

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21790921

研究課題名(和文) cDNA 発現レトロウイルスライブラリーを用いた T 細胞性リンパ腫原因遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of oncogenes in T cell lymphoma by retrovirus expression screening

研究代表者

藤原 慎一郎 (FUJIWARA SHINICHIRO)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：20438667

研究成果の概要(和文): T 細胞性リンパ腫症例から cDNA 発現レトロウイルスライブラリーを作成した。ライブラリーを用いたスクリーニングにより、蛋白を置換する変異を有する RELB 遺伝子を同定した。変異 RELB は骨髄系細胞の分化抑制を示した。骨髄系腫瘍症例の遺伝子発現解析にて、RELB に変化はなかったが RCAN1 遺伝子の高発現を認めた。RCAN1 は癌抑制遺伝子 HINT1、RINT1 と相互作用を示した。RELB および RCAN1 は骨髄系腫瘍の原因遺伝子となる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文): We constructed a retroviral cDNA expression library from lymph node of patient with T cell lymphoma. Screening of this library resulted in the identification of mutated RELB causing an amino acid substitution to impair myeloid differentiation. By gene expression analysis, RCAN1 was highly expressed in patients with myeloid leukemia. Yeast two-hybrid assay showed that RCAN1 interacted with HINT1 and RINT1, tumor suppressors. It is possible that RELB and RCAN1 are biologically significant in leukemogenesis.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：血液腫瘍

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：T 細胞性リンパ腫，レトロウイルスライブラリー，RELB，RCAN1

1. 研究開始当初の背景

T 細胞性リンパ腫にはいくつかの組織型が存在するが、その中で病因の解明が進められているのは、成人 T 細胞性リンパ腫など限られた組織型にすぎない。T 細胞性リンパ腫の多くの組織型に関しては、病因も含め十分な

解析は行われていないのが現状である。臨床像、病理像、免疫染色等にて検討がなされているが、疾患を特徴づける報告は少なく診断基準は不明確である。また、標準的な治療法は確立されておらず、一般に予後不良な疾患である。T 細胞性リンパ腫の発症メカニズム

は、他の造血器悪性腫瘍と同様に、染色体転座あるいはゲノムコピー数の異常、点突然変異等による特異的遺伝子変異が関与していると考えられるが、具体的な原因遺伝子の同定は未だなされてはいない。

2. 研究の目的

T細胞性リンパ腫の診断法や新規分類法、新規治療法の開発には、発症に関与する原因遺伝子を解明することが最も重要である。本研究では、申請者らが開発した cDNA 発現レトロウイルスライブラリーを用いた発現クローニング法により、T細胞性リンパ腫の原因遺伝子を同定することを目指した。最終的には、原因遺伝子を同定することにより遺伝子異常を基盤とした新しい疾患単位の提唱、遺伝子異常を標的とする分子標的治療の開発および遺伝子異常を用いた早期診断の実現を目的とした。

3. 研究の方法

T細胞性リンパ腫症例において診断目的に採取したリンパ節から mRNA の抽出後、cDNA の合成を行い、レトロウイルスプラスミドに挿入し cDNA ライブラリーを構築する。レトロウイルスを用いてライブラリーを標的細胞に感染させ、形質転換が認められた細胞から挿入 cDNA を回収し塩基配列を解析する。得られた cDNA を標的細胞に再び感染させ形質転換能の検証を行う。

候補遺伝子については、骨髄キメラマウスの作成、siRNA による遺伝子発現抑制等にて機能解析を行う。また、T細胞性リンパ腫 73 症例のゲノム構造異常および臨床情報との関連から候補遺伝子発現メカニズムおよび長期予後への影響についても解析する。

4. 研究成果

(1) T細胞性リンパ腫と診断された症例のリンパ節から mRNA を抽出し、SMART 法にて増幅してレトロウイルスライブラリーを作成した。

まず、標的細胞としてマウス繊維芽細胞株 3T3 にライブラリーを遺伝子導入し、形質転換細胞から癌関連遺伝子をスクリーニングした。既に申請者が癌化能を有することを報告している P2RY8 遺伝子が同定された。T細胞性リンパ腫では P2RY8 が高発現していないことや他の疾患のレトロウイルスライブラリーを使用しても同定されていることから疾患特異的よりも 3T3 に依存して同定されたものと考えられた。SPSB3、AP2A、MICAL1、BCAR1、CAPS、RARA、CERCAM、TTLL3、PATL1 といった遺伝子が候補に挙がったが 3T3 への

再遺伝子導入にて形質転換の再現性がみられなかった。偽陽性を減らすために、感染させるライブラリーの量を調節したが、新規の癌遺伝子の同定はできなかった。

次に、標的細胞として T細胞株の CTLL-1、Jurkat を使用したがレトロウイルスの感染効率が充分ではなかった。そのため、感染効率の良好であったマウス骨髄細胞株 32D を使用してスクリーニングを行った。

32D は IL-3 依存性の細胞株であるため、ライブラリーを感染後、IL-3 非存在下にて実験を行ったが、32D の増殖を認めなかった。32D は顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 存在下では、成熟好中球に終末分化し死滅するため、G-CSF 存在下にて終末分化に至らない 32D から分化抑制関連遺伝子をスクリーニングすることとした。候補遺伝子として RELB 遺伝子が同定された。RELB の再導入にて、G-CSF 存在下では 32D は分化を認めず再現性が認められた。

(2) 同定された RELB の全長シーケンスの結果、64 番目のアスパラギンをセリンに置換する点突然変異 (N64S) を認めた。N64S 変異型および野生型 RELB をレトロウイルスベクターにクローニングし 32D に遺伝子導入を行った。ベクターのみ、野生型 RELB を遺伝子導入した 32D は、G-CSF 存在下において培養をすると、成熟顆粒球へと分化し死滅した。一方、N64S 変異を有する RELB を遺伝子導入した 32D は、成熟好中球への分化を認めず増殖を認めた (図 1)。

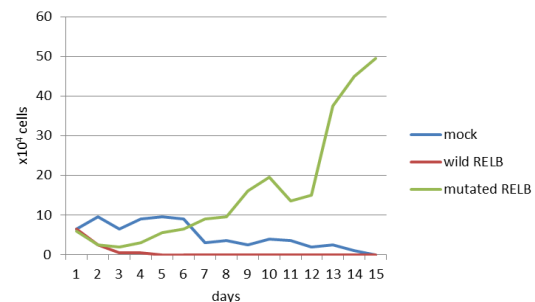


図 1 変異 RELB による 32D の分化抑制効果

IL-3 非存在下では、ベクター、野生型および N64S 変異 RELB の導入 32D はいずれも増殖を認めなかった。

RELB の N64S 変異は、細胞増殖のシグナルを刺激するのではなく、骨髄系細胞の分化を抑制することで急性骨髄性白血病 (AML)、骨髄異型性症候群 (MDS) の発症に関与している可能性が考えられた。

シーケンス解析の結果、ライブラリーを作成した T細胞性リンパ腫症例の RELB には N64S 変異が認められなかった。同変異は、ラ

イブラリー作成時の PCR により生じた人工的な変異と考えられた。今後、AML および MDS 症例にて、RELB の N64S 変異の有無を調べるためのシーケンス解析を予定している。また、N64S 変異 RELB がいかなる機序にて造血細胞の分化抑制に働くかも解析が必要と考えられる。

(3) RELB の発現について調べるため、骨髄性白血病症例の網羅的な遺伝子発現解析を行ったが、RELB の有意な発現増加はみられなかった。

同解析では、いくつかの遺伝子の高発現を認めしたが、その中でも、高発現している症例が多かった RCAN1 遺伝子に着目して解析を行った。

健常人から採取した骨髄有核細胞を分化に応じて区分し、RCAN1 の発現を調べたが、いずれの細胞にも発現が認められなかった。一方、骨髄性白血病細胞株 (THP-1、U937、HL60、KY821、KCL22、K562、KU812) および AML 症例の骨髄中の白血病細胞には RCAN1 の発現を認めた。数症例において化学療法後の骨髄中の RCAN1 発現を調べたが、化学療法により白血病細胞が減少し、完全寛解 (CR) になった症例では、骨髄中の RCAN1 の発現低下を認めた (図 2)。今後、症例を増やした検討が必要であり、予後への影響等も解析が必要である。

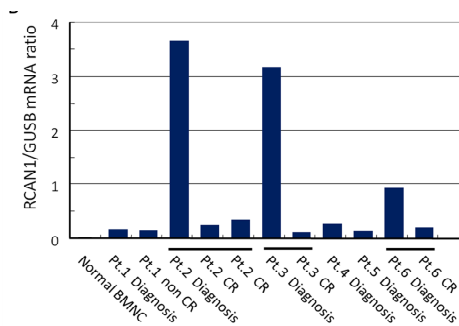


図 2 治療による RCAN1 発現の変化

RCAN1 の発現のメカニズムを解析するために、RCAN1 のプロモーター領域をクローニングし、ルシフェラーゼアッセイを行った。RCAN1 が発現している細胞株 KCL22 を使用した。解析の結果、RCAN1 プロモーター領域の 866bp 上流の 10bp に転写活性部位を認めた。同部位には既存の転写因子の結合部位ではなく新規の領域であった。結合転写因子の予測プログラムにて推測すると、AML1 等の白血病に関連する因子も候補因子に挙がった。白血病との RCAN1 高発現の関連が示唆されたが、現在、解析を進めている。

RCAN1 と白血病の関連を調べるため、Yeast

two-hybrid screening 法にて RCAN1 蛋白の相互作用因子を解析した。結果を表 1 に示す。

Gene	Description
HEMK1	HemK methyltransferase
HINT1	histidine triad nucleotide-binding protein
HINT2	histidine triad nucleotide-binding protein
PCBP1	poly(rC)-binding protein
PDLIM7	LIM domain-containing protein
PHGDH	phosphoglycerate dehydrogenase
RINT1	Rad50-interacting protein
ARA54	coactivator for androgen-dependent transcription
ZNF426	zinc finger protein

表 1 RCAN1 相互作用蛋白の解析

他の悪性腫瘍にて癌抑制遺伝子として報告されている HINT1、RINT1 蛋白との相互作用が示された。RCAN1 は癌抑制遺伝子の機能を抑制することで癌化に関連している可能性が考えられた。

RCAN1 は骨髄系腫瘍由来細胞株のみならず、B および T 細胞性急性リンパ性白血病由来細胞株 (Raji、Jurkat)、多発性骨髄腫由来細胞株 (RPMI8226、U266) にも発現が認められた。造血器腫瘍全般に発現している可能性があり、RCAN1 の解析は骨髄系腫瘍以外の疾患においても応用が可能であると考えられる。

(4) 本研究で認められた RELB および RCAN1 は、骨髄系腫瘍の原因遺伝子となる可能性が考えられる。さらなる病態解析が必要であるが、本研究はこれらの遺伝子異常を標的とする分子標的治療の開発に寄与すると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 2 件)

Shin-ichiro Fujiwara, Tadashi Nagai, Satoru Kikuchi, Mitsuyo Uesawa, Chihiro Sakurai, Ken Ohmine, Jiro Kikuchi, Yusuke Furukawa, and Keiya Ozawa. Ectopic Expression and Role of RCAN1 in Myeloid Leukemia Cells. American Society of Hematology Annual Meeting Dec 5, 2009 New Orleans.

Shin-ichiro Fujiwara, Tadashi Nagai, Satoru Kikuchi, Mitsuyo Uesawa, Chihiro Sakurai, Ken Ohmine, Jiro Kikuchi, Yusuke

Furukawa, and Keiya Ozawa. Crucial role of RCAN1 in leukemia progression. 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association Sep 22,2010 Osaka

6 . 研究組織

(1)研究代表者

藤原 慎一郎 (FUJIWARA SHINICHIRO)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：20438667

(2)研究分担者

永井 正 (Nagai Tadashi)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40237483

大嶺 謙 (Ohmine Ken)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：90316521

菊池 悟 (Kikuchi Satoru)

自治医科大学・医学部・助教

上澤 光世 (Uesawa Mitsuyo)

自治医科大学・医学部・助教

山本 千裕 (Yamamoto Chihiro)

自治医科大学・医学部・大学院生