

## エイズリンパ腫における miRNA の発現異常と シグナル伝達系の解析

研究分担者： 渡邊俊樹 東京大学大学院新領域創成科学研究科・教授

研究協力者： 山岸誠（東京大学大学院新領域科学研究科）  
片野晴隆（国立感染症研究所感染病理部）  
比島恒和（東京都立駒込病院病理科）  
大田泰徳（虎の門病院病理部）

### 研究要旨：

エイズリンパ腫の病態解明と新たな危険因子の同定を目指す上で、臨床サンプルの解析データに基づいて miRNA とシグナル伝達経路の異常を明らかにし、さらにそれらの相互関係を明らかにすることが重要である。本年度は凍結リンパ腫検体を用いて実際の分子レベルの異常を直接明らかにすることを目的とした。その結果、リンパ腫細胞における polycomb 及び trithorax 依存的なエピジェネティック異常、miRNA の発現及び機能不全、標的遺伝子群の慢性的な発現活性化とシグナル伝達経路に与える影響が明らかになった。またエイズリンパ腫に特異的な miR-214 の発現上昇を明らかにし、エピジェネティック異常およびPI3K-Akt 経路の活性化に関わることを示した。

### A. 研究目的

エイズ合併B細胞リンパ腫は一般に進行が早く予後が不良である。HAART の導入後エイズリンパ腫の発症は減少しているが、依然としてエイズ患者の予後を左右する重大な合併症であり、分子基盤の理解と治療法の開発、また発症危険因子の探索は急務である。

エイズリンパ腫の危険因子や予後予測因子を同定する上で、異常値を示す miRNA の機能を明らかにすることが重要な課題である。我々が明らかにした異常発現 miRNA 群はエイズリンパ腫で特に異常な減少を示していることから、本研究課題を遂行する上で重要な研究課題であると考えた。

昨年度までに、エイズリンパ腫を含む検体の大規模解析を行い、B細胞リンパ腫において機能不全になっている miRNA 群を同定し、さらに機能的スクリーニングによって B cell receptor (BCR)シグナルに対して抑制的に働くことを明

らかにした。また DLBCL で高頻度に見られる遺伝子変異によるシグナル伝達経路への影響と miRNA のバッファー機能について検証した。本年度は、凍結リンパ腫検体を用いて実際の分子レベルの異常を証明することを目的とした。また miRNA の機能で重要な翻訳制御系がリンパ腫細胞に与える影響についても検討した。さらにエイズリンパ腫で特に発現異常を示す miRNA について詳細に解析を行った。

### B. 研究方法

#### 1. 凍結リンパ腫検体を用いた解析

東京都立駒込病院病理科で保存されていた DLBCL 由来凍結検体について、miRNA の機能及び発現解析、翻訳レベルの解析、エピジェネティック解析を体系的に行い、リンパ腫細胞における異常とそれらの関係性を検討した。

#### 2. 翻訳レベルの検討(polysome analysis)

細胞株もしくは凍結検体から細胞質分画を抽出し、ショ糖密度勾配遠心分離法によってリボソーム及びポリソーム分画を得た。これらの分画に含まれる miRNA 及び mRNA を精製、定量することにより、各遺伝子の翻訳効率を算出した。

## C. 研究結果

### 1. 凍結リンパ腫検体を用いた詳細解析

昨年度までの研究結果から、エイズ関連リンパ腫において miR-200 ファミリー、miR-203、及び miR-31 の発現が著しく減少していることがわかった。さらに RISC-capture assay により、これらの miRNA と BCR シグナル経路のインターフェースについても明らかにした。

そこでこれらの異常について、実際の DLBCL 細胞を用いて検証するために、リンパ腫の凍結ブロックを直接解析することにした。凍結検体は片野晴隆博士（国立感染症研究所感染病理部）及び比島恒和博士（東京都立駒込病院病理科）の協力により得た。

4 症例の凍結ブロックをそれぞれ複数に取り分け、RISC-capture assay（機能的 miRNA 及び標的 mRNA の定量）、ChIP assay（エピジェネティック異常の検出）、Polysome analysis（翻訳レベルの検証）を同時に行った。またこれらのアッセイを正常 CD19+B 細胞についても行い、比較することでリンパ腫細胞の異常を明らかにした。

その結果、リンパ腫検体では先に同定した miRNA 群が機能を失っており、同時に BCR 経路の重要な遺伝子が miRNA の制御から逸脱していることが証明された。miRNA の発現はヒストンの異常なメチル化パターンによって発現が著しく抑制されており、これにより標的遺伝子の発現が解放されていることがわかった。さらに正常 B 細胞と比較してリンパ腫細胞は BCR 経路の重要な遺伝子の翻訳が慢性的に活性化していることがわかった。

DLBCL 細胞株に対して miRNA を過剰に発現させ同様の検討を行った結果、miRNA 及び標的 mRNA が効果的に RISC に取り込まれ、BCR 経

路が抑制されることがわかった。逆にトランスフォームしていない B 細胞株として LCL を採用し、内在性の miRNA を抑制したのと同様の検討を行った結果、凍結リンパ腫検体でみられたような BCR 経路因子の miRNA 制御からの逸脱が促進された。また翻訳活性化レベルを polysome analysis によって検討した結果、miRNA の発現レベルが BCR 経路因子の翻訳開始段階に直接影響を与えることがわかった。

### 2. エイズリンパ腫に特異的な miRNA の発現異常とその影響

リンパ腫の病系や特徴に基づいた大規模解析の結果、エイズリンパ腫では miR-214 が特に高発現していることがわかった。miR-214 の標的遺伝子を *in silico* および *in vitro* で検討した結果、trithorax group の MLL2 が標的遺伝子であることがわかった。miR-214 の発現を誘導すると MLL1-5 のうち MLL2 の 3'UTR を特異的に認識し、mRNA の分解及び翻訳抑制を誘導することがわかった。実際のリンパ腫では MLL2 の mRNA が減少していること、また翻訳レベルが抑制されていることを明らかにした。また miR-214 の発現上昇は PI3K-Akt の抑制因子である PTEN の発現を抑制することも明らかにした。miR-214 の過剰発現は PTEN 抑制を介して Akt を活性化し、BCR による細胞活性化を助長することがわかった。

### 3. エピジェネティック異常がシグナル伝達系に与える影響の解析

昨年度までにリンパ腫細胞では重要な miRNA の発現が Polycomb および Trithorax によって異常に抑制されることがわかった。そこでこれらの抑制を解除したときのシグナル伝達経路に与える影響を検討した。リンパ腫細胞で活性化している polycomb を阻害すると、miRNA の発現が回復し、BCR 経路が正常化することがわかった。また MLL2 の発現減少は polycomb と共役して miRNA を介してシグナル伝達経路の活性化に寄与することも明らかになった。

## D. 考察

今年度の研究結果から、細胞株モデルだけでなく、実際の患者由来リンパ腫細胞から miRNA 群の異常と BCR 経路の制御逸脱が証明された。また同時にエピジェネティック異常と翻訳制御異常についても明らかになり、これらの異常が影響しあい、総合的にリンパ腫細胞の特徴に寄与することがわかった。これらの異常はリンパ腫細胞の生存や増殖の根幹であり、これらをさらに詳細に理解、制御することで、分子標的や分子マーカーとして利用することが可能になると考えられる。

本年度の大きな成果として、エイズリンパ腫に特徴的な miRNA の異常とその機能についても明らかにすることができた。miR-214 は他のがんにおいても発現異常が指摘されているが、その機能は多岐にわたる。今回の結果から miR-214 がエピジェネティック異常および PI3K-Akt 経路の活性化に関連することがわかった。エイズリンパ腫細胞における分子レベルの特徴をさらに解析することが来年度の課題である。

## E. 結論

リンパ腫細胞における miRNA の発現異常はシグナル伝達経路の翻訳を活性化し、慢性的なシグナル伝達経路の活性化を誘導する。エイズリンパ腫で特に見られる miR-214 の発現上昇はエピジェネティック異常および PI3K-Akt 経路の活性化に関わる。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kuramitsu M, Okuma K, Yamagishi M, Yamochi T, Firouzi S, Momose H, Mizukami T, Takizawa K, Araki K, Sugamura K, Yamaguchi K, Watanabe T, Hamaguchi I. Identification of TL-Oml, an ATL Cell Line, as a Reference Material for Human T-Lymphotropic Virus 1 Quantitative PCR. **J Clin Microbiol** 53(2):587-596, Feb. 2015 (doi: 10.1128/JCM.02254-14)

- 2) Matsuda Y, Kobayashi-Ishihara M, Fujikawa D, Ishida T, Watanabe T, Yamagishi M. Epigenetic Heterogeneity in HIV-1 Latency Establishment. **Sci. Rep.** 5:7701, Jan. 2015(doi: 10.1038/srep07701)
- 3) Takahashi R; Yamagishi M, Nakano K, Yamochi T, Yamochi T, Fujikawa D, Nakashima M, Tanaka Y, Uchimaru K, Utsunomiya A, Watanabe T. Epigenetic deregulation of *Ellis Van Creveld* confers robust Hedgehog signaling in adult T-cell leukemia. **Cancer Sci.** 105(9):1160-1169, Sep. 2014 (doi: 10.1111/cas.12480)

### 2. 学会発表

#### (国内学会)

- 1) 堀真琴、藤川大、中川翔太、田中勇悦、中野和民、渡邊俊樹、山岸誠、「成人 T 細胞白血病における EZH2 依存的エピジェネティック異常の包括的解析」、第 37 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、横浜、2014 年 11 月 25 日 (2014 年 11 月 25 日~27 日) (ポスター)
- 2) 山岸誠、松田有加、小林(石原)美栄、藤川大、石田尚臣、渡邊俊樹、「HIV-1 潜伏化の不均一性とその分子メカニズムの解析」、第 62 回日本ウイルス学会学術総会、パシフィコ横浜、横浜、2014 年 11 月 12 日 (2014 年 11 月 10 日~12 日) (一般口演)
- 3) Yamagishi M, Takahashi R, Sakai N, Fujikawa D, Nakagawa S, Yamochi T, Yamochi T, Nakano K, Uchimaru K, Utsunomiya A, Watanabe T, “Tumor-specific gene expression leads to p38 and Hedgehog signaling activation in adult T cell leukemia”, 第 76 回日本血液学会学術集会、大阪国際会議場、大阪、2014 年 11 月 1 日 (2014 年 10 月 31 日~11 月 2 日) (一般口演)
- 4) 渡邊俊樹、山岸誠、「ATL 発症の基盤となるゲノム・エピゲノム異常の解析」、シンポジウム: 16 .ATL 発がん機構と治療の新展開、第 73 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、横浜、2014 年 9 月 25 日 (2014 年 9 月 25 日~27 日) (招待口演)
- 5) 藤川大、山岸誠、中川翔太、黒川直也、副島あい、石田尚臣、田中勇悦、中野和民、渡邊俊樹、「ATL 細胞における EZH2 依存的エピジェネティック異常の包括的解析」、

第 73 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、横浜、2014 年 9 月 25 日（2014 年 9 月 25 日～27 日）（ポスター）

- 6) 藤川大、山岸誠、黒川直也、副島あい、中川翔太、石田尚臣、田中勇悦、中野和民、渡邊俊樹、「ATL 細胞における EZH2 依存のエピジェネティック異常の包括的解析」、第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京大学医科学研究所、2014 年 8 月 24 日（2014 年 8 月 22 日～8 月 24 日）（口演）
- 7) 西田亜季、長門石暁、中野和民、山岸誠、矢持忠徳、田中勇悦、津本浩平、渡邊俊樹、

「単鎖抗体(scFv)を用いた HTLV-1 感染細胞特異的 miRNA 輸送システムの構築」、第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京大学医科学研究所、2014 年 8 月 23 日（2014 年 8 月 22 日～8 月 24 日）（ポスター）

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし