

悪性リンパ腫におけるがん抑制的 microRNA を介した 細胞老化誘導機構の解明*

北 舘 明 宏

秋田大学大学院医学系研究科 血液腎臓膠原病内科学講座

(平成 29 年 5 月 9 日掲載決定)

Mechanism for the induction of cellular senescence by a tumor suppressive microRNA in malignant lymphomas

Akihiro Kitadate

Department of Hematology, Nephrology, and Rheumatology, Akita University Graduate School of Medicine

Key words : microRNA, senescence, CTCL, T-cell lymphoma, HDAC inhibitor

はじめに

microRNA (以下 miRNA) は 20-24 塩基から構成される蛋白をコードしない機能的小分子 RNA の一種である。miRNA は標的とする mRNA の 3' 非翻訳領域に配列特異的に結合し、蛋白翻訳を阻害することでその作用を発揮する。3,000 にもものぼるとされる各々の miRNA は多数の標的遺伝子の発現制御に関与すると考えられており、発生や分化、細胞増殖、アポトーシス、細胞老化などの様々な生命現象を緻密にコントロールしている¹⁾。miRNA の発現異常は特に悪性腫瘍において分子病態との密接な関連が数多く報告されているが、悪性リンパ腫も例外ではなく miRNA の発現異常から様々な腫瘍分子病態が明らかとされてきた²⁾。今回我々は、がん抑制的 miRNA としてよく知られている miR-16 が皮膚 T 細胞リンパ腫 (Cutaneous T cell lymphoma, 以下 CTCL) をはじめ多くのリンパ腫で発症初期段階から発現低下していることを示し、

miR-16 の新たながん抑制機構として細胞老化誘導能を見出した。さらに細胞老化にはがん抑制遺伝子である p53 が必要であることが知られているが、CTCL 細胞が p53 変異型であるとき、miR-16 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、細胞老化・アポトーシスの相互排他的な関係性を明らかにした。HDAC 阻害剤であるポリノスタット (Suberoylanilide Hydroxamic Acid, SAHA) は近年臨床的に難治性 CTCL に対する有効性が認められた薬剤であるが、その詳細な機序は明らかでない。今回我々の検討で HDAC 阻害剤が miR-16 の発現を回復させ、さらにその標的分子の回復、CTCL 細胞への細胞老化・アポトーシス誘導を来すことを示した。このことはがん抑制的 miRNA のエピジェネティックな発現抑制が、がんの進展に密接に関与していることを示唆するものである。

結 果

1. miR-16 は CTCL はじめ種々の T 細胞リンパ腫において発現低下している

T 細胞リンパ腫における miR-16 の役割を明らかにするため、まず miR-16 の発現を検討することとした。はじめに miR-16 及び miR-16 と類似の配列を有するファミリーの発現をノーザンブロット法にて正常 T

Correspondence : Hiroyuki Tagawa
Department of Hematology, Nephrology, and Rheumatology, Akita University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Hondo, Akita 010-8543, Japan
Tel : 81-18-884-6116
Fax : 81-18-836-2613
E-mail : htagawa0279jp@me.com

*平成 29 年 2 月 9 日秋田医学会学術奨励賞受賞記念講演

(28)

Senescence induction via a tumor suppressive microRNA

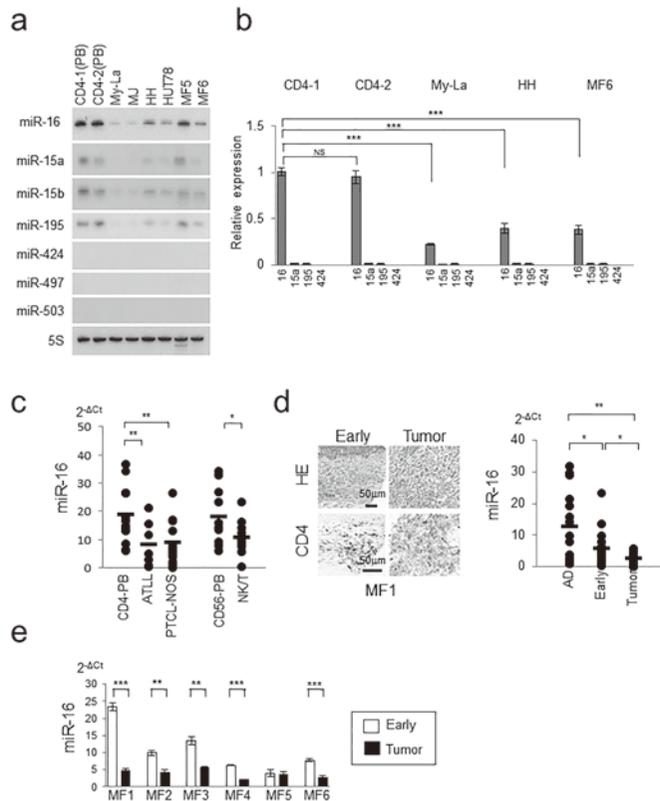


図1. CTCL及び種々のT細胞リンパ腫においてmiR-16は発現低下している

(a, b) 正常CD4陽性T細胞, CTCL細胞株(MyLa株, MJ株, HH株, HUT78株)・臨床検体(MF: mycosis fungoidesの患者検体)におけるmiR-16ファミリーの発現をノーザンプロット・RT-qPCR法にて評価した。(c) 成人T細胞リンパ腫(ATLL, $n=7$), 末梢性T細胞リンパ腫非特異型(PTCL-NOS, $n=20$), NK/T細胞リンパ腫($n=10$), 末梢血正常CD4陽性T細胞($n=14$), 末梢血正常CD56陽性細胞($n=12$)のmiR-16発現をRT-qPCRにて評価した。(d) CTCL患者検体の初期(early: $n=26$)・進行期検体(tumor: $n=15$)のCD4陽性細胞をmicrodissectionにてRNA抽出しmiR-16発現を比較した。コントロールとしてアトピー性皮膚炎(AD)患者検体を使用した($n=18$)。(e) CTCL初期・進行期のmiR-16発現を同一患者検体で比較した。

リンパ球, 患者検体, CTCL細胞株で検討した。miR-16は正常T細胞で最も強く発現し患者検体, 細胞株両者で発現抑制を認めた(図1a)。この結果は定量的PCRにおいても同様であった(図1b)。さらに, 別のT細胞リンパ腫である成人T細胞リンパ腫(ATLL, $n=7$), 末梢性T細胞リンパ腫非特異型(PTCL-NOS, $n=20$), NK/T細胞リンパ腫($n=10$)の臨床検体においてもmiR-16は正常リンパ球に比し発現低下を示した(図1c)。CTCL初期・進行期の臨床検体及びコントロールとしてアトピー性皮膚炎患者検体のCD4⁺リンパ球のmiR-16発現を比較したところ初期から発現低下を認め進行につれてさらに発現低下を認めた(図

1d)。この結果は個々の臨床検体の比較においても同様であった(図1e)。これらの結果から, miR-16は種々のT細胞リンパ腫において発現低下しており, さらに進行につれて発現抑制を受けることが示された。

2. miR-16はCTCLモデルマウスの生存期間を延長させる

次にmiR-16のがん抑制的効果を検証するため, miR-16導入CTCL細胞株を作製した(図2a)。我々は以前「CTCL細胞を免疫不全マウスに皮下移植すると移植後35日前後で全身多臓器浸潤により死亡する」CTCLモデルマウスを樹立しており, これは皮膚から

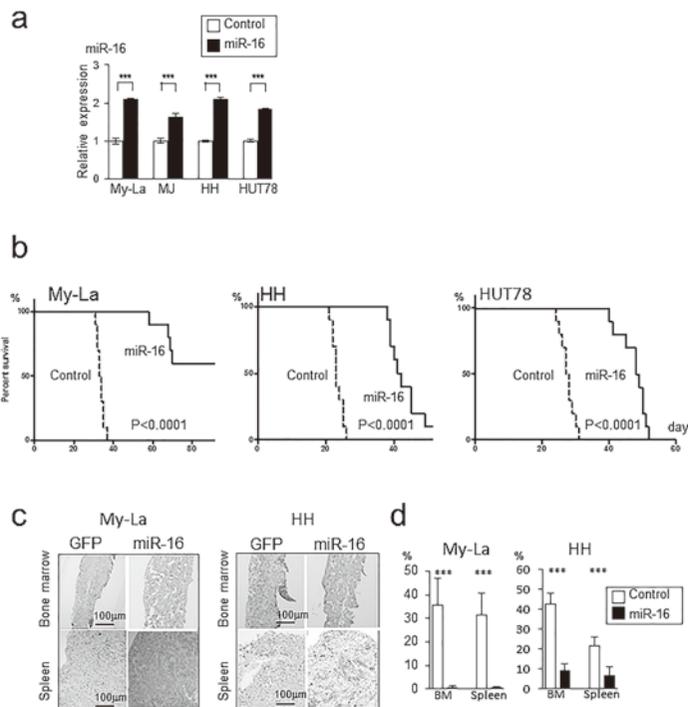


図2. *In vivo*におけるmiR-16の癌抑制効果。

(a) miR-16導入細胞株をレンチウイルスベクターを用いて作製し、miR-16発現亢進をRT-qPCR法にて確認した。(b) GFP-controlを導入したMy-La株、HH株、HUT78株とmiR-16導入のMy-La株、HH株、HUT78株のKaplan-Meier生存曲線を示す。(c, d) My-La株、HH株におけるGFP-control、miR-16導入時のGFP陽性細胞の骨髄浸潤・脾浸潤を比較した。

全身臓器へと増殖浸潤していくCTCL進行期の病態をよく反映しているものである³⁾。この系を用いてmiR-16導入における生存延長効果を検討したところいずれの細胞株においても生存延長効果を認め、特にMy-La株において著明な延長効果を認めた。さらにmiR-16導入によって、骨髄・脾臓への浸潤が著明に抑制されることを確認した(図2c, d)。以降の実験ではmiR-16がいかなる機構によりがん抑制的に働くのかを検討することとした。

3. miR-16はCTCL細胞に細胞老化を誘導する

miR-16の機能解析としてまず細胞増殖アッセイを行ったところ、すべてのCTCL細胞株で細胞増殖抑制を来すことを確認した。細胞周期解析ではMy-La株・MJ株ではG1期・G2期細胞の増加を、HH株・HUT78株ではG1期細胞のみの増加を認め細胞株間で異なる傾向を示した(図3a)。さらにフローサイト

メトリー解析において、FSC^{high}SSC^{high}の細胞集団がMy-La株・MJ株において増加することを見出した(図3b)。これは細胞径増大を示唆しており、細胞周期停止と細胞の肥大化は細胞老化の特徴であることから、細胞老化の指標となるSA-β-GALアッセイを行った。結果、細胞径増大を認めたMy-La株・MJ株においてSA-β-GAL陽性の老化細胞の増加を認めた。一方HH株・HUT78株では老化細胞の増加を認めず、これら細胞株間の違いを探索していくこととした。

4. miR-16はBmi1の発現抑制を介してp21を発現亢進し細胞老化誘導に寄与する

近年の研究により細胞老化誘導にはがん抑制経路としてよく知られるp53-p21経路が必須であることが示されている⁴⁾。そこで既報よりp53の変異の有無を調べたところ、細胞老化誘導を認めたMy-La株・MJ株はp53野生型、細胞老化の誘導されないHH株・

(30)

Senescence induction via a tumor suppressive microRNA

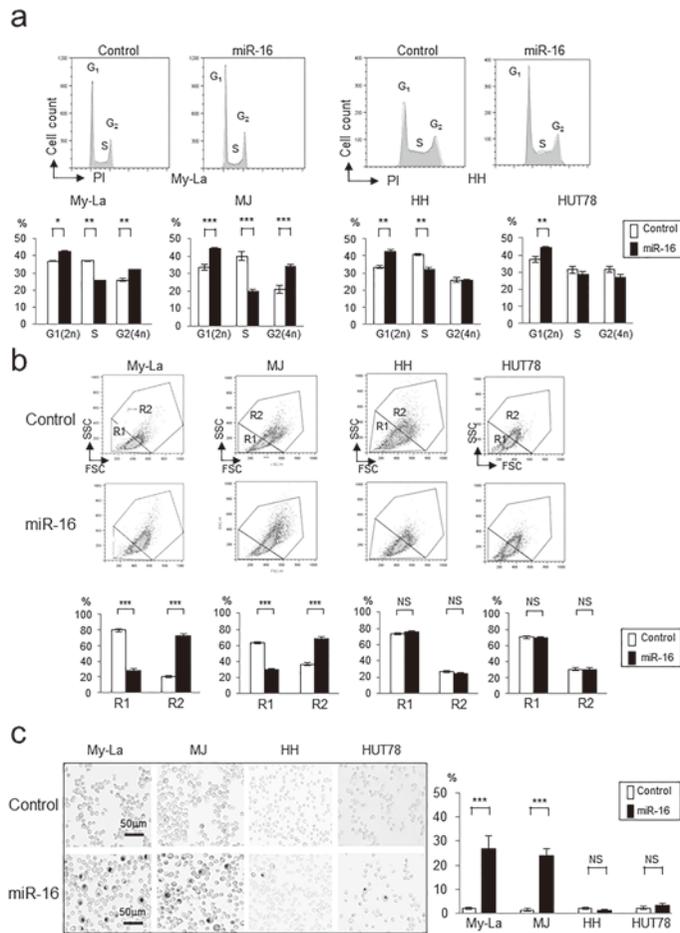


図3. miR-16はCTCL細胞に細胞老化を誘導する (a) control細胞, miR-16導入細胞の細胞周期解析を示す. (b) control細胞, miR-16導入細胞のフローサイトメトリー解析. 横軸にFSC (forward scatter), 縦軸にSSC (side scatter) で展開している. (c) control細胞, miR-16導入細胞のSA-β-GALアッセイ. 老化細胞は青く染色される.

HUT78株はp53変異型であった⁵⁾. そこでp53, p21を含む細胞老化関連タンパクのmiR-16導入における発現変化を確認したところ, My-La株・MJ株におけるp53非依存性のp21発現亢進を認めた. またポリコム群蛋白の一つであるBmi1の発現低下を認めた. Bmi1は我々がmiR-16の直接の標的となることを以前マントル細胞リンパ腫において報告しており⁶⁾, 一方別の研究ではBmi1がp21を制御していることが示されている. そこでBmi1のノックダウンを行ったところ, 確かにMyLa株・MJ株においてp21発現亢進を認めた(図4b). さらにBmi1とp21の直接の結合を

クロマチン免疫沈降アッセイにより確認した(図4c). 以上よりmiR-16はp53野生型細胞に対してはBmi1の発現抑制を介してp21を発現亢進し細胞老化誘導に寄与するものと考えられた.

5. miR-16はp53機能の有無により細胞老化・アポトーシス転換を調節する

miR-16はがん抑制的miRNAとしてよく知られているが, その機能はアポトーシス誘導が多く報告されている⁷⁾. そこでエレクトロポレーションによりmiR-16を導入し(図5a), Annexin Vを用いてアポトー

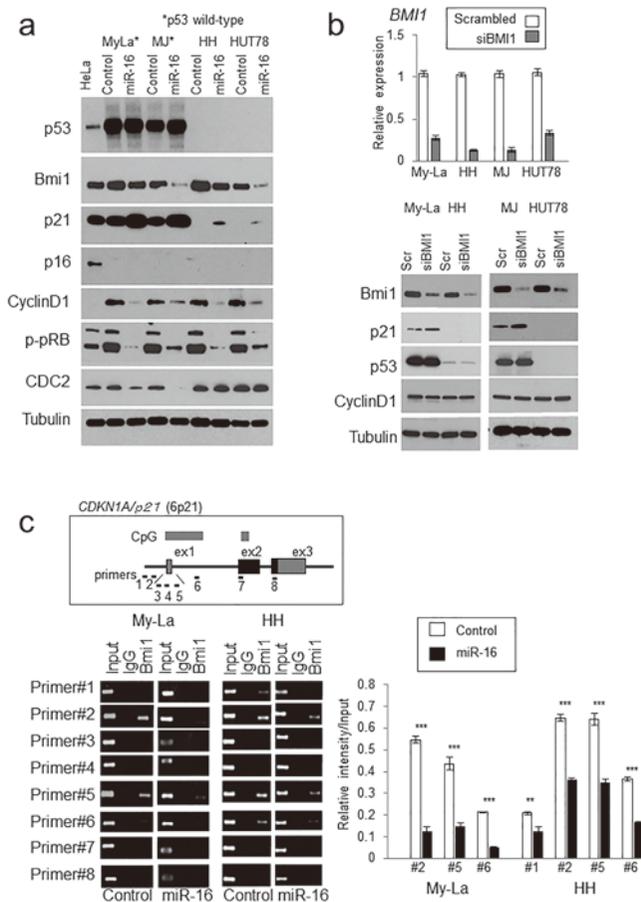


図4. miR-16はポリコム群蛋白 Bmi1を抑制することで p21の発現を亢進し細胞老化を誘導する (a) control 細胞, miR-16 導入細胞における細胞老化・細胞周期関連蛋白のウェスタンブロット. (b) 上段: siRNA を用いた BMI1 ノックダウンの効率を示す. 下段: BMI1 ノックダウンにおけるウェスタンブロット解析. (c) Bmi1, p21の直接の結合を検討するため行ったクロマチン免疫沈降アッセイ.

シスアッセイを行ったところ, p53 変異型細胞株においてよりアポトーシスを誘導することを見出した (図 5b). 同様に BMI1 のノックダウンにおいても p53 変異株においてよりアポトーシス細胞の増加を認めた (図 5c). さらに miR-16 導入におけるアポトーシス関連蛋白をウェスタンブロットにてスクリーニングした結果, 抗アポトーシス蛋白である Survivin の発現低下を見出した (図 5d). これらの結果から, miR-16 は細胞老化が誘導されない p53 変異細胞に対しては, 細胞老化ではなくアポトーシスを誘導することが示唆された.

6. p21 発現亢進の有無が細胞老化・アポトーシス転換の key factor である

細胞老化・アポトーシスの転換がいかなるメカニズムによって行われているかを検討することとした. p21 は本来サイクリン依存性キナーゼ阻害因子であり細胞周期を制御する役割がよく知られている. しかし p21 はアポトーシスを抑制する機能を持つことも知られており⁸⁾, p21 ノックダウン下で miR-16 導入を行うこととした. 結果, My-La 株・MJ 株とも p21 ノックダウン下では miR-16 導入により細胞老化ではなく, アポトーシスが誘導されることを見出した (図 6a).

(32)

Senescence induction via a tumor suppressive microRNA

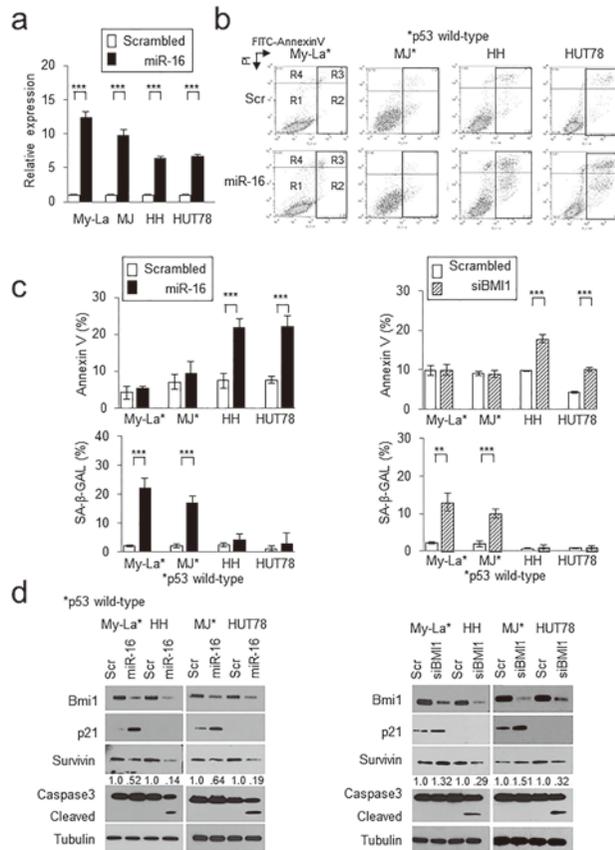


図5. miR-16はp53変異型細胞にはアポトーシスを誘導する。(a) miR-16をエレクトロポレーションで導入した際の導入効率をRT-qPCRにて確認した。(b) scramble control (scr), miR-16導入におけるAnnexin Vアッセイ。(c) miR-16, siBMI1を導入した際のAnnexin Vアッセイ及びSA-β-GALアッセイ。(d) miR-16, siBMI1導入におけるウェスタンブロット解析。アポトーシス関連蛋白としてSurvivin, Caspase3, 活性化Caspase3を示す。

すなわち、p21発現亢進の有無がこの細胞老化・アポトーシス転換のkey factorであることが確認された(図6b)

7. HDAC阻害剤であるSAHAはCTCL細胞のmiR-16発現を回復し細胞老化/アポトーシスを誘導する

miR-16の発現低下の原因としてエピジェネティックな機構が報告されている⁹⁾。そこでCTCLにおいて臨床的に有効性が示されたHDAC阻害剤のSAHA, DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤であるRG108, p53の発現を亢進させるnutlin-3a(MDM2阻害剤)をCTCL細胞に暴露させmiR-16の発現変化を検討した。

結果、SAHAのみがmiR-16の発現を回復させることを見出した(図7a)。さらにSAHA暴露における蛋白発現変化をウェスタンブロットにて確認したところ、p53非依存性のp21発現亢進や、Bmi1の発現低下、p53変異株におけるSurvivinの低下などmiR-16導入と非常に近い挙動を示していた(図7b)。また、SAHA暴露における細胞老化・アポトーシスの誘導をSA-β-Galアッセイ、Annexin Vアッセイにて検討したところ、p53野生型には細胞老化を、p53変異株にはアポトーシスを誘導し、p53機能により全く異なるフェノタイプを誘導することを見出した(図7c, d)。

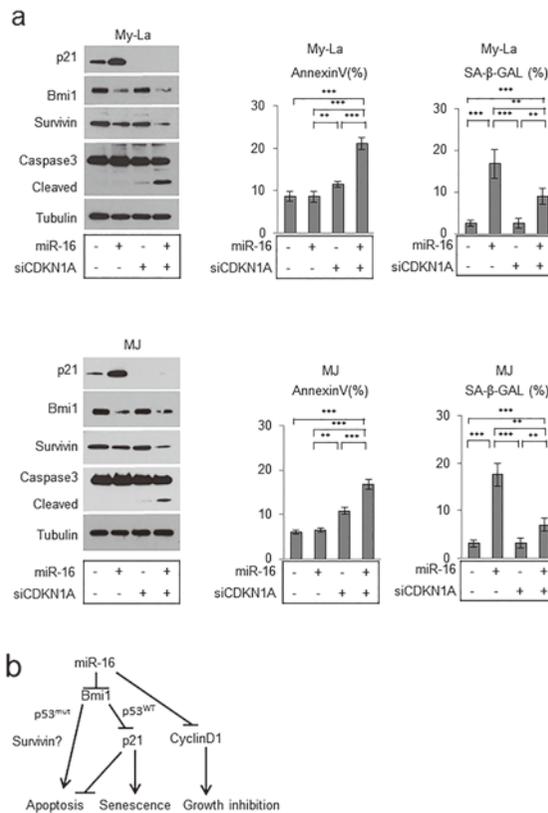


図6. p21の発現亢進の有無により細胞老化・アポトーシス転換が調節される

(a) p53野生型のMy-La株, MJ株を用いてp21ノックダウン (siCDKN1A)下におけるmiR-16導入を行った。ウェスタンブロット, Annexin Vアッセイ, SA-β-GALアッセイを示す。(b) miR-16による細胞老化・アポトーシス転換経路の概要

8. 種々のT細胞リンパ腫においてmiR-16, SAHAはCTCLに対してと同様に, p53機能により細胞老化あるいはアポトーシスを誘導する

ここまで得られた結果がCTCLだけでなく, 種々のT細胞リンパ腫においても一般化されうるか検討するため未分化大細胞型リンパ腫 (ALCL), 成人T細胞性リンパ腫 (ATL), NK/T細胞リンパ腫などの細胞株を用いてmiR-16導入, SAHA暴露の検討を行った。はじめにSAHA暴露によるmiR-16発現変化を確認したところ, いずれの細胞株においてもmiR-16の発現回復を認めた (図8a)。またSA-β-GAL, Annexin Vを用いて細胞老化・アポトーシス誘導を評価したところ, CTCLと同様p53野生型細胞株のSR786株・MT-2株・MT-4株には細胞老化を誘導し, p53変異型の

MOTN1株・Karpas299株・KHYG1株にはアポトーシスを誘導した (図8b)。さらにmiR-16導入・SAHA暴露における蛋白発現変化をウェスタンブロットにて検討し, Bmi1の発現低下やp21の発現亢進, Survivinの低下などCTCLにおける変化と同様の所見を得た (図8c)。これらの結果から, miR-16を介した細胞老化・アポトーシス転換は種々のT細胞リンパ腫においても一般化されることが確認できた。

おわりに

がん遺伝子活性化に対する細胞老化 (oncogene-induced senescence, 以下OIS) は細胞のがん化を回避する生体防御機構の一つとして近年注目を集めている。実際に前がん病変やがんの初期病変では老化した

(34)

Senescence induction via a tumor suppressive microRNA

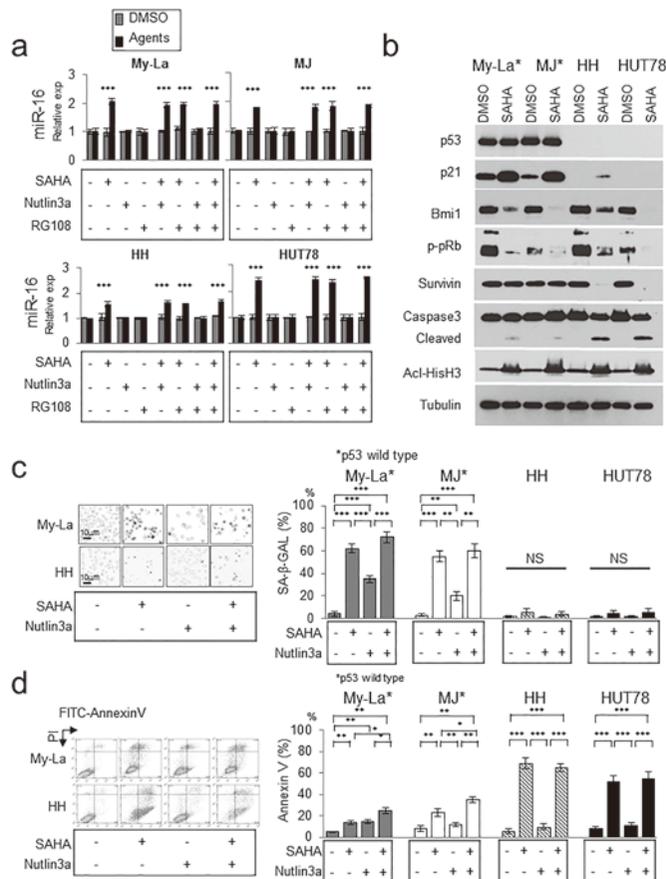


図7. HDAC 阻害剤である SAHA は CTCL 細胞の miR-16 を回復し、細胞老化あるいはアポトーシスを誘導する

(a) SAHA (HDAC 阻害剤), nutlin-3a (MDM2 阻害剤), RG108 (DNA メチルトランスフェラーゼ阻害剤) を用いて CTCL 細胞の miR-16 発現変化を RT-qPCR 法にて評価した。(b) SAHA 暴露における細胞老化関連蛋白 (p53, p21, Bmi1, p-Rb), アポトーシス関連蛋白 (Survivin, Caspase3) をウェスタンブロットにて評価した。ヒストンアセチル化の指標としてヒストン H3 のアセチル化 (AcL-HisH3) を評価した。(c, d) SAHA, nutlin-3a 暴露における細胞老化・アポトーシス誘導を SA-β-Gal アッセイ, Annexin V アッセイにて評価した。

がん細胞が認められるが、進行病変では老化細胞は消失することから、OIS からの回避はがんの進展における不可欠なステップであると考えられる¹⁰⁾。本研究においてがん抑制的 miRNA である miR-16 が、細胞老化を誘導し強力な腫瘍抑制作用を持つことを見出した。miR-16 は患者検体において進行とともに発現低下を認め、OIS からの回避に寄与していることが考えられる。また今回の検討からアポトーシスと細胞老化の相互排他的な関係が見出された。このような細胞老化・アポトーシス転換機構は最近哺乳類の胚発生過程

において報告されているが^{54,11)}、がんにおける報告は全くなく我々独自の視点であると考えている。

さらに今回 miR-16 の発現低下には HDAC が関与していることを見出し、miRNA と HDAC を介したエピジェネティックな細胞老化調節機構ががんの進展に密接に関与していることが示唆された。HDAC 阻害剤は CTCL において他の腫瘍に先駆けて臨床応用が認められた薬剤であるが、興味深いことに CTCL においては p53 変異の頻度が他の悪性リンパ腫に比べ低いことが既に知られている。本研究は CTCL 進行の分

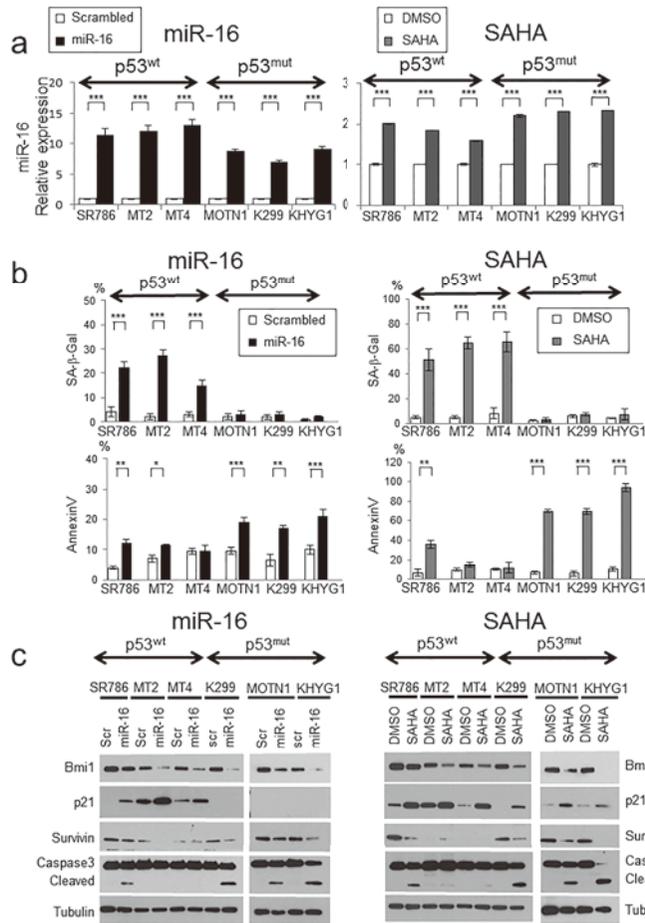


図8. 種々のT細胞リンパ腫においてもmiR-16及びSAHAはp53の機能に応じて細胞老化あるいはアポトーシスを誘導する。

(a) 種々のT細胞リンパ腫細胞株におけるmiR-16導入効率, SAHAによるmiR-16発現回復をRT-qPCRにて評価した。(b) miR-16導入, SAHA暴露における細胞老化・アポトーシスの誘導をSA-β-GALアッセイ, Annexin Vアッセイにて評価した。(c) miR-16導入, SAHA暴露におけるウェスタンブロット解析。

子病態, またこれまで十分明らかでなかったHDAC阻害剤の本質的な標的を明らかにしており, 今後のT細胞リンパ腫治療において重要な示唆をもたらすものと考えている。

謝 辞

今回の研究を遂行するにあたり, 直接ご指導いただきました秋田大学第三内科 田川博之先生に深く感謝申し上げます。また, 日頃よりお世話になっております第三内科 高橋直人教授はじめ医局の先生方, 多く

の実験のサポートを頂きました技術系補佐員の皆さま, 本研究にご協力を頂きました全ての方々へ深く感謝いたします。

引用文献

- 1) Bartel, D.P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, **116**, 281-297.
- 2) Tagawa, H., Ikeda, S. and Sawada, K. (2013) Role of microRNA in the pathogenesis of malignant

- lymphoma. *Cancer Sci.*, **104**, 801-809.
- 3) Ito, M., Teshima, K., Ikeda, S., Kitadate, A., Watanabe, A., Nara, M., *et al.* (2014) MicroRNA-150 inhibits tumor invasion and metastasis by targeting the chemokine receptor CCR6 in advanced cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*, **123**, 1499-1511.
 - 4) Storer, M., Mas, A., Robert-Moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, M.C., Di Giacomo, V., *et al.* (2013) Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell*, **155**, 1119-1130.
 - 5) Litvinov, I.V., Cordeiro, B., Huang, Y., Zargham, H., Pehr, K., Doré, M.A., *et al.* (2014) Ectopic expression of cancer-testis antigens in cutaneous T-cell lymphoma patients. *Clin. Cancer Res.*, **20**, 3799-3808.
 - 6) Teshima, K., Nara, M., Watanabe, A., Ito, M., Ikeda, S., Hatano, Y., *et al.* (2014) Dysregulation of BMI1 and microRNA-16 collaborate to enhance an anti-apoptotic potential in the side population of refractory mantle cell lymphoma. *Oncogene*, **33**, 2191-2203.
 - 7) Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., *et al.* (2005) miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **102**, 13944-13949.
 - 8) Jänicke, R.U., Sohn, D., Essmann, F. and Schulze-Osthoff, K. (2007) The multiple battles fought by anti-apoptotic p21. *Cell Cycle*, **6**, 407-413.
 - 9) Sampath, D., Liu, C., Vasan, K., Sulda, M., Puduvali, V.K., Wierda, W.G., *et al.* (2012) Histone deacetylases mediate the silencing of miR-15a, miR-16, and miR-29b in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **119**, 1162-1172.
 - 10) Braig, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Rudolph, C., Peters, A.H., Schlegelberger, B., *et al.* (2000) Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature*, **436**, 660-665.
 - 11) Muñoz-Espín, D., Cañamero, M., Maraver, A., Gómez-López, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., *et al.* (2013) Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell*, **155**, 1104-1118.