JSPFAD. We thank Drs. H. Miyoshi and A. Miyawaki for providing the Venus-encoding lentivirus vectors. We also thank Dr. R. Horie for experimental advices, and Drs. T. Kanno and T. Ishida for providing the MDA-MB-453. Grant support: Grants-in-Aid for Scientific Research from Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan to T.W. (No. 23390250) and by Grants-in-Aid from the Ministry of Health, Labour and Welfare to T.W. (H21-G-002 and H22-AIDS-I-002).

Received: November 3, 2010

Revised: August 12, 2011

Accepted: December 19, 2011

Published: January 17, 2012

REFERENCES

Annunziata, C.M., Davis, R.E., Demchenko, Y., Boffamy, W., Gabrea, A., Zhan, F., Lenz, G., Hanamura, I., Wright, G., Xiao, W., et al. (2007). Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell* 12, 115–130.

Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215–233.

Bellón, M., Lepelletier, Y., Hermine, O., and Nicot, C. (2009). Deregulation of microRNA involved in hematopoiesis and the immune response in HTLV-I adult T-cell leukemia. *Blood* 113, 4914–4917.

Carettil, G., Di Padova, M., Micales, B., Lyons, G.E., and Sartorelli, V. (2004). The Polycomb Ezh2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal muscle differentiation. *Genes Dev.* 18, 2627–2638.

Chen, Y., Takita, J., Choi, Y.L., Kato, M., Ohira, M., Sanada, M., Wang, L., Soda, M., Kikuchi, A., Igarashi, T., et al. (2008). Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature* 455, 971–974.

Davis, B.N., Hilyard, A.C., Lagna, G., and Hata, A. (2008). SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* 454, 56–61.

Fiskus, W., Wang, Y., Sreekumar, A., Buckley, K.M., Shi, H., Jillella, A., Ustun, C., Rao, R., Fernandez, P., Chen, J., et al. (2009). Combined epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A and the histone deacetylase inhibitor panobinostat against human AML cells. *Blood* 114, 2733–2743.

Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132, 344–362.

Hironaka, N., Mochida, K., Mori, N., Maeda, M., Yamamoto, N., and Yamaoka, S. (2004). Tax-independent constitutive I kappaB kinase activation in adult T-cell leukemia cells. *Neoplasia* 6, 266–278.

Horie, R., Watanabe, M., Ishida, T., Koiwa, T., Aizawa, S., Itoh, K., Higashihara, M., Kadin, M.E., and Watanabe, T. (2004). The NPM-ALK oncoprotein

- abrogates CD30 signaling and constitutive NF- κ B activation in anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Cell* 5, 353–364.
- Iwanaga, M., Watanabe, T., Utsunomiya, A., Okayama, A., Uchimar, K., Koh, K.R., Ogata, M., Kikuchi, H., Sagara, Y., Uozumi, K., et al. (2010). Joint Study on Predisposing Factors of ATL Development investigators. (2010). Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) proviral load and disease progression in asymptomatic HTLV-1 carriers: a nationwide prospective study in Japan. *Blood* 116, 1211–1219.
- Kleer, C.G., Cao, Q., Varambally, S., Shen, R., Ota, I., Tomlins, S.A., Ghosh, D., Sewalt, R.G., Otte, A.P., Hayes, D.F., et al. (2003). EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 11606–11611.
- Liao, G., Zhang, M., Harhaj, E.W., and Sun, S.C. (2004). Regulation of the NF- κ B-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation. *J. Biol. Chem.* 279, 26243–26250.
- Malinin, N.L., Boldin, M.P., Kovalenko, A.V., and Wallach, D. (1997). MAP3K-related kinase involved in NF- κ B induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 385, 540–544.
- Min, J., Zaslavsky, A., Fedele, G., McLaughlin, S.K., Reczek, E.E., De Raedt, T., Guney, I., Strohlic, D.E., Macconelli, L.E., Beroukhim, R., et al. (2010). An oncogene-tumor suppressor cascade drives metastatic prostate cancer by coordinately activating Ras and nuclear factor- κ B. *Nat. Med.* 16, 286–294.
- Prasad, S., Ravindran, J., and Aggarwal, B.B. (2010). NF- κ B and cancer: how intimate is this relationship. *Mol. Cell. Biochem.* 336, 25–37.
- Ramakrishnan, P., Wang, W., and Wallach, D. (2004). Receptor-specific signaling for both the alternative and the canonical NF- κ B activation pathways by NF- κ B-inducing kinase. *Immunity* 21, 477–489.
- Saitoh, Y., Yamamoto, N., Dewan, M.Z., Sugimoto, H., Martinez Bruyn, V.J., Iwasaki, Y., Matsubara, K., Qi, X., Saitoh, T., Imoto, I., et al. (2008). Overexpressed NF- κ B-inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells. *Blood* 111, 5118–5129.
- Sander, S., Bullinger, L., Klapproth, K., Fiedler, K., Kestler, H.A., Barth, T.F., Möller, P., Stübenbauer, S., Pollack, J.R., and Wirth, T. (2008). MYC stimulates EZH2 expression by repression of its negative regulator miR-26a. *Blood* 112, 4202–4212.
- Schaefer, A., Jung, M., Mollenkopf, H.J., Wagner, J., Stephan, C., Jentzmik, F., Miller, K., Lein, M., Kristiansen, G., and Jung, K. (2010). Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *Int. J. Cancer* 126, 1166–1176.
- Simon, J.A., and Kingston, R.E. (2009). Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 697–708.
- Sparmann, A., and van Lohuizen, M. (2006). Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 846–855.
- Su, I.H., Basavaraj, A., Krutchinsky, A.N., Hobert, O., Ullrich, A., Chait, B.T., and Tarakhovskiy, A. (2003). Ezh2 controls B cell development through histone H3 methylation and Igh rearrangement. *Nat. Immunol.* 4, 124–131.
- Su, I.H., Dobenecker, M.W., Dickinson, E., Osor, M., Basavaraj, A., Marqueron, R., Viale, A., Reinberg, D., Wülfing, C., and Tarakhovskiy, A. (2005). Polycomb group protein ezh2 controls actin polymerization and cell signaling. *Cell* 121, 425–436.
- Suh, J., and Rabson, A.B. (2004). NF- κ B activation in human prostate cancer: important mediator or epiphenomenon? *J. Cell. Biochem.* 91, 100–117.
- Thu, Y.M., and Richmond, A. (2010). NF- κ B inducing kinase: a key regulator in the immune system and in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 213–226.
- Trabucchi, M., Briata, P., Garcia-Mayoral, M., Haase, A.D., Filipowicz, W., Ramos, A., Gherzi, R., and Rosenfeld, M.G. (2009). The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs. *Nature* 459, 1010–1014.
- Valastyan, S., Reinhardt, F., Bonaich, N., Calogrias, D., Szász, A.M., Wang, Z.C., Brock, J.E., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. (2009). A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis. *Cell* 137, 1032–1046.
- Varambally, S., Dhanasekaran, S.M., Zhou, M., Barrette, T.R., Kumar-Sinha, C., Sanda, M.G., Ghosh, D., Pienta, K.J., Sewalt, R.G., Otte, A.P., et al. (2002). The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 419, 624–629.
- Varambally, S., Cao, Q., Mani, R.S., Shankar, S., Wang, X., Ateeq, B., Laxman, B., Cao, X., Jing, X., Ramnarayanan, K., et al. (2008). Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. *Science* 322, 1695–1699.
- Ventura, A., and Jacks, T. (2009). MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way. *Cell* 136, 586–591.
- Watanabe, M., Ohsugi, T., Shoda, M., Ishida, T., Aizawa, S., Maruyama-Nagai, M., Utsunomiya, A., Koga, S., Yamada, Y., Kamihira, S., et al. (2005). Dual targeting of transformed and untransformed HTLV-1-infected T cells by DHMEQ, a potent and selective inhibitor of NF- κ B, as a strategy for chemoprevention and therapy of adult T-cell leukemia. *Blood* 106, 2462–2471.
- Yamagishi, M., Ishida, T., Miyake, A., Cooper, D.A., Kelleher, A.D., Suzuki, K., and Watanabe, T. (2009). Retroviral delivery of promoter-targeted shRNA induces long-term silencing of HIV-1 transcription. *Microbes Infect.* 11, 500–508.
- Yamaguchi, K., and Watanabe, T. (2002). Human T lymphotropic virus type-I and adult T-cell leukemia in Japan. *Int. J. Hematol.* 76 (Suppl 2), 240–245.
- Yeung, M.L., Yasunaga, J., Bennisser, Y., Dusetti, N., Harris, D., Ahmad, N., Matsuoka, M., and Jeang, K.T. (2008). Roles for microRNAs, miR-93 and miR-130b, and tumor protein 53-induced nuclear protein 1 tumor suppressor in cell growth dysregulation by human T-cell lymphotropic virus 1. *Cancer Res.* 68, 8978–8985.
- Zamegar, B.J., Wang, Y., Mahoney, D.J., Dempsey, P.W., Cheung, H.H., Ho, J., Shiba, T., Yang, X., Yeh, W.C., Mak, T.W., et al. (2008a). Noncanonical NF- κ B activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK. *Nat. Immunol.* 9, 1371–1378.
- Zamegar, B.J., Yamazaki, S., He, J.Q., and Cheng, G. (2008b). Control of canonical NF- κ B activation through the NIK-IKK complex pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 3503–3508.

Person 人と研究

成人T細胞白血病の分子レベルの全体像と、Polycomb – miR-31 – NF- κ B経路の異常

Yamagishi M, Nakano K, Miyake A, et al: Polycomb-mediated loss of miR-31 activates NIK-dependent NF- κ B pathway in adult T cell leukemia and other cancers. *Cancer Cell* 21: 121-135, 2012

山岸 誠 Makoto Yamagishi

東京大学大学院新領域創成科学研究科メデイカルゲノム専攻病態医療科学分野



はじめに

成人T細胞白血病(adult T-cell leukemia/lymphoma; ATL)はヒトT細胞白血病ウイルス I型(human T-cell leukemia virus type 1; HTLV-1)の感染によって引き起こされる重篤なT細胞性白血病/リンパ腫である。50~60年という長い潜伏期間にHTLV-1感染T細胞に複数の遺伝子異常が蓄積し、きわめて予後不良なATLを発症する。

ATL細胞およびHTLV-1感染細胞の生物学的な特徴として、恒常的なNF- κ B(nuclear factor- κ B)シグナル経路の活性化があり、これによって細胞の異常な増殖および生存が確保されているが、通常Taxの発現が認められないATL腫瘍細胞におけるNF- κ Bの活性化メカニズムは不明な点が多かった。NF- κ Bシグナルの異常な活性化とそれに伴う腫瘍細胞の生存能の獲得と悪性化は、ATLを含む悪性リンパ腫や白血病、固形がんに通じてみられるがん細胞の特徴の1つであり、その原因解明はがん研究全体の課題である。

これまでのATL研究の多くは細胞株か、少数の患者由来細胞から得られた情報を基盤としたものが主であり、実際のATL細胞を分子レベルで正確に理解することがATL/HTLV研究において最重要課題であった。そこで私たちは、ATLのmiRNA(micro RNA)とmRNAの発現解析およびゲノム異常の解析を統合してATLの分子病態の全貌にアプローチした。

ATL臨床検体を用いた大規模統合解析からみるATLの分子病態

私たちはまず、全国的なHTLV-1疫学調査および検体バンク組織Joint Study on Predisposing Factors of ATL Development(JSPFAD)[<http://htlv.org/>]の全面的な協力を得て、ATLの臨床検体を用いたmiRNAおよびmRNAの大規模発現解析に着手した。miRNAマイクロアレイを用いてATL 40例、正常CD4⁺T細胞22例について解析を行った結果、非常に厳しい検定をクリアした61個のmiRNAの発現異常を同定した。他のがん細胞の報告と同様に、ATL細胞ではmiRNAのレベルが全体的に減少していることがわかった。また、ATLのmiRNA発現パターンはユニークであり、miRNAの発現をもって正常T細胞と区別ができることもわかった。この61個のmiRNAの中で1番差の大きいmiR-31は、正常T細胞では比較的発現量が高く、一方でATL細胞では例外なく発現が激減、もしくは検出限界以下であった(図1)。miR-31の減少は乳がん細胞の転移能¹⁾をはじめとするさまざまな細胞機能に影響することが報告されており、T細胞における発現の欠損が細胞の運命に重要な意味を包含すると考えられた。

miR-31の発現減少とその生物学的意義

miRNAの主な生物学的機能は、標的遺伝子の3'UTRに結合することによって遺伝子発現を負に制御することである。外来の合成siRNA(small inter-

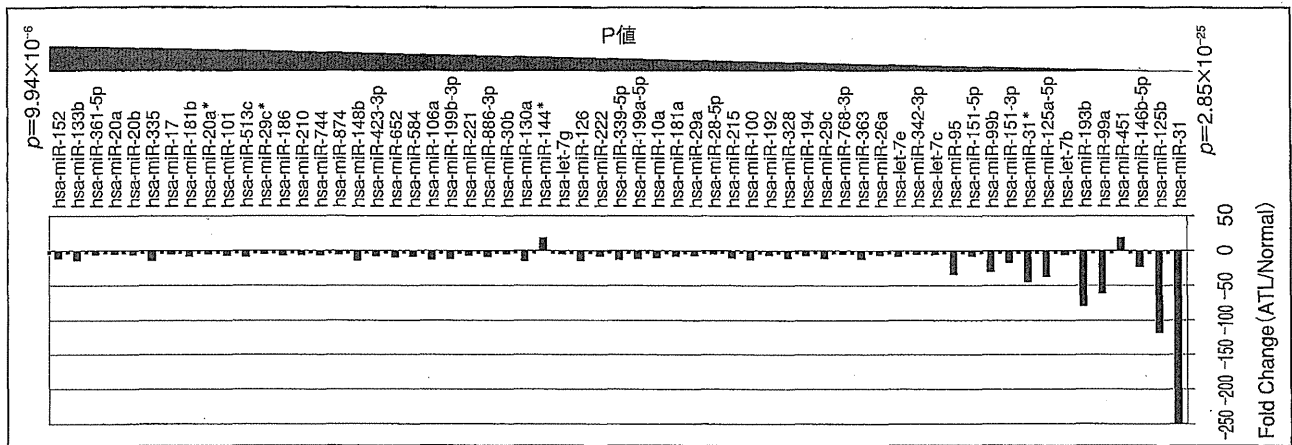


図1 ATL細胞におけるmiRNAの発現パターン

ATL 40例と正常CD4⁺T細胞22例について網羅的なmiRNA発現解析を行い、異常を示したmiRNAを倍率変化(fold-change; FC)で示した。ATLで異常を示したmiRNAは、そのほとんどが減少傾向であった。miR-31は正常T細胞に比べて250分の1に低下していた。

fering RNA)と異なり、miRNAの配列認識は揺らぎが特徴的であり、1つのmiRNAが複数個の遺伝子を制御することができる。生理的に重要な標的遺伝子の探索には、物理的な抑制効果と同時に遺伝子側の機能や挙動も重要な指標となり、したがって多角的な実験的検証が必須である。私は、T細胞におけるmiR-31の生物学的意義を明らかにするために、①miR-31の標的遺伝子の予測を4つのアルゴリズムによって予測、②ATL細胞のmRNA大規模解析データとの擦り合わせによる検証、③変異を導入したレポーターアッセイ、④miR-31の増減に対する標的候補遺伝子の定量、⑤miR-31と標的遺伝子の関係の保存性の確認、を行うことにより、結果としてNF-κB inducing kinase(NIK)がmiR-31の新規標的遺伝子であることを明らかにした。NIKはNF-κBの非定型的経路の活性化に必須のリン酸化酵素であり、NIKの発現上昇がNF-κBシグナルの恒常的活性化に直接的に寄与することが複数のがん種で報告されている。ATLではNIKのmRNA量が増加していることがわかってきたが²⁾、その原因は明らかにされていなかった。ATL患者から樹立された細胞株にmiR-31を過剰発現させると、NIK mRNAおよび蛋白質レベルが低下し、NF-κBの活性レベルが低下することがわかった。これらの細胞では細胞増殖レベルの低下、抗アポトーシス遺伝子の発現低下、アポトーシス感

受性の向上、がみられた。さらにmiR-31を発現誘導するレンチウイルスベクターは、ATL患者から直接取り出した腫瘍細胞をアポトーシスに誘導することがわかった(後述)。以上より、miR-31の発現低下はATL細胞の生存にとって重要であり、その分子メカニズムはNIKの過剰発現の誘導であることが示された。NF-κBシグナルは非常に複雑な制御機構を備えているが、本研究によりmiR-31が新たなNF-κB抑制因子として同定された。

ゲノムおよびエピゲノムの異常とmiR-31の発現制御

ATL全例で発現欠損があるmiR-31は、転移性乳がんや前立腺がんなどでも発現が減少しており、がん細胞における一般性と重要性が示唆されたが、いずれもmiR-31レベルが減少するメカニズムは不明であった。hsa-miR-31は、多くのがん細胞でゲノムの欠失が頻発する9p21.3のCDKN2A/B領域に隣接しており、ATLにおいてもゲノムの不安定性が予測された。私たちが行ったATL 168症例の大規模なDNAコピーナンバー解析の結果、12.5%の症例でmiR-31ゲノムのホモもしくはヘテロの欠損があることがわかった。一方で、同症例におけるmiRNA発現解析から、遺伝子が正常な症例でもmiR-31レベルが大きく減少していることがわかったが、転写ユニットにお

いてCpGアイランドがなく、どのように発現が抑制されるか見当もつかなかった。

私はmiR-31の転写制御の問題を抱えつつ、米国で行われていたエピジェネティックに関連するKeystoneシンポジウムに参加し、著名な研究者が揃って転写抑制に関わるPolycombファミリーのリクルーターとしてYY1に注目している事実を知った。そこですぐにmiR-31のゲノム領域について調べたところ、YY1の結合配列が非常に強く蓄積していることに幸運にも気がついた。帰国後、早速YY1のノックダウン実験を行ったところ、miR-31領域DNAに結合するYY1のレベルが低下し、それに付随してヒストンH3K27のメチル化酵素であるEZH2のリクルートが減少することがわかった。

ではATL細胞をはじめとする高悪性度の腫瘍において、なぜmiR-31の発現が激減するのか？ 発現解析の結果、ATLではPolycomb複合体(Polycomb repressive complex2; PRC2)の活性中心であるEZH2およびSUZ12が正常T細胞に比べて高発現していることがわかった。ATL細胞株においてこれらの因子をノックダウンすると、miR-31ゲノム領域に結合するPRC2が低下し、転写抑制に働くH3K27およびH3K9のメチル化レベルが低下した。さらに、ヒストン脱アセチル化に関わるHDAC1の結合レベルも低下し、結果としてmiR-31の発現が回復することがわかった。

ATL患者由来腫瘍細胞においてもmiR-31領域にヒストンのメチル化の蓄積を検出したこと、またEZH2のノックダウンにより患者由来細胞にアポトーシスを誘導した実験データは、上記の分子機構をサポートすると同時に、ATL細胞におけるPolycomb依存性なエピジェネティックな異常の存在を直接示した。また同様の分子メカニズムが好転移性乳がん細胞やB細胞株においても保存されていたことも明らかにすることができた。

PolycombファミリーによるmiR-31制御を介したNF- κ B経路への影響

miR-31はNIKのほかRhoA, Radixin, Integrin

α 5, FoxP3, FIH, E2F2など、さまざまな遺伝子を負に制御し、細胞の運命に強く影響する。一方でPolycombファミリーは悪性リンパ腫、白血病、固形がんの増殖、生存、浸潤能に重要な因子であるが、細胞の表現型に影響する責任遺伝子は不明であった。私は本研究で明らかとなった、①miR-31によるNIK-NF- κ B経路の制御と、②PolycombファミリーによるmiR-31の発現制御を統合し、PolycombファミリーがNIK依存性なNF- κ B経路の制御に関わる、という仮説を立てた。

ATL細胞株においてEZH2もしくはSUZ12をノックダウンすると、上記のようにmiR-31の発現が誘導され、このときNIKのレベルが低下することによって下流のシグナルが停止し、NF- κ B活性レベルが低下した。さらにこれらの細胞では細胞増殖および細胞死抵抗性が低下した。さらにこれらの分子レベルの関係は乳がん細胞株や、B細胞における活性化刺激に対する応答反応においても観察されたことから、がん細胞シグナルだけでなく、正常細胞のシグナルの調節にも重要であることが示された。Polycombファミリー、NF- κ B経路、miR-31はそれぞれが単独で多彩な機能によって、細胞の恒常性や分化などのさまざまなプロセスに関わると同時に、さらにクロストークを形成することによって、より複雑な遺伝子発現制御ネットワークを形成していると考えられる。

新規分子標的としての応用へ

Polycombの過剰発現、miR-31の発現欠損、NIKの上昇とNF- κ Bの恒常的活性化は、いずれもATLの臨床検体から明らかになった。私は本研究の総括として、これらの分子レベルの特徴が腫瘍細胞の生存にどのように影響するかを検討した。miR-31の強制発現、EZH2もしくはNIKのノックダウンを行うレンチウイルスベクターを作製し、患者由来腫瘍細胞に直接導入することによって*ex vivo*での評価を行った。その結果、ある程度の個人差をもって、いずれのレンチウイルスも複数のATL症例で強烈的なアポトー

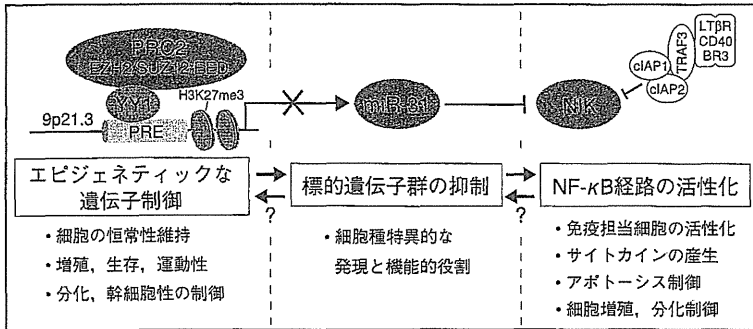


図2 ATLの研究から明らかとなった新たなクロストーク

Polycomb, miRNA, NF-κBシグナル経路は、それぞれが遺伝子発現制御の上流に位置し、細胞の恒常性や分化などのさまざまなプロセスに関わる。本研究で明らかとなったクロストークによって、より複雑な遺伝子発現制御ネットワークを形成していると考えられる。このクロストークはさまざまな細胞で保存されており、各因子の存在量のバランスによって均衡が保たれている。バランスを崩した細胞は悪性化をたどると考えられる。

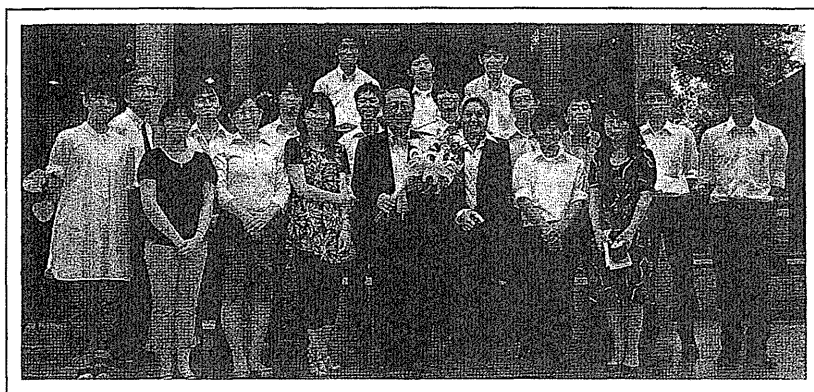


図3 集合写真

シスを誘導することがわかった。同様の処理は正常の末梢血単核球もしくはT細胞に対しては効果が微弱であり、分子レベルの異常なバランスがATL細胞の生存に寄与していることが示された。これらの結果は、miR-31がATL細胞特異的な細胞障害性をもつことを示しており、ATL細胞特異的な導入法を開発することにより、ATLの新規治療法につながる可能性をもつと考えられる。

研究から見たこと

本研究は、ATLにおける新たな分子標的とNF-κBの活性化機序を明らかにしたとともに、Polycombによるエピジェネティックな制御、miRNAによる細胞運命の決定、NF-κBシグナル経路による免疫細胞および腫瘍細胞の分子基盤、という3つのコンテキストに新たな生物学的リンクを見出すことができた(図2)³⁾。ATL研究から得られた知見が、基礎および臨床の双方に対して貢献することを期待している。

本研究はJSPFADにご参加いただいた多くの

HTLV-1キャリア、ATL患者の皆様のご協力と、関連施設の多くの先生方のご助力によって達成されたものである。本研究の結論はシンプルなものであるが、貴重な臨床検体から得た膨大な情報は今後の臨床研究にも役立つはずである。

miRNAの異常発現の発見からスタートした本研究は、臨床サンプルのきれいさと網羅的解析データの正確性のおかげで比較的スムーズに進んだ

が、一方で実際のmiRNAによる標的遺伝子予測と実験的検証では食い違うことが多く、実際にmiR-31の標的となる遺伝子は少なかった。予測だけに頼らず、実験的検証が重要であることを思い知った研究でもあった。またYY1による抑制の発見は幸運であり、視野を広げることの大切さも学んだ。多くの先生方にご指導いただきながら本研究が1つの結論に至ったことを感謝し、特に指導して下さった渡邊俊樹教授にこの場を借りて深謝致します(図3)。

文献

- 1) Valastyan S, Reinhardt F, Benaich N, et al : A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis. *Cell* **137** : 1032-1046, 2009
- 2) Saitoh Y, Yamamoto N, Dewan MZ, et al : Overexpressed NF-kappaB-inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells. *Blood* **111** : 5118-5129, 2008
- 3) Yamagishi M, Watanabe T : Molecular hallmarks of adult T cell leukemia. *Front Microbiol* **3** : 334, 2012

【成人T細胞白血病(ATL)におけるmicroRNAの発現異常】

Abnormal expression of miRNA in Adult T Cell Leukemia

山岸 誠・渡邊 俊樹

Makoto Yamagishi Toshiki Watanabe

Key words

expression profile, genome-wide analysis, epigenetics, signal transduction, JSPFAD

要 約

T細胞白血病(ATL)は、母乳を介したHTLV-1感染の後、約50年以上の臨床的潜伏期間の後に発症する。感染T細胞はウイルス遺伝子産物により不死化し、遺伝子異常の蓄積を介して腫瘍化して発症する。しかし、不死化と腫瘍化に関わる遺伝子の実体と分子機構は未だに不明である。がん研究の領域でmicroRNA(miRNA)発現異常の意義が広く認められている。HTLV-1/ATLの領域でも幾つかの先行研究の報告があったが、情報は不十分であった。筆者らはHTLV-1感染者コホート共同研究組織JSPFADの全面的協力を得て、世界で初めてATL細胞のDNA, mRNA, miRNAの大規模な統合解析を完了した。その結果、miRNA-31(miR-31)がすべてのATL患者検体で著明な減少を示すことを見いだした。miR-31の減少は新たに同定した標的遺伝子NIKの過剰発現とそれに伴うNF- κ Bシグナルの恒常的活性化を誘発すること、miR-31を再導入するとNF- κ B経路が不活化され細胞死が誘導される事を示した。miR-31の発現欠失の原因が、ゲノムの欠損及びPolycombファミリー依存的なエピジェネティックな異常であることも明らかにした。またATLだけでなく乳がん細胞やB細胞における免疫応答反応でも同機構が保存されていることがわかった。従ってPolycombファミリー、miR-31、NIKのバランスが細胞の運命に重要であることが示された。Polycombファミリーの異常は種々のがん細胞で注目されており、重要な分子標的となる。miRNAを介したPolycombとNF- κ Bのクロストークは新たな概念であり、本研究の成果によりエピジェネティックな異常がNF- κ Bの恒常的活性化を介してアポトーシス抵抗性の獲得に寄与することが明らかとなった。

はじめに

成人T細胞白血病(Adult T cell Leukemia, ATL)はヒトT細胞白血病ウイルスI型(Human T cell Leukemia Virus type 1, HTLV-1)の感染によって引き起こされる重篤なT細胞性白血病/リンパ腫である。50~60年という長い潜伏期間にHTLV-1感染末梢血T細胞に複数の遺伝子異常が蓄積しがん化が引き起こされる。現在世界には2000万人以上の感染者がいるとされるが、日本は特に多く、約120万人の感染者が存在し毎年約1000人を超えるATLが発症している。白血病やウイルスの発見当時から、この分野における日本人研究者の貢献度は多大であるが、ウイルスによる細胞の不死化や腫瘍化、治療抵抗性などの分子メカニズムは未だに不明な点が多く残されており、有効な治療法は未だに存在しない。ウイルスの根絶と白血病の予防、新規治療法開発を目指した分子レベルの病態解明が必須である。

ATL細胞及びHTLV-1感染細胞の生物学的な特徴として、恒常的なNF- κ Bシグナル経路の活性化があり、これによって細胞の異常な増殖及び生存が確保されている²⁾。HTLV-1感染細胞ではウイルスタンパク質であるTaxがNF- κ Bの定型的(canonical)及び非定型的(noncanonical)経路を劇的に活性化するが、Taxの発現が認められないATL腫瘍細胞におけるNF- κ Bの活性化メカニズムは不明な点が多かった。その後、遺伝子発現解析によってNF- κ B inducing kinase(NIK)のmRNAの過剰発現が恒常的なNF- κ Bの活性化に寄与していることが明らかになっているが³⁾、NIKの異常発現機構については不明であった。NF- κ Bシグナルの異常な活

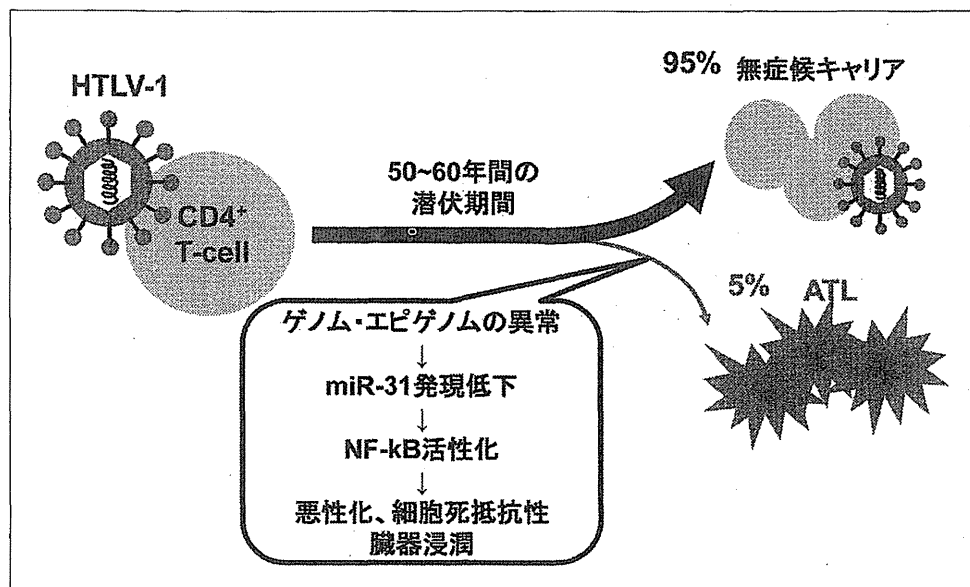


図1
HTLV-1 感染から腫瘍化へのモデル図
ATL は HTLV-1 感染者 (キャリア) の約 5% で発症する。白血病細胞はウイルス遺伝子の発現が低く、様々な遺伝子異常の蓄積によってシグナル伝達系の攪乱が起こっている。miR-31 は ATL 全例で低下しており、腫瘍細胞の悪性化に寄与する。

性化とそれに伴う腫瘍細胞の生存能の獲得と悪性化は、ATL だけでなく多くの固形癌や悪性リンパ腫、白血病で共通して見られるがん細胞の特徴的な分子病態の1つである。その中でも NIK の高発現による異常活性化は重要な位置を占めているが、正常を逸脱するその機構は不明であり、がん研究全体の課題であった。

我々は、ATL の miRNA, mRNA 発現解析及びゲノム異常の解析を統合して ATL の分子病態の全貌を明らかにすることを目指して来た。その結果明らかとなった ATL の分子異常は臨床的特徴をよく反映しており、分子マーカーや治療標的として様々な情報を提示した。さらに、明らかとなった新たな分子メカニズムはがん研究および新規治療法開発の基盤となる新たな概念を提唱した。

1. ATL 臨床検体を用いた 大規模統合解析からみる ATL の分子病態

従来の ATL 研究の多くは、細胞株か、少数の患者由来細胞から得られた情報を基盤としたものが主であり、限界があることは周知のことであった。従って、実際の個体内の ATL 細胞における分子異常の実体を正確に理解することが ATL/HTLV 研究において重要な課題とされていた。未だに有効な治療法が無い ATL に対して最も基本となる ATL 細胞そのものの分子病態に関わる根本的な情報を得るために、筆者らはまず、全国的な共同研究組織 JSPFAD (<http://htlv1.org>) の全面的な協力を得て、その検体バンクを利用して ATL の臨床検体を用いた miRNA および mRNA の大規模解析に着手した。Agilent Technologies

社の miRNA マイクロアレイを用いて ATL40 例、正常 CD4⁺T 細胞 22 例について解析を行った結果、非常に厳しい検定をクリアした 61 個の miRNA の発現異常を同定した。他のがん細胞の報告と同様に、ATL 細胞では正常 T 細胞に比べて異常を示す miRNA のほとんどが「発現低下」という異常を示すことが明らかになった。また、ATL の miRNA 発現プロファイルはユニークであり、miRNA の発現をもって正常 T 細胞と区別ができることもわかった。この 61 個の miRNA のなかで最も著明な発現低下を示した miR-31 は、正常 T 細胞では比較的发現量が高く、一方で ATL 細胞は非常に発現が低い、もしくは検出限界以下にまで低下している事が確認された。miR-31 は乳がん細胞の転移能を始めとする様々な細胞機能に関わる重要な miRNA であり、発現の欠損が細胞の運命に重要な意味を包含すると推察された。

2. miR-31 の発現減少とその生物学的意義

miRNA の主な生物学的機能は、標的遺伝子の 3' UTR に結合することによって遺伝子発現を負に制御することである。外来の合成 siRNA と異なり、miRNA の配列認識は揺らぎが特徴的であり、1つの miRNA が複数個の遺伝子を制御することができる (Pleiotropic function)。細胞の運命に重大な影響を与える標的の遺伝子の探索には、物理的な抑制効果と同時に標的側の機能や挙動も重要な指標となり、従って多角的な実験的検証が必須になる。筆者らは、ATL 全例で発現が欠損していた miR-31 の T 細胞における生物学的意義を明らかにする為に、以下の検討を行った。

① miR-31 の標的遺伝子の予測を4つのアルゴリズムによって予測, ② ATL 細胞の mRNA 大規模解析データとの擦り合わせによる検証, ③ 変異を導入したレポーターアッセイ, ④ miR-31 の増減に対する標的候補遺伝子の定量, ⑤ miR-31 と標的遺伝子の関係の保存性。以上の検討の結果, NF- κ B Inducing Kinase (NIK) が miR-31 の新規標的遺伝子であることを初めて明らかにした。NIK は NF- κ B の非定型的経路の活性化に必須のリン酸化酵素であり, NIK の発現レベルが NF- κ B シグナルの恒常的活性化に直接的に寄与することが複数のがんに関して報告されている。ATL では NIK の mRNA 量が増加していることがわかっていたが³⁾, 過剰発現の原因は明らかにされていなかった。ATL 患者から樹立された細胞株に miR-31 を過剰発現させると, NIK mRNA 及びタンパク質レベルが低下し, NF- κ B の活性化が抑制されることが示された。これらの細胞では細胞増殖レベルの低下, 抗アポトーシス遺伝子の発現低下, アポトーシス感受性の増加, が認められた。さらに miR-31 を発現するレンチウイルスベクターは, ATL 患者から直接取り出した ATL 細胞にアポトーシスを誘導することが示された(後述)。以上より, miR-31 の発現低下は ATL 細胞の生存にとって重要であり, その分子メカニズムは NIK の過剰発現の誘導であることが示された。NF- κ B シグナルは非常に複雑な制御機構を備えているが, 本研究により miR-31 が新たな NF- κ B 抑制因子として同定されたことになる。

3. ゲノム及びエピゲノムの異常と miR-31 の発現制御

細胞内の成熟 miRNA のダイナミズムは, 転写制御と, 転写後の成熟過程の制御によって規定される。ATL 全例で発現欠損がある miR-31 は, 転移性乳がんや前立腺がんなどでも発現が減少しており, がん細胞における一般性と重要性が示唆されたが, 細胞内の miR-31 レベルがどのように制御されるかについては不明であった。hsa-miR-31 は, 多くのがん細胞でゲノムの欠失が頻発する 9p21.3 の CDKN2A/B 領域に隣接しており, ATL においてもゲノムの不安定性が予測された。ATL168 症例の大規模な DNA コピー数解析の結果, 12.5% の症例において miR-31 ゲノムの, ホモもしくはヘテロの欠損があることがわかった。一方で, 同時に行った miRNA 発現解析では, ゲノムの欠損が無い症例でも正常 T 細胞に比べて miR-31 レベルが著しく減少していることが示された。一方, 発現解析データとアルゴリズムから miR-31 の転写構造を予測すると, miR-31 は

LOC554202 遺伝子のイントロン領域にコードされ, 独立した転写が起こっていることが明らかになった。また興味深い事に, YY1 という転写因子の認識配列が miR-31 の転写開始点上流に集簇していることも明らかになった。YY1 は, Polycomb ファミリーに属する DNA 結合タンパク質で, ヒストン H3K27 のメチル化酵素である EZH2 を始めとする Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) のリクルーターとしての機能が注目されている⁹⁾。そこで YY1 のノックダウン実験を行ったところ, miR-31 領域への YY1 の蓄積が低下し, それに付随して EZH2 のリクルートが減少することが示された。

我々の解析で示された, 最も基本的な問題は, ATL 細胞を始めとする高悪性度の腫瘍においてなぜ miR-31 の発現が激減するのか? である。この問題の答を求めため種々の解析を行った。まず, ATL の mRNA 発現解析の結果から, Polycomb ファミリーのヒストン H3K27 のトリメチル化を誘導する EZH2 及び SUZ12 遺伝子の発現が正常 T 細胞に比べて高発現していることが明らかになった。ATL 細胞株においてこれらの Polycomb ファミリー遺伝子をノックダウンすると, miR-31 ゲノム領域への PRC2 のリクルートレベルが低下し, その結果 H3K27 及び H3K9 のメチル化のレベルが低下した。さらに, ヒストンの脱アセチル化を介して転写抑制に働く HDAC1 の結合レベルも低下し, その結果 miR-31 の発現が回復することが示された。以上の実験データから Polycomb ファミリーの発現異常が miR-31 の発現低下を誘導するという新たな分子メカニズムが明らかとなった。この事実は以下のデータからもサポートされる。

① ATL 患者由来の ATL 細胞を ChIP アッセイによって直接解析した結果, hsa-miR-31 領域に異常な抑制的メチル化ヒストンが検出され, また EZH2 のノックダウンが直接細胞死を誘導した(後述)。

②同様の分子メカニズムが好転移性乳がん細胞や B 細胞株においても保存されていた。

以上より, 細胞内における成熟 miR-31 の発現レベルはゲノムの安定性と, YY1-PRC2 によるエピジェネティックな制御の両側面により規定されることが示された。

4. Polycomb ファミリーによる miR-31 制御を介した NF- κ B 経路への影響

miR-31 は NIK の他に RhoA, Radixin, Integrin α 5, FoxP3, FIH, E2F2 など様々な遺伝子を負に制御し, 細胞

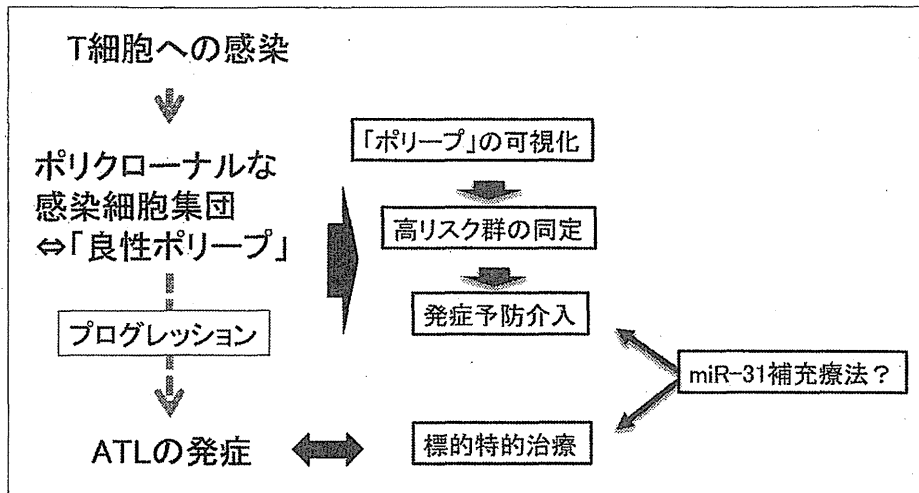


図2
HTLV-1による腫瘍化機構
と治療戦略の可能性

ATL 未発症キャリアの末梢血中の感染細胞はクローンとして増殖した感染細胞集団からなることが明らかになって来た。つまり、大腸がんにおける「ポリープ」の様な前癌病変であると捉えることができる。「miR-31 補充療法」は、発現レベルの低下していない正常細胞には影響せず、発現低下を示す感染細胞集団と ATL 細胞を特異的に排除する治療法となる可能性がある。

の運命に強く影響すると言われている。一方で miR-31 を制御する Polycomb ファミリーは多くの悪性リンパ腫、白血病、固形癌等の細胞の増殖、生存、転移能に重要な因子であることが報告されているが、どの標的遺伝子が細胞の表現型に直接影響するかは不明な点が多かった。筆者らは、本研究で明らかとなった、① miR-31 による NIK を介した NF-κB 経路の制御と、② Polycomb ファミリーによる miR-31 の発現制御を合わせ、Polycomb によるエピジェネティックな制御が NIK 依存的な NF-κB 経路の制御に関わる、という仮説を立てた。これまで Polycomb ファミリーと NF-κB 経路の関係は全く注目されていなかった。

上述した様に、ATL 細胞株において EZH2 もしくは SUZ12 をノックダウンすると、miR-31 の発現が誘導され、このとき NIK のレベルが低下することによって下流のシグナルが停止し、NF-κB 活性レベルが低下した。さらにこれらの細胞では細胞増殖及び細胞死抵抗性が低下した。Polycomb, miR-31, NIK は各経路の上流に位置する因子で、細胞に対するアウトプットは様々な形に拡散すると考えられるが、以下の実験事実により、上記の分子機構は非常に重要であると考えられる。① Polycomb ファミリーのノックダウンによって低下した NF-κB 活性レベルは、miR-31 の阻害剤を共存させることによって回復することから、Polycomb による NF-κB の制御は miR-31 を介していることが示唆される。② Polycomb のノックダウンによって誘導される ATL 細胞の強制的な Apoptosis は 3'UTR を持たない NIK によってレスキューされる。つまり Polycomb ファミリーによって獲得する異常な生存能の一部は NIK の機能によって具現化される。③ miR-31 の過剰発現や Polycomb のノックダウンは、B 細胞における BAFF や CD40L からの非定型的 NF-κB 経路の活性化を阻害することから、がん細胞シグナル

だけでなく、正常細胞のシグナルの調整にも重要である。④ miR-31 の発現及び Polycomb のノックダウンにより ATL 細胞の MDC (CCR4 リガンド) に対する走化性が低下した。従って、NIK 以外の miR-31 の標的遺伝子群による表現型は Polycomb ファミリーによって規定されている。

5. 新規治療法の開発へ

Polycomb の過剰発現、miR-31 の発現欠損、NIK の過剰発現と NF-κB の恒常的活性化は、いずれも ATL の臨床検体から明らかになった。筆者らは本研究の総括として、上記の ATL 細胞の分子レベルの特徴が細胞の生存にどのように影響するかを検討した。miR-31 の強制発現、EZH2 もしくは NIK のノックダウンを行うレンチウイルスベクターを作製し、患者由来 ATL 細胞に直接導入することによって *ex vivo* での評価を行った。その結果、ある程度の個人差は認められるが、いずれのレンチウイルスも複数の ATL 末梢血検体の ATL 細胞に強烈なアポトーシスを誘導することが示された。同様の処理は健常者由来の末梢血単核球もしくは T 細胞に対してはほとんど影響が無く、分子レベルのバランス異常が ATL 腫瘍細胞の生存に必須となっていることが示された。これらの結果は、miR-31 が ATL 細胞特異的な細胞障害性を持つことを示している。従って、miR-31 の ATL 細胞特異的な導入法を開発することにより、「miR-31 補充療法」などの発症予防法や ATL の新規治療法開発につながる可能性を示す結果と考えられる (図2)。

おわりに

本研究では、ATL における新たな分子標的と NF-κB

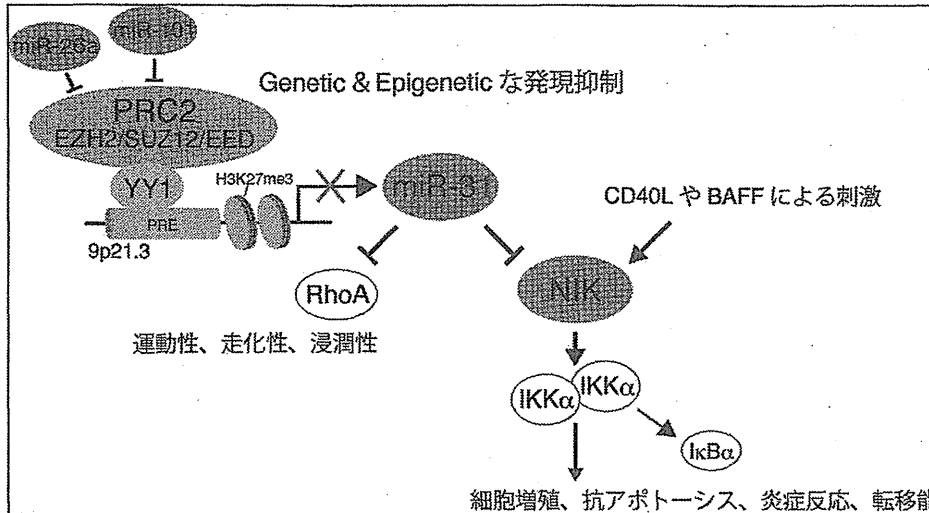


図3 Polycomb-miR-31-NF-κBのリンケージ

Polycomb 依存的な miR-31 の発現低下は NIK などの標的遺伝子を介して細胞の表現型に影響する。この分子間の関係は様々な細胞で保存されており、各因子の存在量のバランスによって均衡が保たれている。バランスを崩した細胞は悪性化をたどると考えられる。

の活性化機序を解明することに成功した。これに加えて、Polycombによるエピジェネティックな制御、miRNAによる細胞運命の決定、NF-κBシグナル経路による免疫細胞及び腫瘍細胞の分子基盤、という3つのコンテキストに新たな生物学的リンクを見いだした(図3)。また、本研究で得られた知見は以下の点で重要であると考えられる。

まず、NIKの新たな制御機構を明らかにしたこと。NIKはATL以外に多発性骨髄腫、悪性リンパ腫、乳がんなどのNF-κB異常活性化の原因因子である。また免疫担当細胞を始めとする種々の細胞の正常機能にNIKは必須であり、NIKを巡る基礎研究は注目をあつめている。NF-κB経路の複雑な制御システムにmiR-31が組み込まれていること、さらにPolycomb依存的なエピジェネティックな制御がmiRNAを介してNF-κB制御に寄与するという発見は、今後のシグナル伝達研究に対して大きく貢献すると考えられる。

2つ目は、Polycombファミリーは、miRNAの発現を制御することによって、より多くの遺伝子発現を転写及び翻訳の段階で影響力を持つ可能性が示されたことである。またPolycombファミリー自身も複数のmiRNAによって制御されることが分かっている。現に、ATLにおいてはEZH2を抑制するmiRNA群が減少を示していた。

3つ目は、Polycombファミリーによる標的領域の認識機構の一端を明らかにしたこと。PRC2の標的領域の認識はYY1だけでは説明できないことは複数の研究によって示されているが、miR-31のようにYY1結合配列の蓄積という特殊なケースが細胞に対する影響力が大きい可能性がある。

4つ目は、シグナルのクロストークと細胞の正常機能について。本研究で得られた知見はそれぞれの鍵分子の異常な挙動を指標にして明らかとなったが、各分子は元来、

細胞の恒常性や正常機能に重要であると考えられる。がん研究から得られたこの様な知見がより基礎及び臨床的な理解へと貢献することを期待したい。

最後に、前項でも触れた様に、ATLに対する分子標的薬として、miR-31の応用可能性が示されたと言える。今後の研究により実用化が可能になれば、ATLのみならず同様の病態を示すがんの新たな治療法開発の先例となる可能性がある。

なお、本研究成果はCancer Cell誌、同刊のプレビューにて解説が掲載されている⁹⁾。

文献

- 1) Iwanaga, M., Watanabe, T., Utsunomiya, A. *et al.*: Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) proviral load and disease progression in asymptomatic HTLV-1 carriers: a nationwide prospective study in Japan. *Blood*, 116, 1211-1219 (2010).
- 2) Watanabe, M., Ohsugi, T., Shoda, M. *et al.*: Dual targeting of transformed and untransformed HTLV-1-infected T cells by DHMEQ, a potent and selective inhibitor of NF-kappaB, as a strategy for chemoprevention and therapy of adult T-cell leukemia. *Blood*, 106, 2462-2471 (2005).
- 3) Saitoh, Y., Yamamoto, N., Dewan, M.Z. *et al.*: Overexpressed NF-kappaB-inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells. *Blood*, 111, 5118-5129 (2008).
- 4) Valastyan, S., Reinhardt, F., Benaich, N. *et al.*: A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis. *Cell*, 137, 1032-1046 (2009).
- 5) Simon, J.A. and Kingston, R.E.: Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 10, 697-708 (2009).
- 6) Uribealago I., Ballare C., and Croce LD.: Polycomb Regulates NF-κB Signaling in Cancer through miRNA. *Cancer Cell*, 21, 5-7 (2012).

【ATL細胞のゲノム エピゲノム異常と発現異常】

Molecular characteristics of adult T cell leukemia

山岸 誠・渡邊 俊樹

Makoto Yamagishi

Toshiki Watanabe

Key words

ゲノム異常, エピジェネティクス,
シグナル伝達, miRNA

要 約

HTLV-1の感染から数十年の潜伏期間を経て発症するATLは、多段階がんモデルと相関することが示唆されている。染色体及びシグナル伝達研究の成果に加え、近年の網羅的解析によって、分子レベルでのATL細胞の特徴は少しずつ理解が進んでいる。ATL細胞ではHBZを除くウイルス遺伝子の発現がまれであり、感染細胞自身の破綻が腫瘍細胞の形成や維持、悪性化に必須であろう。ATLには他の悪性リンパ腫にみられるような特徴的な染色体転座や変異が無く、多様なゲノム及びエピゲノムの異常を背景に、複雑なシグナル伝達経路の活性化と細胞周期の脱制御が観察される。またATL細胞の遺伝子発現異常の背景にある、miRNAの全体的な発現低下という新たな概念も提案されており、ATLの分子病態の研究は新たな展開を迎えている。本稿は、これまでのATL研究を振り返り、発現、ゲノム、エピゲノム、miRNAに関する最新の成果をまとめ、ATLの分子レベルの理解と分子標的薬開発の一助となることを願うものである。

1. ATL細胞の分子レベルの特徴

HTLV-1がコードするウイルス遺伝子、特にTaxとHBZによる病原性については非常に多くの研究がされており、HTLV-1の感染がATLの分子レベルの背景となっていることは明白である。しかし一方で実際のATL細胞ではHBZをのぞくウイルス遺伝子の発現はまれであり、感染後期に起こる腫瘍細胞の形成、維持、悪性化、薬剤耐性などの分子メカニズムに関する研究は未だ発展途上である。

他の悪性リンパ腫やがんと比較すると、ATLには腫瘍細胞を特徴づけるような定義的な染色体転座や変異はなく、ゲノムの異常はむしろ多様性があると言える。しかし、我々は最近、多数の臨床検体を用いた遺伝子発現の大規模解析の結果から、ATL細胞は非常に均一な異常遺伝子発現パターンをもつ集団であることを明らかにしたり、ATL細胞には特徴的なシグナル伝達系の異常がある。またエピジェネティックな異常も次々に報告されている。つまり多様なゲノム異常を背景に、さらに複数個のイベントがATL細胞の特徴的な遺伝子発現を支配していると考えられる(図1)。

2. ATL細胞のゲノム異常

ATLが発見された当初から染色体異常の研究が行われ、HTLV-1感染細胞の終末像であるATL細胞にはゲノム異常が蓄積しているという事実がある。初期の染色体解析の結果では96%の症例で染色体異常があり、ATLの背景にゲノム異常の蓄積が存在するのは確かである²⁾。その後Comparative Genomic Hybridization (CGH)法を用いた網羅的解析により、急性型、リンパ腫型における高頻度のゲノム異常と、予後との相関が明らかにされている³⁾。またCGHとマイクロアレイを組み合わせた高解像度の手法により、急性型とリンパ腫型のゲノム異常の比較も行われている⁴⁾。一方で他のがんやリンパ腫に見られるような定義的な転座や変異はATL症例では見つかっていない。著名な癌抑制遺伝子であるCDKN2A (p16) や p53の遺伝子欠損、変異は全体で約25%程度と比較的低頻度であり、これらの遺伝子異常だけではATLの分子病

東京大学大学院 新領域創成科学研究科 メディカルゲノム専攻 病態医療科学分野

Laboratory of Tumor Cell Biology, Department of Medical Genome Sciences, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo 〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1 TEL: 03-5449-5298