

## 77. microRNA デリバリーによる進行がんの転移浸潤抑制

田川 博之

\*秋田大学 大学院医学系研究科 腫瘍制御内科系 血液・腎臓・膠原病内科学分野

Key words : microRNA, 悪性リンパ腫, CTCL, miR-150, miR-16

### 緒言

初発の悪性リンパ腫は新たな多剤併用化学療法の改良、分子標的治療の進歩によって予後は大幅に改善されたが、転移や多臓器への浸潤を来す進行・再発性リンパ腫は依然として予後不良である。従って進行症例に対する新たな治療戦略が求められている。本研究では、転移性がん特に、転移性の T 細胞リンパ腫を研究対象にし、従来とは異なった遺伝子病因学的アプローチにより「microRNA 創薬」の開発を模索する。我々は、これまで miRNA のリンパ腫病態への関与の研究成果を報告してきた<sup>1-7)</sup>。これまで蓄積してきた miRNA 発現、機能解析のノウハウを生かした *in vitro* 実験を行いつつ、独自に開発した「がん転移マウス」を利用した *in vivo* 実験系を使用し、がん抑制 miRNA 候補を投与し、生存期間を最も延長させる miRNA を決定して、転移性がんの新たな治療戦略の確立に貢献する。

### 方法

#### 1. 癌抑制的 miRNA の標的分子の同定

miR-16 と miR-150 の標的分子の同定と機能解析を行った。つまり、どのような遺伝子背景のもとで、どの蛋白分子を制御することによって CTCL に細胞老化や転移浸潤抑制を生ぜしめるのかを検討した。RNA の発現解析には Taqman 法による qRT-PCR 法、蛋白は Western blot 法による定量法を使用した。

#### 2. 転移性 CTCL の miRNA デリバリー

我々が確立した「CTCL 転移マウス」を使用し、治療分子候補の miR-16 と miR-150 をそれぞれ 30  $\mu$ M ずつ CTCL 浸潤マウスに経静脈的にアテロコラーゲンとともに投与し、生存を観察した。さらに、miR-16 と miR-150 の同時投与 (15  $\mu$ M ずつ) を行い、より効果的に浸潤を抑制するか否かを検討した。

#### 3. がん進行に伴う miRNA の発現変動

臨床検体で miRNA が病期の進行とともにどの様に変動するのか検討した。検体は、パラフィン切片からマイクロダイヤモンドにより採取し、qRT-PCR による miRNA の定量測定解析を施行した。

#### 4. HDAC 阻害剤 (HDACi) の治療効果の検討

HDAC 阻害剤で miRNA の発現がどの様に変化してくるかを検討した。また、細胞増殖抑制、細胞老化、アポトーシス、転移浸潤抑制に働くかを CTCL 細胞株のみならず、他の T/NK 細胞リンパ腫細胞株でも検討した。

### 結果

#### 1. 癌抑制的 miRNA の標的分子の同定

miR-16 は、p53 の状態に関係なく CTCL 細胞株の増殖を抑制した。p53 野生型の CTCL 細胞株には、細胞老化を誘導した。しかし、p53 が陰性の CTCL 細胞株に対しては、アポトーシスを誘導した。その誘導は p53 が機能し p21 が発現亢進するか否かに依存していた。また、miR-16 は p53 野生型の CTCL にはポリコム蛋白である Bmi1 を介して

p21 の発現を誘導した。しかし、p53 が機能しない場合は、miR-16 は Bmi1 を介して survivin の発現を低下させ、アポトーシスに対する感受性を亢進させた<sup>8)</sup>。miR-150 は、ケモカインレセプターである CCR6 の発現を調節する。CCR6 の高発現が、進行性の CTCL で生じており、CCR6 の高発現はその特異的リガンドである CCL20 との相互作用を増強させた。CCL20 は IL-22 を介してその発現量が調節されているが、IL-22 もまた、miR-150 の制御を受けていた。したがって miR-150 は IL-22-CCL20 のみならず、CCR6 の発現量を調節することによって転移浸潤に関わると考えられた<sup>9)</sup> (図 1)。CCL20 中和抗体や siCCR6 の静脈内投与によっても CTCL マウスの生存期間を延長させることもできた<sup>10)</sup>。

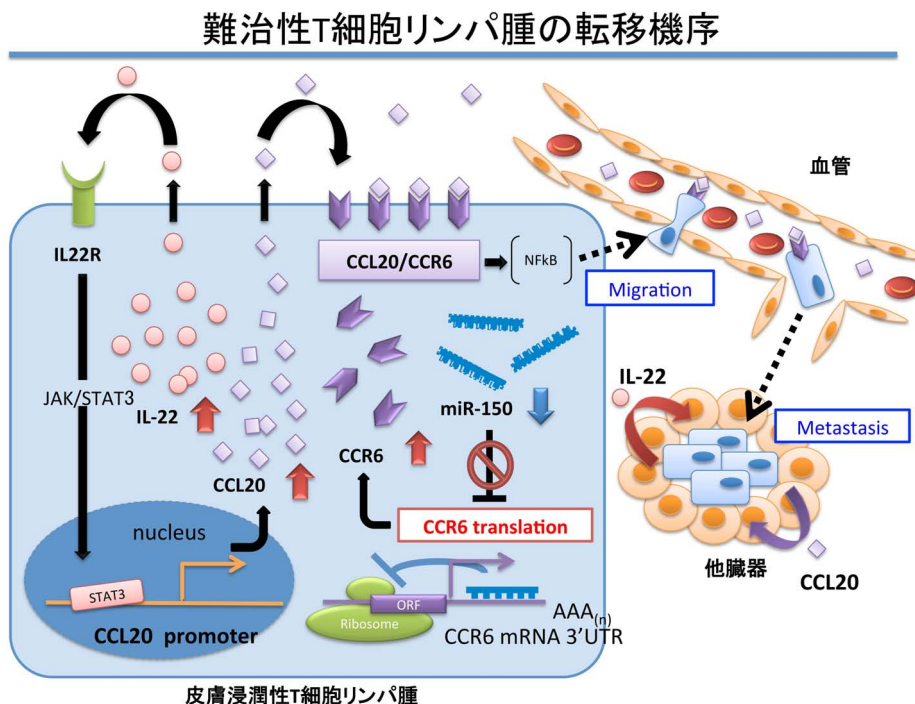


図 1. miRNA 投与による CTCL マウスの生存期間延長

miR-150 は CCR6 の発現を直接抑制するだけでなく IL-22-CCL20 の発現量を調節することによって転移浸潤に関わる。正常 CD4<sup>+</sup>細胞では、miR-150 の発現量は抑制されていないが、CTCL で発現が低下すると、CCL20 および CCR6 が過剰発現し、その interaction によって、CTCL 細胞は栄養濃度勾配依存性に血行性に転移する。

## 2. 転移性 CTCL の miRNA デリバリー

*In vivo* の実験系では miR-16 投与 (5 日間隔投与) で CTCL 転移マウスの生存期間が有意に延長することを見いだした。miR-150 の投与でも CTCL 転移マウスの生存期間が有意に延長した (論文投稿中)。さらに、miR-16 と miR-150 を併用すると、単独で使用するよりも生存期間延長効果はより増大した (図 2)。

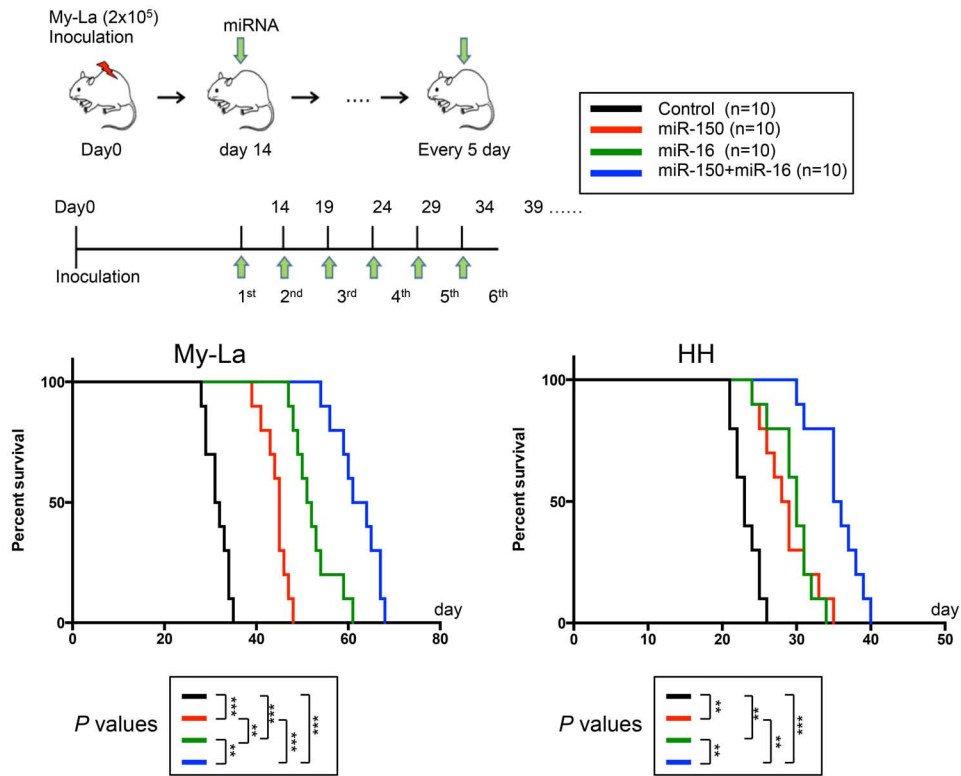


図2. miR-16 と miR-150 の *in vivo* 投与による CTCL マウスの生存期間延長

上図:投与方法。下図:生存曲線。黒線:control、赤線:miR-150 投与、緑線:miR-16 投与、青線:miR-16+miR-150 投与。統計処理はカプランマイヤー法による。P 値: \*\* $0.001 \leq P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

### 3. がん進行に伴う miRNA の発現変動

miRNA は、腫瘍の進展に伴って発現が低下してくるが miR-150 は進行期で発現低下が認められ、miR-16 は初期ですでに発現低下が認められた (図 3)。

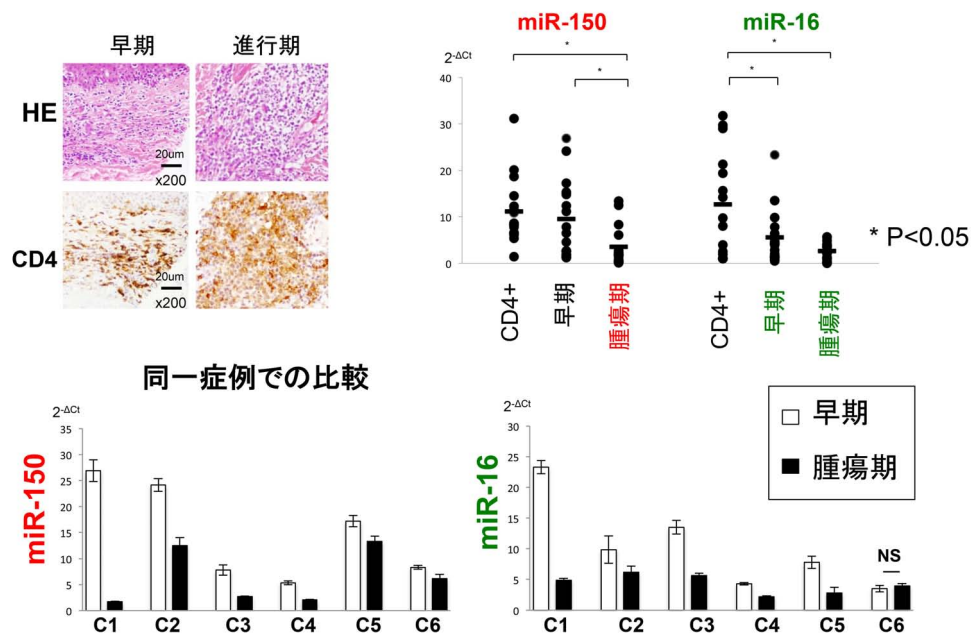


図3. CTCLにおけるmiR16とmiR-150の発現解析

早期では、miR-16の発現低下がみられるのに対して、腫瘍期ではmiR-150の発現低下が生じた。上図左：HE染色とCD4細胞の染色。上図右：miR-16とmiR-150のCTCLでの発現解析（CD4<sup>+</sup>: n = 18, 早期: n = 16, 進行期: n = 16, p値はMann-Whitney U testによる）。CD4<sup>+</sup>はアレルギー性皮膚炎患者のCD4<sup>+</sup>細胞である。下図は、同一症例での早期と進行期の腫瘍のmiR-16とmiR-150の定量発現解析である。進行期でmiR-150の発現が低くなっていた。

#### 4. ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）の阻害剤（HDACI）の治療効果の検討

我々は、SAHA/vorinostatを始めとするHDACIの投与によってこれらのmiRNAの発現が「元に戻る=restore」ことを*in vitro*実験系で見出した。また、元に戻ることによる細胞老化の誘導や転移浸潤の抑制も見出した。この効果は、miR-16導入と全く同様の効果であった。つまりSAHA/vorinostatはmiR-16やmiR-150の発現回復を通じて、細胞老化または、アポトーシス、さらに、転移浸潤の抑制を生じさせていると結論づけられた。

### 考 察

結果項目に示した様に、miR-16（細胞老化、細胞増殖抑制、アポトーシス誘導）とmiR-150（転移浸潤抑制）はそれぞれ別の腫瘍抑制カスケードに作用することによってCTCLマウスの生存期間を有意に延長させることができる。そして、miR-16はmiR-150よりその腫瘍抑制効果が強い。また、p53野生型の腫瘍の方がより、腫瘍の抑制を受けやすい。しかし、miR-150の転移浸潤抑制効果は、p53の有無で、生存期間延長効果に差を生じさせない様である。p53の有無によって細胞老化とアポトーシスのスイッチの切り替えが生じていると考えられる。今後は、p53野生型細胞株に対するノックアウト実験によってさらなる検討を続け、p53-p21経路の、細胞老化における重要性について検討を続けていく予定である。

これらのことから、miR-16とmiR-150のコンビネーションによってマウスの生存期間をより延長させることが期待できる。現在、臨床で使用されているHDACIであるSAHA/vorinostatは、経口投与で、CTCLを始めとする進行性のT細胞リンパ腫でその腫瘍抑制効果が報告されており、実臨床で使用されている。このSAHA/vorinostatは、miR-16やmiR-150の発現を回復させることから、これらのmiRNAの発現低下はCTCLの病態でHDACの活性化が生じていることを強く示唆している（図4）。

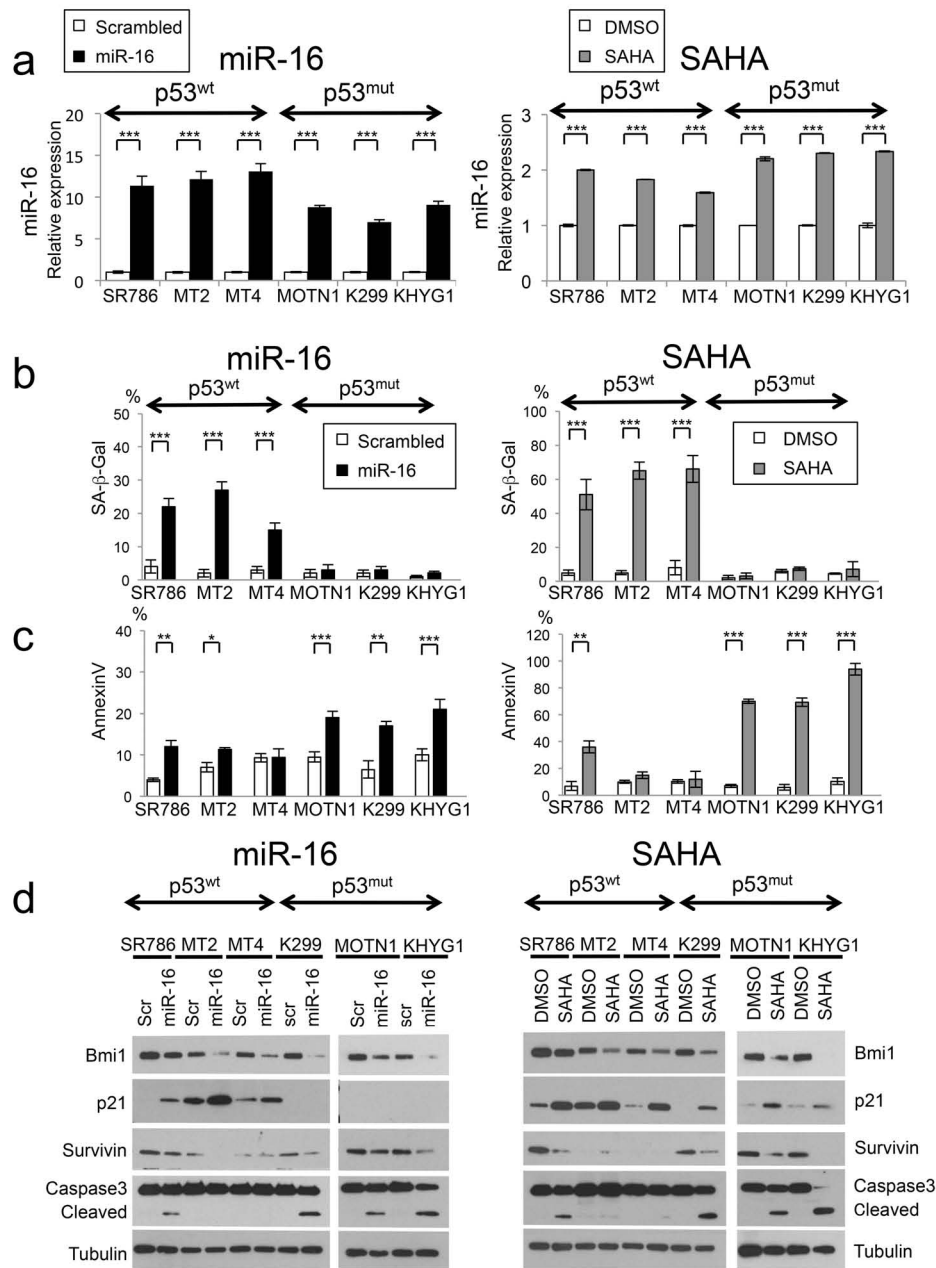


図4. SAHA 投与による miR-16 とその標的分子の発現回復

a) miR-16 導入と SAHA 投与による miR-16 の発現回復と細胞老化またはアポトーシスの誘導。b、c) miR-16 導入と SAHA 投与による細胞老化誘導 (b、p53 野生細胞株=p53<sup>wt</sup>) または、アポトーシス誘導 (c、p53 変異細胞株=p53<sup>mt</sup>)。d) miR-16 導入または SAHA 投与による標的がん蛋白 (Bmi-1、Survivin) の発現抑制。p21 の発現は p53 野生細胞株ではこれらの導入または暴露で Bmi-1 を介して発現が回復する。p53 変異型ではこれらの暴露または導入で Bmi-1 を介して survivin の発現が抑制される。a-c の統計処理には Student's t-test が使われ、バーは3つの独立した実験の standard error of the mean (SEM) である。P 値：\*0.01 ≤ P < 0.05、\*\*0.001 ≤ P < 0.01、\*\*\*P < 0.001。

miRNA の段階的発現で興味深いのは、miR-16 は CTCL の病初期から発現が低下するのに対して、miR-150 の方は、進行期にならないと発現が低下してこないことである。HDAC には、現在十数種類が知られているが、初期と進行期

では、HDAC の発現の種類や、組み合わせが異なることが推測されるし、進行期には genomic な変異等が新たに加わると推測される（図5）。

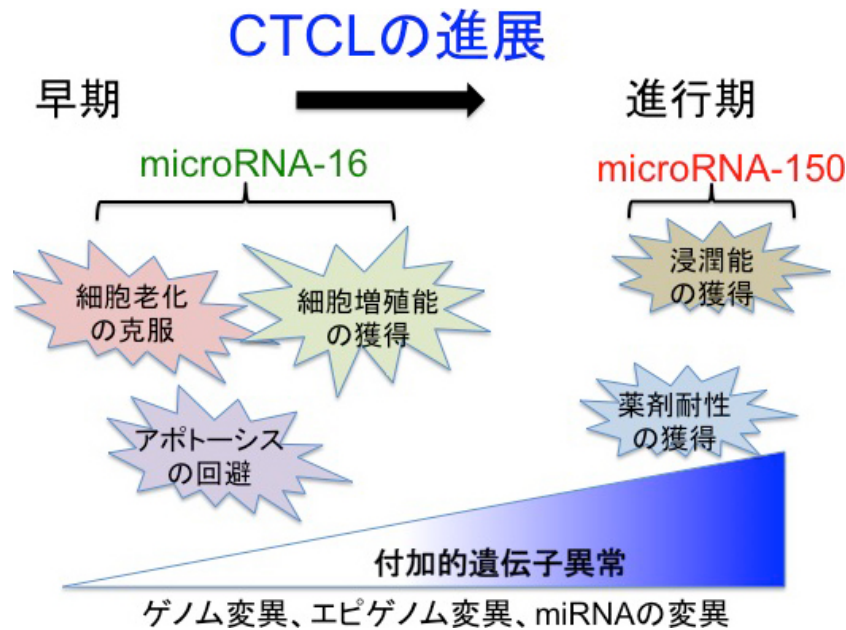


図5. CTCL 多段階発がんにおける miR-16 と miR-150 の関与

HDAC 発現の異常が miRNA の発現異常を引き起こすと推測される。初期では HDAC の活性化をきたす様な genomic 変異が生じていると推測される。また、初期と進行期では、HDAC の発現の種類や、組み合わせが異なると推測され、進行期には genomic な変異等があらたに加わることが推測される。

今回の研究では、miRNA が新たな薬剤その物になり得ることが示されたが、今後の検討課題として miRNA デリバリーに用いる輸送担体物質、投与間隔、投与量などを多角的に検討し、個々の腫瘍種による miRNA 投与法の最適化を行う必要があり、現在検討を続けている。

### 共同研究者

本研究の共同研究者は、秋田大学大学院血液・腎臓・膠原病内科学講座の北館明宏、池田翔、手島和暁、阿部史人、高橋直人である。臨床検体に関しては東京大学皮膚科の菅谷誠先生、宮垣朝光先生からのご提供を頂いた（検体提供に関する各大学の倫理委員会の承認済）。

### 文 献

- 1) Inomata M, Tagawa H(co-first), Guo Y, Kameoka Y, Takahashi N, Sawada K. MicroRNA-17-92 downregulates expression of distinct targets in different B-cell lymphoma subtypes. Blood 2009;113:396-402. doi: 10.1182/blood-2008-07-163907. Epub 2008 Oct 21. Erratum in: Blood. 2009 May 21;113(21):5368.
- 2) Yamanaka Y, Tagawa H (co-first), Takahashi N, Watanabe A, Guo Y-M, Iwamoto K, Yamashita J, Saitoh H, Kameoka Y, Shimizu N, Ichinohasama R, Sawada K. Aberrant overexpression of microRNAs activate AKT signaling via downregulation of tumor suppressors in NK-cell lymphoma/leukemia. Blood 2009;114:3265-3275. doi: 10.1182/blood-2009-06-222794. Epub 2009 Jul 29. PMID: 19641183.
- 3) Watanabe A, Tagawa H (co-first), Yamashita J, Teshima K, Nara M, Iwamoto K, Kume M, Kameoka Y, Takahashi N, Nakagawa T, Shimizu N, Sawada K. The role of microRNA-150 as a tumor suppressor in malignant lymphoma. Leukemia 2011;25:1324-1334. doi: 10.1038/leu.2011.81. Epub 2011 Apr 19. PMID: 21502955.
- 4) Teshima K, Nara M, Watanabe A, Ito M, Ikeda S, Hatano Y, Oshima K, Seto M, Sa wada K, Tagawa H. Dysregulation of BMI1 and microRNA-16 collaborate to enhance an anti-apoptotic potential in the side population of refractory mantle cell lymphoma. Oncogene 2014;33:2191-2203. doi: 10.1038/onc.2013.177. Epub 2013 May 20. PMID: 23686310.

- 5) Tagawa H, Ikeda S, Sawada K. The role of microRNA in the pathogenesis of malignant lymphoma. *Cancer Sci.* 2013;104:801-809. doi: 10.1111/cas.12160. Epub 2013 Apr 29. Review. PMID: 23551855.
- 6) Ikeda S, Tagawa H. Dysregulation of microRNAs and their association in the pathogenesis of T-cell lymphoma/leukemias. *Int J Hematol.* 2014;99(5):542-552. doi: 10.1007/s12185-014-1535-9. Epub 2014 Feb 25. Review. PMID: 24567260.
- 7) Tagawa H. microRNA in Malignant Lymphoma. *Adv Exp Med Biol.* 2015;889:41-50. doi: 10.1007/978-3-319-23730-5\_3. PMID: 26658995.
- 8) Kitadate A, Ikeda S, Teshima K, Ito M, Toyota I, Hasunuma N, Takahashi N, Miyagaki T, Sugaya M, Tagawa H. MicroRNA-16 mediates the regulation of a senescence-apoptosis switch in cutaneous T-cell and other non-Hodgkin lymphomas. *Oncogene.* 2016 Jul 14;35(28):3692-704. doi: 10.1038/onc.2015.435.
- 9) Ito M, Teshima K, Ikeda S, Kitadate A, Watanabe A, Nara M, Yamashita J, Ohshima K, Sawada K, Tagawa H. MicroRNA-150 inhibits tumor invasion and metastasis by targeting the chemokine receptor CCR6 in advanced cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 2014;123:1499-1511. doi: 10.1182/blood-2013-09-527739. Epub 2014 Jan 2. PMID: 24385540.
- 10) Ikeda S, Kitadate A, Ito M, Abe F, Nara M, Watanabe A, Takahashi N, Miyagaki T, Sugaya M, Tagawa H. Disruption of CCL20-CCR6 interaction inhibits metastasis of advanced cutaneous T-cell lymphoma. *Oncotarget.* 2016 Mar 22;7(12):13563-74. doi: 10.18632/oncotarget.6916.