

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	駒林 優樹
<p>学位論文題目</p> <p>Downregulation of miR-15a due to LMP1 promotes cell proliferation and predicts poor prognosis in nasal NK/T-cell lymphoma (邦題：鼻性NK/T細胞リンパ腫においてmiR-15aの発現低下は細胞増殖を促進し、予後不良を予見する)</p> <p>共著者名</p> <p>岸部 幹、長門 利純、上田 征吾、高原 幹、原渕 保明</p> <p>掲載雑誌</p> <p>American Journal of Hematology doi: 10.1002/ajh.23570.</p> <p>研究目的</p> <p>鼻性NK/T細胞リンパ腫は、鼻腔や咽頭に初発し、顔面正中部に沿って進行する破壊性、壊死性の肉芽腫性病変を主体とするNK細胞あるいは<math>\gamma\delta</math>T細胞由来のリンパ腫である。また、本リンパ腫は、腫瘍細胞にEpstein-Barr virus (EBV) を認め、その発癌への関与も報告されている。本疾患は、他のリンパ腫と比較し破壊性が強いことが特徴であり、肺、皮膚、消化管などの他臓器への浸潤が高頻度に出現し、予後が極めて不良である。しかし、これまでに本疾患における病態の解明は、他癌と比較し十分なされていない。よって治療、診断を念頭に置いた腫瘍特性の理解が早急に求められている。microRNAは、タンパクをコードしていない約22塩基長の短い一本鎖RNAでありmRNAからタンパクへの翻訳を負に制御することで様々な生命現象に関与している。近年、各種癌においてmicroRNAの発現異常による発癌が報告されてきている。しかし、本疾患の病態におけるmicroRNAの役割は未だ明らかになっていない。本研究では、鼻性NK/T細胞リンパ腫におけるmicroRNAの発現解析を行い、異常発現しているmicroRNAの機能について検討した。</p> <p>材料・方法</p> <p>1. 患者検体 2003年から2010年までに旭川医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科で鼻性NK/T細胞リンパ腫と診断された16症例の患者検体を使用した。また健康人6名から得られた血清も使用した。全検体はインフォームドコンセントを得た上で採取された。</p> <p>2. 細胞株 鼻性NK/T細胞リンパ腫由来のEBV陽性NK細胞株としてSNK6、SNK1、<math>\gamma\delta</math>T細胞株SNT8、NK細胞性白血病由来のEBV陰性NK細胞株としてKHYG-1、NK細胞性白血病由来のEBV陽性NK細胞株としてNK92、</p>			

バーキットリンパ腫由来のEBV陽性B細胞株としてRaji、T細胞性白血病由来のEBV陰性T細胞株としてJurkatをそれぞれ用いた。

### 3. microRNA microarray

SNK6、SNK1、SNT8、KHYG-1そして健康人より分離した末梢血NK細胞よりmicroRNAを抽出し、Hy5でラベリング後、東レ社3D-GENE microRNA oligo chipにハイブリダイズさせた。3D-GENEスキャナでシグナルを測定し解析した。

### 4. 定量的RT-PCR

各細胞株におけるmiR-15aおよびMYB、cyclin D1、LMP1の発現を解析した。内部標準は、miR-15a解析時にはU47、その他解析にはβ-2-microglobulinを用いてそれぞれ2<sup>-ΔΔCT</sup>法で相対定量した。

### 5. 遺伝子導入

NEON transfection system(invitrogen)を用いたエレクトロポレーション法でmicroRNAおよびsiRNAをSNK6、SNT8に導入した。

### 6. Flow cytometry

Flow cytometryを用いてアポトーシス、細胞周期解析を行った。アポトーシスについては、FITC標識抗Annexin V抗体、PIを用いて解析した。Annexin V陽性/PI陰性およびAnnexin V陽性/PI陽性細胞の割合を計測した。細胞周期についてはPI染色を用いてDNA量を測定し、解析した。

### 7. 細胞増殖能解析

遺伝子導入後24時間、48時間、72時間後の細胞増殖についてMTS溶液を用いた吸光度の測定で解析した。

### 8. Western blotting

各細胞株から蛋白を抽出後、SDS-PAGEしメンブランに転写した。目的蛋白に対する特異抗体を用いて解析した。

### 9. 免疫組織染色

腫瘍組織のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いてCD56とMYB、cyclin D1の二重免疫染色を行った。各タンパクに対する特異抗体およびEnvision G2 Doublestain System (Dako社)を使用した。

## 考 案

### 1. 鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株においてmiR-15aの発現は低下している。

microRNA microarray解析の結果、正常末梢血NK細胞およびKHYG-1と比較し、鼻性NK/T細胞リンパ腫NK細胞株において1/2以下の発現低下を認めるmicroRNAとしてmiR-15aが同定された。定量的PCR解析においても正常NK細胞およびKHYG-1と比較し、鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株でmiR-15aは1/3から1/10の発現低下を認めた。

### 2. 鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株においてmiR-15aは、細胞周期の進行および細胞増殖を抑制する。

鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株におけるmiR-15aの調べるため、miR-15aを核酸導入し、アポトーシス、細胞周期、細胞増殖能について検討を行った。アポトーシス解析の結果、SNK6およびSNT8ともにコントロール導入株とmiR-15a導入株間でアポトーシス細胞の割合に差を認めなかった。細胞周期解析では、SNK6およびSNT8ともにmiR-15a導入株においてG1期細胞の有意な増加とG2/M期細胞の有意な減少を認めた。さらに細胞増殖能解析の結果、miR-15a導入株において細胞増殖能の有意な低下を認めた。

### 3. 鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株においてmiR-15aは、MYBおよびcyclin D1を制御する。

過去に報告されているmiR-15aの標的遺伝子のうち、細胞周期を制御するMYB、cyclin D1に注目し検討を行った。Western blottingの結果、miR-15a導入株においてMYB、cyclin D1の発現低下を認めた。また、細胞株を用いた発現解析の結果、EBV陰性NK細胞株KHYG-1、EBV陽性LMP1陰性NK細胞株NK92と比較し、鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株においてMYB、cyclin D1の発現が亢進している事を認めた。さらに鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株においてMYB、cyclin D1をsiRNAによりノックダウンした結果、miR-15a導入株と同様にG1/S期における細胞周期進行の抑制および細胞増殖能の低下を認めた。

### 4. 鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株においてLMP1はmiR-15aの発現を抑制する。

鼻性NK/T細胞リンパ腫におけるmiR-15aの発現低下の原因について、EBV関連癌タンパクであるLMP1に注目し検討を行った。鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株においてLMP1をsiRNAによりノックダウンした結果、miR-15aの有意な発現上昇を認めた。

### 5. 鼻性NK/T細胞リンパ腫の臨床検体においてmiR-15aの発現は低下し、その発現は患者予後と相関する。

*in vivo*でのmiR-15aの発現を調べるため、本疾患の腫瘍組織を用いて定量的PCR解析を行った。健常人より分離した末梢血NK細胞と比較し、本疾患腫瘍組織においてmiR-15aの有意な発現低下を認めた。また、NK細胞のマーカーであるCD56との二重免疫染色の結果、MYBは16例中7例44%、cyclin D1は5例31%に発現を認め、それぞれmiR-15aの発現を有意な負の相関を認めた。LMP1は7例44%に発現を認め、同様にmiR-15aの発現と有意な負の相関を認めた。さらに、miR-15aの発現と患者予後との関係をKaplan-Meier法で検討した結果、miR-15a低発現群において有意に予後が不良であることを認めた。

## 考 案

今回、我々は鼻性NK/T細胞リンパ腫においてmiR-15aが発現低下していることを明らかにした。これまで慢性リンパ球性白血病、前立腺癌、非小細胞性肺癌等でその発現低下が報告されており、細胞種によりアポトーシス誘導や細胞周期進行抑制に機能することが示されている(引用文献1-3)。本研究では、鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞においてmiR-15aはMYB、cyclin D1の発現抑制を介し、細胞周期および細胞増殖を抑制することを明らかにした。さらにmiR-15a発現低下の原因としてLMP1が関与しており、miR-15aの発現低下が患者予後と相関することを示した。本研究の結果、miR-15aは、鼻性NK/T細胞リンパ腫における有望な治療標的および予後推定のマーカーとなり得る可能性が示唆された。

## 結 論

鼻性NK/T細胞リンパ腫におけるmiR-15aの発現低下は、MYBおよびcyclin D1の発現を介し、細胞周

期、細胞増殖を亢進させ、リンパ腫の発生、進行に関与している可能性が示唆された。




#### 引用文献

1. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2005;102:13944-13949.
2. Bonci D, Coppola V, Musumeci M, et al. The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. Nature medicine 2008;14:1271-1277.
3. Bandi N, Zbinden S, Gugger M, et al. miR-15a and miR-16 are implicated in cell cycle regulation in a Rb-dependent manner and are frequently deleted or down-regulated in non-small cell lung cancer. Cancer research 2009;69:5553-5559.

#### 参考文献

1. Yoshino K, Kishibe K, Nagato T, et al. Expression of CD70 in nasal natural killer/T cell lymphoma cell lines and patients; its role for cell proliferation through binding to soluble CD27. British journal of haematology 2013;160:331-342.
2. Takahara M, Nagato T, Komabayashi Y, et al. Soluble ICAM-1 secretion and its functional role as an autocrine growth factor in nasal NK/T cell lymphoma cells. Experimental hematology 2013;41:711-718.

# 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	駒林 優樹
<p>審査委員長 小林 博也 </p> <p>審査委員 西川 祐司 </p> <p>審査委員 鳥本 悦宏 </p>			
<p>学位論文題目</p> <p><b>Downregulation of miR-15a due to LMP1 promotes cell proliferation and predicts poor prognosis in nasal NK/T-cell lymphoma</b></p> <p>邦題：鼻性 NK/T 細胞リンパ腫において miR-15a の発現低下は細胞増殖を促進し、予後不良を予見する</p> <p>掲載雑誌</p> <p><b>American Journal of Hematology</b></p> <p>doi: 10.1002/ajh.23570</p>			
<p><b>【目的】</b> 近年、各種癌において microRNA の発現異常と発癌との関連性が数多く報告されてきている。しかし、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫の病態における microRNA の役割は、未だ明らかになっていない。本研究は、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株および臨床検体を用いて microRNA の発現解析を行い、異常発現している microRNA の機能について検討した論文である。</p> <p><b>【方法】</b> 各細胞株における microRNA 発現をマイクロアレイ法、リアルタイム PCR 法で解析した。microRNA の機能については、エレクトロポレーションで細胞株へ microRNA を核酸導入し、アポトーシスおよび細胞周期を flow cytometry で、細胞増殖能を MTS アッセイで検討した。microRNA 導入による標的遺伝子タンパク発現の変化は western blotting で解析した。臨床検体における microRNA 発現解析は、リアルタイム PCR 法で行い、標的遺伝子タンパクの発現は、免疫組織染色法で検討した。</p>			

**【結果】** 1. 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株および臨床検体において miR-15a が発現低下していることを認めた。2. 本疾患細胞株において LMP1 発現を抑制することにより miR-15a 発現が亢進することを確認した。3. 本疾患細胞株に miR-15a を強制発現させることで細胞周期の進行が抑制され、細胞増殖が低下することを認めた。4. 本疾患細胞株において、miR-15a の標的遺伝子である MYB、cyclin D1 が高発現しており、miR-15a 導入によりその発現は抑制された。また臨床検体における miR-15a と MYB、cyclin D1 の発現には負の相関を認めた。5. 本症患者において、miR-15a 低発現群で有意に予後が不良であることが認められた。

**【要約】** 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫において miR-15a は、EB ウイルス関連癌タンパク LMP1 により発現が低下していた。この miR-15a の発現低下は、MYB および cyclin D1 の発現を介し、細胞周期の進行や細胞増殖を促進していることが示唆された。これらの結果は、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫の病態における microRNA の関与を新たに見出したもので学術的価値が高いと考える。

論文提出者は、各審査委員の諮問において当該論文および関連領域に関する質問に的確に答え、十分な知識を有することが確認された。また本論文は既に国際的学術雑誌である American Journal of Hematology 誌に掲載済みである。

以上より本審査委員会は、本論文が博士の学位に値するものと判断した。