

# AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学研究フォーラム (2014.02) 14巻1号:66～68.

平成23.24年度「独創性のある生命科学研究」個別研究課題  
18)鼻性NK/T細胞リンパ腫におけるEBウイルスmicroRNAの機能解析

研究代表者 駒林 優樹

18) 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫における EB ウイルス  
microRNA の機能解析

研究代表者 駒林 優樹

[研究背景と目的]

microRNA(miR) は、タンパクをコードしない 22 塩基程度の短鎖 RNA であり標的遺伝子 mRNA の 3' 非翻訳領域に結合し、タンパクへの翻訳を抑制することで遺伝子発現を調節している。近年発癌のメカニズムのひとつとして microRNA の発現異常が様々な癌で報告されている。しかし、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫の病態における microRNA の役割についてはほとんど解明されていない。また本疾患は、EB ウイルス関連腫瘍である。この EB ウイルスにも microRNA が存在することが明らかになっており、EBV-microRNA はウイルス感染の維持に必要であり、さらに宿主の遺伝子発現の調節も行っていることが報告されてきている。したがって、本疾患において EB ウイルス microRNA が宿主であるヒトの遺伝子発現を調節し、発癌に関与している可能性がある。本研究は、これらの EB ウイルス microRNA の分子生物学的意義を検討することにより鼻性 NK/T 細胞リンパ腫における EB ウイルスの microRNA の発癌への関与を調べることを目的とする。

[研究方法]

患者検体として当科で鼻性NK/T細胞リンパ腫と診断された13名の腫瘍組織を使用した。また健常人8名より得られた検体を用いた。全検体はインフォームドコンセントを得た後、治療前に採取された。細胞株は、鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株としてSNK6、SNK1、SNT8を用いた。その他、EBV陽性NK細胞株としてKAI3、YTを、EBV陰性NK細胞株としてKHYG1を、EBV陽性B細胞株としてRajiをそれぞれ使用した。

1. 鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株よりRNAを抽出し、EBV-microRNAについてマイクロアレイ解析を行った。さらに候補microRNAについて、患者検体および細胞株での発現をrealtime-PCR法により解析した。
2. 候補microRNAの標的遺伝子についてmicroRNAの標的遺伝子データベースであるTargetScanを用いて検索した。候補標的遺伝子については、3' UTRレポーターベクター、microRNA mimicを用いたレポーターアッセイで検証を行った。
3. 鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株SNK6に候補microRNA mimicおよびinhibitorをエレクトロポレーション法により核酸導入し標的遺伝子の発現の変化をウェスタンブロット法で解析した。さらにmicroRNA導入株におけるアポトーシス細胞の変化についてAnnexin V/PI染色を用いて検討した。

[結果と考察]

1. マイクロアレイ解析の結果、鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株において複数のEBV-microRNAが発現していることが確認された(図1)。このうち3株ともに高発現を認めたebv-miR-BART22に注目し、さらに発現解析を行った。realtime-PCR解析では、鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株を含めたEBV陽性細胞株においてebv-miR-BART22の発現を認めた(図2A)。また、腫瘍組織において高発現を認めたが、正常NK細胞および鼻粘膜組織には発現を認めなかった
2. TargetScanを用いたebv-miR-BART22の標的遺伝子の検索の結果、癌抑制遺伝子であるPDCD4が同定された(図3)。Hela細胞にmicroRNA mimicおよびPDCD4 3' UTRレポーターベクターをコトランスフェクションし、レポーターアッセイを行った結果、control mimicと比較しmiR-BART22 mimic導入株においてルシフェラーゼ発現が抑制され、PDCD4がebv-miR-BART22の標的遺伝子であることが示唆された(図3)。
3. 次に鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株SNK6にebv-miR-BART22のmimicおよびinhibitorを核酸導入し、PDCD4発現の変化を検討した。その結果、miR-BART22 mimic導入によりPDCD4発現は低下し、一方inhibitor導入によりPDCD4発現は増強した(図4)。以上より鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株

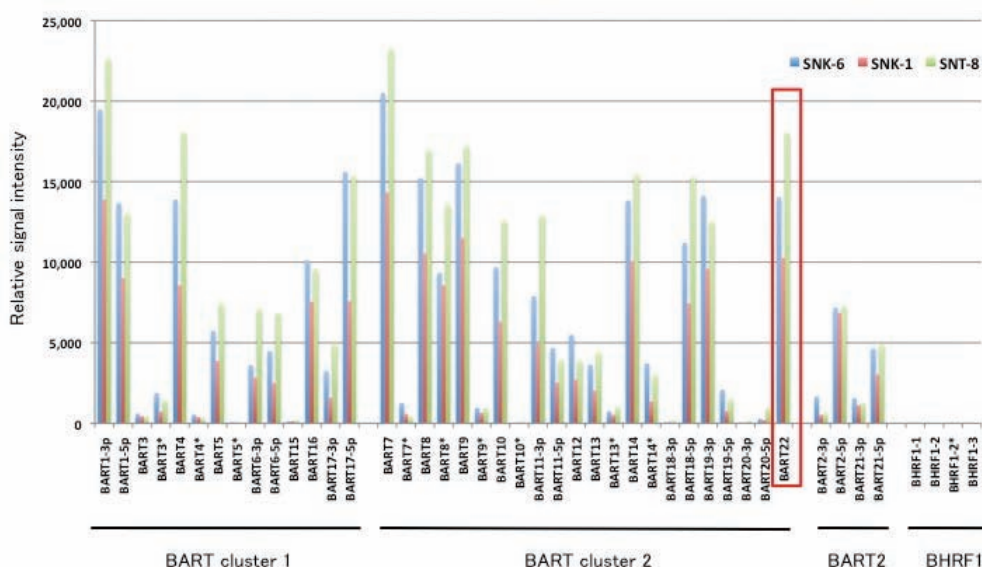


図1 鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株におけるebv-microRNAの発現

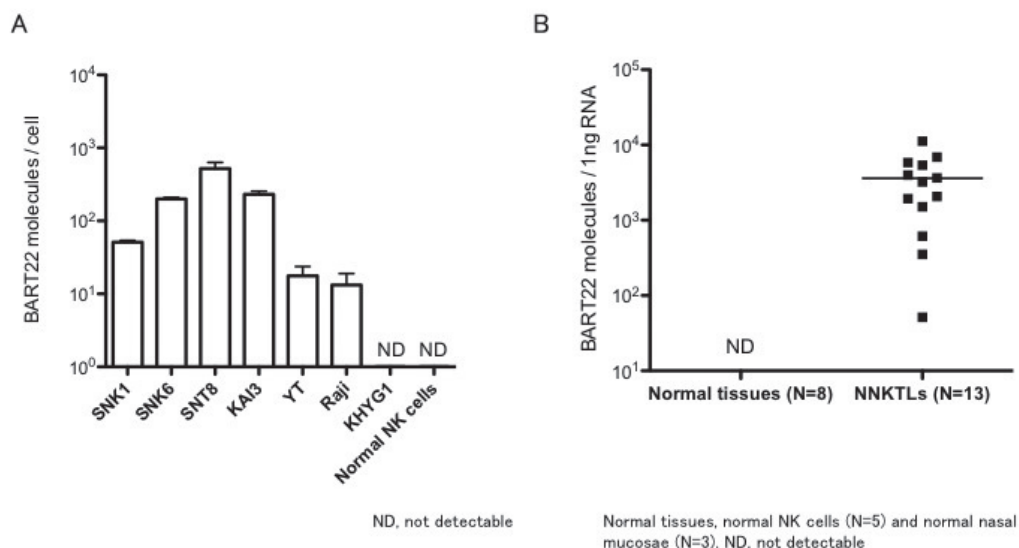


図2 鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株および腫瘍組織における ebv-miR-BART22 の発現

ebv-miR-BART22 : 3' UGAUGAUCUGGUACUGAAACAUU  
 | | | | | | | |  
 Position 542-549 of PDCD4 3' UTR : 5' ... AAGACUAGACAGUUAAGUAAAAG...

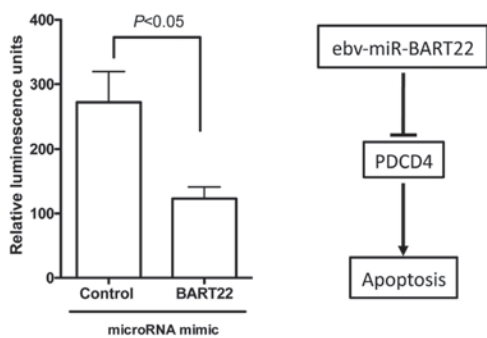


図3 Ebv-miR-BART22の標的遺伝子検索

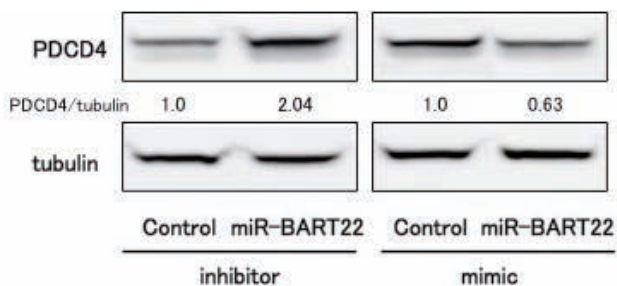


図4 miR-BART22 mimic および inhibitor 導入による PDCD4 発現の変化

においても ebv-miR-BART22 が PDCD4 発現を制御することが確認された。またアポトーシス解析では、ebv-miR-BART22 inhibitor 導入株において control 導入株と比較し、アポトーシス細胞の割合が有意に増加していた (図5)。

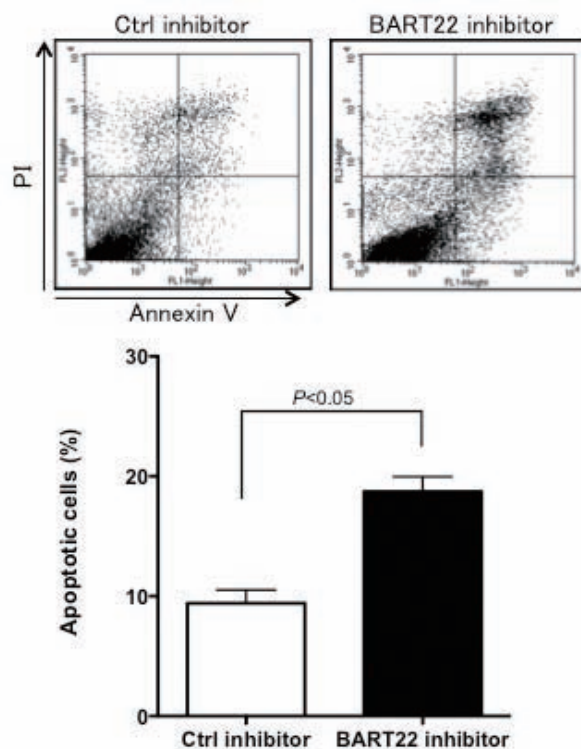


図5 miR-BART22 inhibitor 導入によるアポトーシスの変化

以上の結果より、鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞において ebv-miR-BART22 は、癌抑制遺伝子である PDCD4 を抑制的に制御することによりアポトーシスを抑制し、本疾患の病態に関与している可能性が示唆された。