

氏 名 ・ (本籍)	北舘 明宏 (秋田県)
専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	医博甲第916号
学位授与の日付	平成28年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	MicroRNA-16 mediates the regulation of a senescence-apoptosis switch in cutaneous T-cell and other non-Hodgkin lymphomas (T細胞リンパ腫において microRNA-16 は細胞老化・アポトーシス転換を調節する)
論文審査委員	(主査) 教授 佐々木 雄彦 (副査) 教授 廣川 誠 教授 田中 正光

学位論文内容要旨

MicroRNA-16 mediates the regulation of a senescence-apoptosis switch in cutaneous T-cell and other non-Hodgkin lymphomas
(T細胞リンパ腫においてmicroRNA-16は細胞老化・アポトーシス転換を調節する)

申請者氏名 北舘 明宏

研究目的

がんの治療においては、様々な分子標的薬の登場により予後の改善が得られたがんがある一方で、再発難治の進行性がんもいまだ多く存在する。このような難治性進行がんに対して新たな治療アプローチが求められている。我々は難治性がんのモデルとして皮膚 T 細胞リンパ腫(Cutaneous T Cell Lymphoma、以下 CTCL)を対象として難治性病態の研究を行ってきた。CTCL は初期に関しては皮膚に局限するのみであるが、進行期に至ると腫瘤形成・多臓器浸潤を来すようになり、進行期症例に標準的化学療法を併用しても治癒は期待できず極めて予後不良な難治疾患である。このような難治病態を解明する手段として我々は microRNA(以下 miRNA)の発現解析を手掛かりとしてきた。miRNA は標的遺伝子の蛋白への翻訳を阻害することによりがんの病態に密接に関わっており、特に再発症例や治療抵抗性症例への関与が数多く報告されている。最近我々は CTCL 進行期において発現低下を示すいくつかのがん抑制的 miRNA(miR-16、miR-29、miR-150)を同定し、このうち miR-150 に関してはケモカイン CCL20 やその受容体 CCR6 を標的分子としてがん細胞の転移浸潤を抑制することを報告した(blood 2014)。さらにこれら各々の miRNA の発現を回復させた細胞株を作成し CTCL マウスモデルにおける腫瘍抑制効果を検討した結果、miR-16 導入において最も強い腫瘍抑制効果を示すことを見出した。miR-16 はこれまで様々な腫瘍でその発現低下が報告されており、アポトーシスや細胞周期制御に関連する蛋白を標的とすることでがん抑制的に働くとされている。本研究は CTCL における miR-16 のがん抑制機能を明らかにし、CTCL の病態解明・新規治療戦略開発へと結びつけることを目的とする。

研究方法

CTCL 患者のパラフィン検体より CD4 陽性細胞の RNA を抽出し RT-qPCR 法にて miR-16 の発現変化を初期(N=26)、進行期(N=15)で比較検討した。コントロールとしてアトピー性皮膚炎患者検体を用いた(N=18)。miR-16 の機能解析として、4 つの CTCL 細胞株(MyLa、MJ、HH、HUT78)を用いてレンチウイルスベクターにより miR-16 導入細胞株を作成した。これら細胞株を用いて、細胞周期解析、アポトーシスアッセイ、 β -GAL 染色、ウェスタンブロットなどを行った。*In vivo* における実験

では我々が以前確立した、「CTCL 細胞株を NOG マウスに皮下移植し移植後 30 日後で多臓器浸潤により死亡する」モデルマウスを用いて miR-16 導入株における生存期間の延長を評価した。

研究成績

CTCL 初期・進行期の miR-16 の発現を検討したところ、初期から miR-16 の発現低下を認め、リンパ腫発生時点から病態に関与することが示唆された。CTCL マウスモデルを用いて *in vivo* における miR-16 の腫瘍抑制効果を検討した結果、MyLa 細胞株においては前述の miR-150 より優れた生存延長効果を、HH 細胞株においては miR-150 と同程度の生存延長効果に留まり、細胞株間での異なる傾向を認めた。miR-16 の機能解析においては、miR-16 導入 MyLa、MJ 細胞株において細胞周期停止・細胞径増大・ β -GAL 陽性細胞の増加を認め、miR-16 が細胞老化誘導能を有することを見出した。細胞老化はがん遺伝子活性化など発がんの危険がある際に発動する生体防御機構として知られる。細胞老化誘導に必須の経路として近年 p53-p21 経路が同定されており、確かに MyLa、MJ 細胞株は p53 野生株、HH、HUT78 細胞株は p53 変異株であった。細胞老化関連蛋白の発現変動を解析したところ、miR-16 導入により細胞老化の key mediator である p21 が p53 非依存性に発現亢進することを見出した。さらに miR-16 はポリコーム群蛋白の一つである Bmi1 を介して p21 を制御することを明らかにした。miR-16 が Bmi1 を直接制御することを我々は以前報告しているが(Oncogene 2014)、Bmi1 が直接 p21 を制御することを Bmi1 のノックダウン実験及びクロマチン免疫沈降にて確認した。一方で p53 変異株において miR-16 導入は細胞老化ではなくアポトーシスを誘導することを見出した。p21 は DNA ストレス応答の際にアポトーシスを抑制することがこれまで知られている。そこで p53 野生株を用いて p21 ノックダウンに加えて miR-16 導入を行ったところ、細胞老化は減弱しアポトーシスが亢進することを確認した。すなわち miR-16 は細胞老化関連因子及びアポトーシス誘導因子を制御することに加え、p21 を制御することで、細胞老化—アポトーシス転換を調節するものと考えられた。

最後に CTCL の新規治療剤であるヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤についての検討を行った。HDAC 阻害剤の暴露により miR-16 の発現回復、p21 の発現亢進、Bmi1 の発現低下を認めた。さらに HDAC 阻害剤は p53 野生株には細胞老化を、p53 変異株にはアポトーシスを誘導し、miR-16 導入と同様 p53 機能の有無に応じて全く異なるがん抑制機序を誘導することを明らかにした。また、これらの実験は、CTCL だけでなく他のリンパ腫サブタイプでも行い、同様な現象を見出している。

結論

miR-16 が細胞老化誘導能を持つことと、その p53 との密接な関わりについて明らかにした。さらに HDAC 阻害剤が miR-16 の発現を回復させることで、抗腫瘍効果をもたらすことを示した。本研究は悪性リンパ腫治療における細胞老化誘導の意義を明らかにしており、CTCL のみならず、種々の悪性リンパ腫治療においても重要な示唆をもたらすものと考えられる。

学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主 査：佐々木雄彦

申請者：北館 明宏

論文題名：

MicroRNA-16 mediates the regulation of a senescence-apoptosis switch in cutaneous T-cell and other non-Hodgkin lymphomas

(T細胞リンパ腫において microRNA-16 は細胞老化・アポトーシス転換を調節する)

要旨

申請者北館の研究は、論文内容要旨に示すように、皮膚 T 細胞性リンパ腫(Cutaneous T-cell lymphoma、以下 CTCL)やその他の T 細胞性リンパ腫において、がん抑制的 microRNA である miR-16 が細胞老化を誘導することで機能を発揮することを明らかとした。また、miR-16 が、癌抑制遺伝子 p53 の野生株においては細胞老化を誘導する一方で、p53 変異株にはアポトーシスを代償的に誘導することを示し、細胞老化とアポトーシスの相互排他的な関係を示している。さらに CTCL における新規治療剤である HDAC 阻害剤と microRNA との検討から、HDAC 阻害剤が CTCL 細胞に細胞老化を誘導することを解明した。本研究で明らかとした病態や HDAC 阻害剤の作用機序は、悪性リンパ腫のみならず他のがんの治療戦略においても有用と考えられる。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

1) 斬新さ

miR-16 は初めて同定されたがん抑制的 microRNA であり、これまでアポトーシス誘導や細胞増殖抑制の機能を有することが数多く報告されている。そのなかで、本研究では新たに細胞老化誘導能を詳細に検討し、そのメカニズムについて明らかにしている。細胞老化は近年がん抑制機構の一つとして注目を集めているが、悪性リンパ腫治療標的としての細胞老化誘導の意義を明確に示した点で、斬新さがあるものと考えられる。

2) 重要性

CTCL における新規治療薬である HDAC 阻害剤は、様々ながんに対しても臨床応用が期待されている。がん種によっては HDAC 阻害剤が有効性を示さない一方で、CTCL に対しては様々な HDAC 阻害剤が臨床試験によりその有効性が示されているが、その差異を説明しうる機序については十分明らかではなかった。申請者らは CTCL における HDAC 阻害剤の重要な作用機序として、がん抑制的 microRNA の発現回復及び細胞老化の誘導を明らかとしており、今後の治療戦略開発においても重要な示唆をもたらすものと思われる。

3) 実験方法の正確性

本研究は、CTCL における miR-16 の機能解析を様々な手法を用い正確に検討している。microRNA の発現解析についても、複数の細胞株・臨床検体を用いて正常対応細胞との発現比較がなされており、解析結果は Northern blot 法および Taqman PCR 法を用いて再現性をもって確認されている。機能解析に用いられたレンチウイルスベクターを用いた microRNA 遺伝子導入法は、著者らのグループにおいて安定的に microRNA を発現させる手法として確立しており、その後に得られた結果の信頼性を高めている。データの解析方法にはいずれも統計学的検討を加えており客観的な評価法で、正確性があると考えられる。

4) 表現の明瞭さ

CTCL におけるがん抑制的 microRNA の役割について、その研究目的、方法、実験結果、考察を簡潔、明瞭に記載していると考ええる。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。