

MicroRNA-23b is a Potential Tumor Suppressor in Diffuse Large B-cell Lymphoma

Jehyun Nam[†], Eunkyung Kim[†], Jinyoung Kim, Dawoom Jeong, Donguk Kim, Bomi Kwak and Sang-Woo Kim*

Department of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

Received December 14, 2016 / Revised January 4, 2017 / Accepted January 4, 2017

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the most common type of non-hodgkin lymphoma. Advances in the chemotherapeutic treatment of this disease have improved the outcomes of DLBCL; nonetheless, many patients still die of DLBCL, and therefore, a better understanding of this disease and identification of novel therapeutic targets are urgently required. In a recent gene expression profiling study, PDE (phosphodiesterase) 4B was found to be overexpressed in chemotherapy-resistant tumors. The major function of PDE4B is to inactivate the second messenger cyclic 3',5' monophosphate (cAMP) by catalyzing the hydrolysis of cAMP to 5'AMP. It is known that cAMP induces cell cycle arrest and/or apoptosis in B cells, and PDE4B abolishes cAMP's effect on B cells. However, the mechanism by which PDE4B is overexpressed remains unclear. Here, we show that the aberrant expression of miRNA may be associated with the overexpression of this gene. The PDE4B 3' untranslated region (UTR) has three functional binding sites of miR-23b, as confirmed by luciferase reporter assays. Interestingly, miR-23b-binding sites were evolutionarily conserved from humans to lizards, implying the critical role of PDE4B-miR-23b interaction in cellular physiology. The ectopic expression of miR-23b repressed PDE4B mRNA levels and enhanced intracellular cAMP concentrations. Additionally, miR-23b expression inhibited cell proliferation and survival of DLBCL cells only in the presence of forskolin, an activator of adenylyl cyclase, suggesting that miR-23b's effect is via the downregulation of PDE4B. These results together suggest that miR-23b could be a therapeutic target for overcoming drug resistance by repressing PDE4B in DLBCL.

Key words : cAMP, DLBCL, MicroRNA, miR-23b, PDE4B

서 론

미만성 거대 B 세포 림프종(diffuse large B cell lymphoma, DLBCL)은 B 세포 림프구 유래의 암으로, 림프종의 50% 정도를 차지할 만큼 가장 흔한 형태이다[15]. B 세포 표면에서 주로 발견되는 세포 표면 단백질인 CD20에 대한 단일 클론 항체인 Rituximab이 기존의 표준 항암 치료 요법에 더해진 면역항암제 병용요법이 개발되어 생존률이 향상되었지만, 사망률이 40%에 이르는 것으로 나타나고 있다. DLBCL의 치유율을 높이기 위해서 이 암을 분자 세포 유전학적인 이해와 이를 바탕으로 한 표적 치료제의 개발이 시급한 상황이다[16]. 최근 이러한 노력의 일환으로 환자 샘플을 이용한 유전자 발현 프로파일링에서 DLBCL을 최소한 2개의 그룹, ABC (activated B-cell

like)와 GCB (germinal center B-cell like) DLBCL로 나누게 되었다[1]. GCB DLBCL에서는 염색체 전좌에 의하여 BCL2의 과발현이 특징적이며, ABC DLBCL은 NF- κ B 신호 경로의 과활성화가 관찰되며 NF- κ B 저해제에 매우 민감하다. DLBCL의 유전자 발현 분석을 통하여, 형태학적으로는 매우 비슷하나 임상 양상으로는 아주 다양한 이유를 설명할 수 있는 계기가 되었다. 따라서, DLBCL의 분자 유전학적 이해는 biomarker와 환자 맞춤형 표적 항암 치료제 개발에 크게 기여할 것으로 기대된다.

고리형 AMP (cyclic AMP, cAMP)는 단백질 인산화효소 A (Protein Kinase A, PKA) 또는 Exchange Protein directly Activated by cAMP (EPAC)의 활성을 조절함으로써 다양한 세포 생리 활성을 조절하는 2차 신호전달자로써 알려져 있다 [3, 5, 6]. cAMP의 합성과 분해는 아데닐산고리화효소(adenylyl cyclase)와 인산이에스테르 가수분해효소(phosphodiesterase, PDE)에 의한다. PDE는 지금까지 11개 family가 알려져 있는데, PDE4 유전자 family가 B 세포에서 주요 역할을 한다 [17]. PDE4B 유전자는 항암치료제에 내성을 보이고 난치성의 DLBCL 환자 샘플에서 특이적으로 과발현되어 항암제 내성과 연관된 것으로 나타났다[15]. cAMP는 PI3K/AKT 신호 경로

[†]Authors contributed equally.

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-2260, Fax : +82-51-581-2962

E-mail : kimsww@pusan.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

를 저해함으로써 세포 증식 저해와 세포사를 유도하며, DLBCL에서 PDE4B의 과발현은 cAMP의 이러한 저해 효과를 소멸시킴으로써 세포 증식과 세포 생존을 유도하는 것으로 밝혀져 PDE4B 유전자가 DLBCL 발달과 항암제 내성을 유발하는 기작이 일부 규명되었다[16]. PDE4B는 백혈병과 DLBCL을 비롯한 림프종 치료에 가장 널리 쓰이는 약제중의 하나인 glucocorticoid (GC)에 대한 약제 내성에 관여하고 이 유전자의 기능을 저해함으로써 GC 내성을 극복할 수 있는 것으로 나타났다[10]. Roflumilast, GSK256066을 포함하여 지금까지 많은 PDE4(B) 저해제가 염증질환의 치료 목적으로 개발되었고, 2016년 8월에 Roflumilast를 B 세포 림프종 치료를 위한 임상 시험(phase 1b)이 성공적으로 수행되어 의약품 재개발(drug repositioning)을 통해 B 세포 림프종 환자 치료에 효과적으로 이용될 것으로 기대된다[2, 4, 9].

마이크로 RNA (microRNA, miRNA)는 단백질을 암호화하지 않는 작은 단일 가닥 RNA 분자로서 그 길이가 19-22 nucleotides 정도이며, 표적 mRNA의 3'-untranslated region (UTR)에 서열 특이적으로 결합하여 표적 mRNA의 안정성이나 번역을 저해함으로써 유전자 발현을 저해하는 것으로 알려져 있다[2]. 1993년 Ambros 그룹에 의해 처음 그 존재가 밝혀진 miRNA는 인간 유전체에서 약 1,000여개 정도가 밝혀졌으며, 전체 유전자 발현의 60% 이상이 miRNA의 조절을 받을 것으로 예상되어, 발생, 분화, 세포 증식, 세포사 등 기본적인 생명 현상을 조절한다[7]. 정상 세포에서 필수 조절자인 miRNA가 암을 비롯한 여러 질병과도 밀접한 관련이 있다는 연구 결과가 보고되었고, DLBCL 환자 샘플을 이용한 miRNA 계층을 정상 세포와 비교 분석한 결과, 많은 miRNA의 카피수와 발현이 비정상적인 것으로 조사되었다[13]. MicroRNA-31과 -125는 miRNA 프로파일링에서 환자 샘플 특이적으로 저발현, 과발현 된 것으로 나타났으며, NF- κ B-inducing kinase (NIK)와 TNFAIP3 (A20)을 각각 표적함으로써 종양억제 유전자(tumor suppressor)와 종양 유전자(oncogene)의 역할을 하는 것으로 밝혀졌다[12, 18].

본 연구에서는 DLBCL에서 항암제 내성에 관여된 PDE4B 유전자를 표적하는 tumor suppressor miRNA를 발굴하여 그 기능을 분석하고 치료표적으로서의 가능성을 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에서 사용된 human embryonic kidney (HEK) 293과 OCI-Ly1 DLBCL 세포주는 10% FBS와 1% 항생제가 포함된 DMEM, RPMI1640 배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C 조건하에서 배양하였다. Western blot에 사용된 1차 항체와 2차 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및

Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. Adenylyl cyclase 활성약제인 forskolin은 Sigma 제품을 이용하였다.

Real-time quantitative reverse transcription (qRT)-PCR 분석과 miR-23b 과발현 OCI-Ly1 세포주 제작

MiR-23b 과발현 OCI-Ly1 세포주 제작을 위하여, miR-23b precursor 서열을 Murine Stem Cell Virus (MSCV)-puro retroviral vector의 BglIII/EcoRI 자리에 클로닝하여 바이러스 형태로 OCI-Ly1 세포주에 감염 후 puromycin으로 selection하였다[8]. 클로닝에 사용한 primer는 다음과 같다: MSCV-miR-23b-forward ttttagatctggtccctgcatctttctca; MSCV-miR-23b-reverse ttggaattcacaagcggaaccaatcac. MiR-23b와 PDE4B 발현 정도를 확인하기 위하여 각각 Stem-loop real-time qRT-PCR(Life Technologies)과 SYBR Green(Enzymomics, Daejeon, Korea)을 이용한 real-time qRT-PCR을 수행하였고, PDE4B와 miR-23b의 상대적 발현정도는 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 공식을 이용하였다.

PDE4B 3'-UTR의 클로닝, site-directed mutagenesis 및 luciferase reporter assay

MiR-23b의 예상 결합자리를 포함하는 PDE4B 3'-UTR 서열을 psiCHECK-2 vector (Promega)의 XhoI/NotI 자리에 클로닝하였고, 사용한 primer는 다음과 같다: Forward tttctcagtcattgtgcttgggtcaa; Reverse tgcggcgcctgcacattgtgccatttc. MiR-23b의 예상 결합자리 변이시키기 위하여 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)를 이용하였으며, 사용한 primer는 다음과 같다(1, 2, 3은 세 개의 miR-23b 예상 결합자리를 의미한다): Forward-1 gaaaacaataaacattctcaattttataataaaatg; Reverse-1 cattttataataaaattgagaatgtttattgttttc; Forward-2 caattttataataaattctcaactgatgtgac; Reverse-2 gcatcatcagttgagaatttataaaatg; Forward-3 gcaattacgcaattccaagctctctg; Reverse-3 cagaagaggcttgagaattgcgtaattgc. MUT1은 첫 번째 결합자리만, MUT2는 첫 번째와 두 번째, MUT3은 세 결합자리 모두 변이된 PDE4B 3'-UTR을 의미한다. 변이된 nucleotides는 Sanger sequencing을 통하여 확인하였다. Luciferase reporter 실험을 위하여 WT 또는 mutant (MUT) PDE4B 3'-UTR을 control 또는 miR-23b oligonucleotides와 cotransfection 하여 24시간 후에 dual-luciferase reporter assay을 수행하였다.

세포내 cAMP 농도 측정

Ly1-MSCV 또는 -miR-23b 세포주에 Adenylyl cyclase 활성화 약제인 forskolin (40 μ M, 1 hr)을 처리한 후 cell lysate를 준비하였으며, Parameter cAMP Assay Kit (R&D Systems)를 이용하여 세포내 cAMP 농도를 측정하였다[11].

MTT assay, 세포수 관찰 및 통계 처리

Forskolin이 세포 분열에 미치는 영향을 분석하기 위하여, OCI-Ly1 MSCV와 MSCV-miR-23b 세포주에 Forskolin 40µM을 처리하였다. 24, 48, 72, 96시간 후에 MTT를 처리하고 흡광도를 분석하거나 hemacytometer를 이용하여 세포수를 분석하였다. 모든 실험 결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였고, Student *t*-test를 이용하여 통계적 유의성을 검증하였다[14].

결과 및 고찰

PDE4B 3'-UTR에 miR-23b 결합자리 존재

항암제 내성을 보이는 DLBCL 환자 샘플 특이적으로 PDE4B 유전자가 과발현되어 있으나, 정확한 기작은 아직 밝혀지지 않은 상태이다. MiRNA의 비정상적인 조절이 종양 유전자의 과발현, 종양 억제 유전자의 저발현, 또는 항암제 내성을 비롯하여 암 발생과 관련이 있다는 보고에 근거하여[13], 본 연구실에서는 PDE4B를 표적하는 miRNA를 발굴하고자 표적 예측 프로그램(TargetScan, 버전 6.2)을 사용하였다[8]. MiR-23b 예상 결합자리가 PDE4B 3'-UTR에 존재함을 알고, 실제 miR-23b와 PDE4B mRNA와 직접적으로 결합하는지 분석하기 위하여 Luciferase assay를 수행하였다. 인간의 PDE4B

3'-UTR에는 세 개의 예상 결합자리가 존재하여, miRNA와의 결합에 중요한 역할을 하는 seed sequence중 3개의 nucleotide를 변이시키고 각각 PDE4B MUT1, 2, 3라 명명하였다(Fig. 1A). MiR-23b 또는 대조군oligonucleotides와 WT 또는 PDE4B MUT1, 2, 3 constructs을 cotransfection한 후 Luciferase reporter assays를 수행하였다(Fig. 1B). 예상 결합자리가 WT일 경우 miR-23b oligonucleotides에 의해 Luciferase 활성이 약 70% 감소하였으나, 세 개의 결합자리가 모두 변이된 MUT3의 경우는 거의 감소하지 않음을 관찰하였다. MUT1, 2의 luciferase 활성이 거의 같음을 고려할 때, 두 번째 결합자리는 기능을 하지 않고 첫 번째와 세 번째 자리에 miR-23b가 직접적으로 결합함을 알 수 있다.

Luciferase assay 결과를 림프종 세포주인 OCI-Ly1에서 재확인 하기 위해 MSCV retroviral vector를 이용하여 miR-23b를 안정적으로 발현시켰다. MiR-23b 과발현 세포주는 대조군에 비하여 약 15배 과발현 되었고(Fig. 1C), PDE4B mRNA는 90% 감소하였음을 고려할 때, miR-23b는 PDE4B mRNA를 직접적으로 표적함을 알 수 있다(Fig. 1D).

MiR-23b 결합자리는 진화적으로 보존됨

세포 성장 또는 생존에 필수적 유전자는 진화적으로 보존되

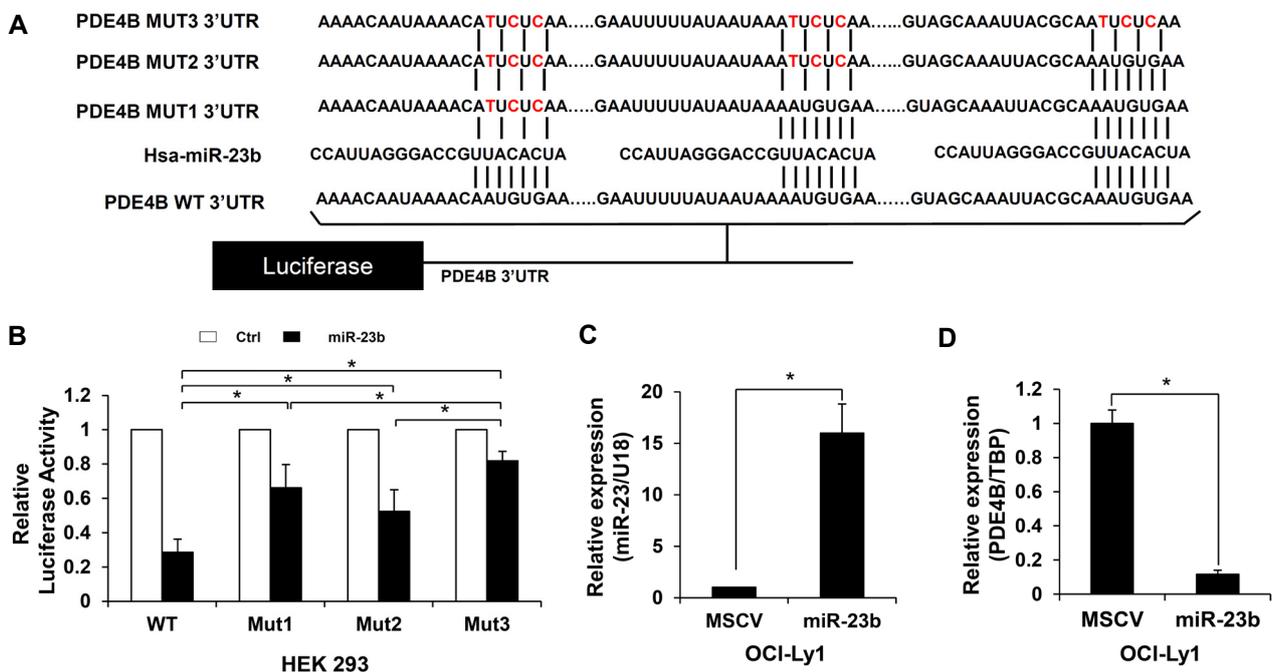


Fig. 1. PDE4B is a direct target of miR-23b. (A) Potential miR-23b binding sites on PDE4B 3' UTR are depicted. MUT1, 2, and 3 represents the number of mutated miR-23b binding sites. (B) Control or miR-23 oligonucleotides were cotransfected with WT or MUT PDE4B 3' UTR constructs and luciferase reporter assay was performed 24 hr later. MiR-23b inhibited luciferase activity of WT, but not the MUT 3' UTR, reporter construct. (C) A retroviral construct was used to stably express miR-23b in OCI-Ly1 DLBCL cell line. Ectopic expression of miR-23b was confirmed by the Stem-loop real-time qRT-PCR. (D) Transcriptional level of PDE4B was analyzed in control or miR-23b-expressing cells. PDE4B mRNA levels in the control cells were set at 1. **p*<0.05 according to Student's *t*-test.



Fig. 2. Evolutionary conservation of miR-23b binding sites on PDE4B 3' UTR. Putative miR-23b binding sites on PDE4B 3' UTR from human to lizard were aligned with miR-23b using TargetScan.

어 있다고 알려져 있다. MiR-23b에 의한 PDE4B 유전자의 발현 조절이 진화적으로 보존되어 있는지 알아보기 위하여, 인간으로부터 도마뱀에 이르기까지 PDE4B 3'-UTR의 miR-23b 결합자리를 분석하였다. Fig. 2에서 나타났듯이, 잉꼬새, 닭, 도마뱀에서는 miR-23b 결합자리 두 개가 발견되었으나, 인간에서 코끼리에 이르기까지 miR-23b 결합자리 세 개가 진화적으로 잘 보존되어 있었다. 이는 miR-23b에 의한 PDE4B 유전자의 발현조절이 세포 기능적으로 중요한 역할을 수행함을 암시한다.

MiR-23b 발현이 세포내 cAMP 농도, 세포 분열 및 생존에 미치는 영향 분석

B 세포내에서 cAMP가 AMP로의 가수분해는 주로 PDE4B에 의한다. 따라서, miR-23b에 의한 PDE4B 유전자의 발현 감소가 cAMP 농도에 미치는 영향을 조사하였다. Adenylyl cyclase 활성약제인 forskolin을 처리했을 때, 대조군에 비해 miR-23b 과발현 세포주에서 cAMP 농도 증가폭이 두드러짐을 확인하였다(Fig. 3). 이는 PDE4B 유전자가 miR-23b에 의해 발현이 감소됨으로써 나타나는 결과임을 나타낸다.

cAMP는 2차 신호전달자로써 세포의 종류에 따라 다양한 생리 현상을 조절하는 것으로 알려져 있다. 정상 또는 종양 B 세포에서는 세포 분열을 저해하고 세포사를 유도한다. MiR-23b 세포주에서 PDE4B 유전자의 발현감소에 의한 cAMP 농도 증가가 세포 분열과 생존에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 대조군과 miR-23b 과발현 OCI-Ly1 세포주에 DMSO 또는 forskolin을 처리한 후 세포수 분석과 MTT assay를 이용하여 세포 생존도를 분석하였다. Forskolin을 첨가하여

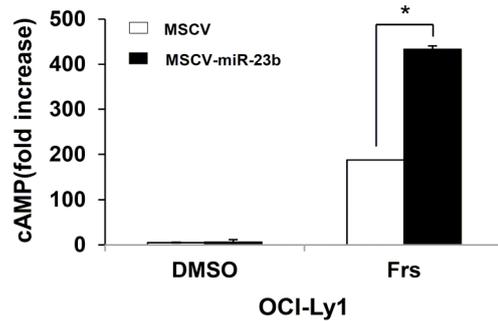


Fig. 3. Intracellular cAMP levels in control or miR-23b-expressing cells were measured after forskolin treatment using ELISA-based assays. Ectopic expression of miR-23b enhanced increase of cAMP concentrations after forskolin treatment (40 μM, 1 hr) in OCI-Ly1 cells. **p*<0.05 according to Student's *t*-test.

세포내 cAMP 농도를 증가하였을 때, 예상대로 miR-23b 과발현 세포주의 세포 분열과 세포 생존도가 대조군에 비해 크게 감소하였다(Fig. 4B, Fig. 4D). 흥미롭게도, DMSO를 처리한 경우에는 대조군과 miR-23b 과발현 세포주에서 세포분열과 세포 생존도의 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 4A & Fig. 4C). 이는 miR-23b 세포주에서 PDE4B 유전자의 발현 감소로 인하여 cAMP의 농도가 급격히 증가함으로써 나타나는 현상임을 암시하는 결과이다.

CHOP (cyclophosphamide, hydroxydaunorubicin, oncovin, prednisone)은 비호지킨 림프종 항암제 요법으로 널리 쓰이고 있다[10]. PDE4B의 과발현은 CHOP 항암제 내성에 관여하는 것으로 알려져 있다. PDE4B외에도 NF-κB, ERK 신호

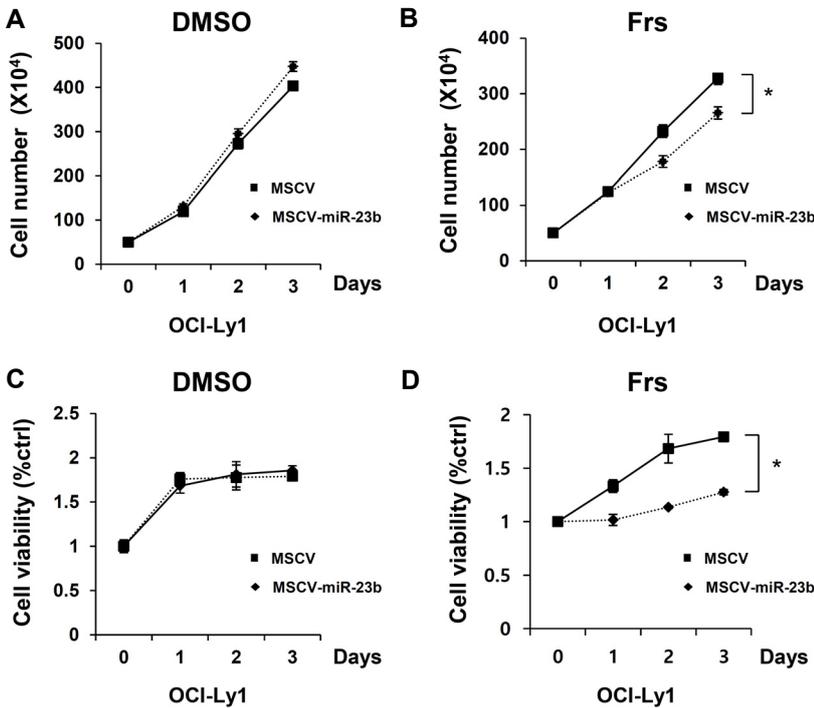


Fig. 4. Effect of miR-23b on cell proliferation and survival. Control or miR-23b-expressing OCI-Ly1 cells were counted every 24 hr in the absence (A) or presence (B) of forskolin (40 μ M). Viability of Control or miR-23-expressing cells was measured every 24 hr by MTT assays in the absence (C) or presence (D) of forskolin (40 μ M). Ectopic expression of miR-23b in OCI-Ly1 cells impaired cell proliferation and induced apoptosis. * p <0.05 according to Student's *t*-test.

경로의 활성화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 PKC (Protein Kinase C) β 도 CHOP 항암제에 반응을 보이지 않는 환자에 특이적으로 과발현 된 것으로 나타났다[15]. PKC β 와 항암제 내성에 관한 실험은 본 연구실에서 진행 중이다. PDE4B 유전자의 과발현은 여러가지 기작을 통하여 나타날 수 있을 것으로 예상되나, 림프종에서 miR-23b의 발현 감소도 중요한 역할을 할 수 있다는 것을 본 연구를 통하여 알 수 있다. 따라서, 림프종 환자 샘플에서 miR-23b의 발현을 분석함으로써 이 문제에 좀 더 접근을 할 수 있으리라 짐작된다. 위 결과를 종합해 볼 때, miR-23b는 PDE4B의 발현 감소를 유도하여 림프종의 증식을 억제할 수 있는 중앙 억제 유전자의 역할을 할 것으로 예상되며, 림프종 환자에서 miR-23b의 발현을 정상적으로 회복시킬 수 있는 방안이 림프종 환자의 치료율을 높일 수 있으리라 기대된다.

감사의 글

본 연구논문은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

References

- Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Davis, R. E., Ma, E., Lossos, I. S., Rosenwald, A., Boldrick, J. C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., Powell, J., Yang, L., Marti, G., Moore, T., Hudson, J., Lu, L., Lewis, D., Tibshirani, R., Sherlock, G., Chan, W., Greiner, T., Weisenburger, D., Armitage, J., Warnke, R.,

- Levy, R., Wilson, W., Grever, M., Byrd, J., Botstein, D., Brown, P. and Staudt, L. M. 2000. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* **403**, 503-511.
- Carthwe, R. W. and Sontheimer, E. J. 2009. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **136**, 642-655.
- Conti, M., Richter, W., Mehats, C., Livera, G., Park, J. Y. and Jin, C. 2003. Cyclic AMP-specific PDE4 phosphodiesterase as critical components of cyclic AMP signaling. *J. Biol. Chem.* **278**, 5493-5496.
- Cooney, J. D. and Aguiar, R. C. 2016. Phosphodiesterase 4 inhibitors have wide-ranging activity in B cell malignancies. *Blood*. Oct 18. pii: blood-2016-09-737676. [Epub ahead of print]
- de Rooij, J., Zwartkruis, F. J., Verheijen, M. H., Cool, R. H., Nijman, S. M., Wittinghofer, A. and Bos, J. L. 1998. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* **396**, 474-477.
- Dremier, S., Kopperud, R., Doskeland, S. O., Dumont, J. E. and Maenhaut, C. 2003. Search for new cyclic AMP-binding proteins. *FEBS Lett.* **546**, 103-107.
- Eulalip, A., Huntzinger, E. and Izaurralde, E. 2008. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* **132**, 9-14.
- Jeong, D., Kim, J., Nam, J., Sun, H., Lee, Y. H., Lee, T. J., Aguiar, R. C. and Kim, S. W. 2015. MicroRNA-124 links p53 to the NF-kappaB pathway in B-cell lymphomas. *Leukemia* **29**, 1868-1874.
- Kelly, K. R., Mejia, A., Suhasini, A., Lin, A. P., Kuhn, J. G., Karnad, A., Weitman, S. and Aguiar, R. C. 2016. Safety and pharmacodynamics of the PDE4 inhibitor roflumilast in ad-

- vanced B cell malignancies. *Clin. Cancer Res.* 2016. Aug 19. Pii: clincanres.12072016. [Epub ahead of print]
10. Kim, S. W., Rai, D. and Aguiar, R. C. 2011. Gene set enrichment analysis unveils the mechanism for the phosphodiesterase 4B control of glucocorticoid response in B-cell lymphoma. *Clin. Cancer Res.* **17**, 6723-6732.
 11. Kim, S. W., Rai, D., McKeller, M. R. and Aguiar, R. C. 2009. Rational combined targeting of phosphodiesterase 4B and SYK in DLBCL. *Blood* **113**, 6153-6160
 12. Kim, S. W., Ramasamy, K., Bouamar, H., Lin, A. P., Jiang, D. and Aguiar, R. C. 2012. MicroRNAs miR-125a and miR-125b constitutively activate the NF-kappaB pathway by targeting the tumor suppressor factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 7865-7870.
 13. Li, C., Kim, S. W., Bolla, A. R., Adhvaryu, S., Kinney, M. C., Robetorye, R. S. and Aguiar, R. C. 2009. Copy number abnormalities, MYC activity, and the genetic fingerprint of normal B cells mechanistically define the microRNA profile of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **113**, 6681-6690.
 14. Rai, D., Kim, S. W., McKeller, M. R., Dahia, P. L. and Aguiar, R. C. 2010. Targeting of SMAD5 links microRNA-155 to the TGF-beta pathway and lymphomagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 3111-3116.
 15. Shipp, M. A., Ross, K. N., Tamayo, P., Weng, A. P., Kutok, J. L., Aguiar, R. C. Gaasenbeek, M., Angelo, M., Reich, M., Pinkus, G. S., Ray, T., Koval, M., Last, K., Norton, A., Lister, T., Mesirov, J., Neuberg, D., Lander, E. S., Aster, J. C. and Golub, T. R. 2002. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat. Med.* **8**, 68-74.
 16. Smith, P. G., Wang, F., Wilkinson, K. N., Savage, L. J., Klein, U., Neuberg, D. S., Bollag, G., Shipp, M. A. and Aguiar, R. C. 2005. The phosphodiesterase PDE4B limits cAMP-associated PI3K/AKT-dependent apoptosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **105**, 308-316.
 17. Soderling, S. H. and Beavo, J. A. 2000. Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterase and new functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 174-179.
 18. Yamagishi, M., Nakano, K., Miyake, A., Yamochi, T., Tsutsumi, A., Matsuda, Y., Sato-Otsubo, A., Muto, S., Utsunomiya, A., Yamaguchi, K., Uchamaru, K., Ogawa, S. and Watanabe, T. 2012. Polycomb-mediated loss of miR-31 activates NIK-dependent NF-kappaB pathway in adult T cell leukemia and other cancers. *Cancer Cell* **21**, 121-135.

초록: 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL)에서 microRNA-23b의 잠재적 종양 억제자로서의 효과

남제현[†] · 김은경[†] · 김진영 · 정다움 · 김동욱 · 곽보미 · 김상우*

(부산대학교 자연과학대학 생명과학과)

미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL)은 비호지킨 림프종에서 가장 흔한 형태이다. DLBCL에서 약물치료에 대한 연구가 많은 진전을 보였지만, 아직 많은 환자의 경우 DLBCL로 인한 사망률이 상당하다. 따라서 DLBCL에 대한 이해와 새로운 표적 치료제의 개발이 필요하다. PDE (인산이에스테르 가수분해효소)4B는 최근 시행된 유전자 발현 프로파일링에서 억제내성을 가지는 DLBCL에서 과발현 되는 유전자로 밝혀졌다. PDE4B의 주된 역할은 이차전달자인 고리형 AMP (cyclic AMP, cAMP)를 5'AMP로의 가수분해를 촉진시켜 cAMP를 비활성화 시키는 것이다. cAMP는 B 세포에서 세포증식 저해와 세포사멸을 유도하고 PDE4B는 B 세포에서 이러한 cAMP의 기능을 소멸시키는 것으로 알려져 있다. 그러나 PDE4B의 과발현이 어떤 기작에 의한 것인지는 연구가 미비하다. 본 논문에서는 비정상적으로 발현된 마이크로 RNA (microRNA, miRNA)가 PDE4B의 과발현에 관련되어 있을 것이라는 가정하에 실험을 진행하였다. PDE4B 3'-UTR에는 세 개의 miR-23b 예상 결합부위가 존재하고, 이는 luciferase reporter assay를 통해서 확인하였다. 흥미롭게도, miR-23b 결합 부위들은 인간에서부터 도마뱀에 이르기까지 진화적으로 보존되어 있었고, 이는 세포 생리학적 측면에서 PDE4B-miR-23b 사이의 상호작용이 중요한 역할을 수행함을 암시하고 있다. miR-23b의 과발현은 PDE4B의 mRNA 발현을 감소시키고 세포내의 cAMP의 농도를 증가시켰다. 뿐만 아니라, miR-23b의 발현은 아데닐산고리화효소(adenyl cyclase)의 활성억제인 forskolin이 처리된 경우에만 DLBCL 세포들의 증식과 생존을 억제하였다. 이는 miR-23b는 PDE4B 발현을 감소시킴으로써 세포증식과 생존을 조절함을 보여주는 것이다. 이를 통해 생각해 볼 때, miR-23b는 PDE4B를 억제함으로써 DLBCL에서 나타나는 항암제 내성을 극복할 수 있고, 따라서 miR-23b는 잠재적 종양 억제자로서 효과적인 치료적 타겟으로 예상된다.