

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09492

研究課題名(和文)ハイスループット系によるリンパ腫・骨髄腫の成立機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of mechanisms underlying the development of lymphoma and myeloma using a high-throughput mouse model system

研究代表者

都築 忍 (Tsuzuki, Shinobu)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：00342965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：悪性リンパ腫・多発性骨髄腫の発生に必要な遺伝子異常を、レトロウイルスによる遺伝子導入法とイン・ビトロでの分化誘導法、マウスへの移植を組み合わせたハイスループットな評価系を用いて探索したところ、び慢性大細胞型B細胞性リンパ腫で見出された遺伝子異常のうち、活性型CARD11とBCL6、あるいはMycとBcl2の2者で腫瘍発生に十分であることが明らかとなった。予後不良なリンパ腫の治療法開発に資するモデルになる可能性がある。

一方で、多発性骨髄腫モデルの作成は期間内に達成できなかったが、Cre-LoxPシステムをレトロウイルスベクターに応用する手法を開発したので、達成に向けて努力したい。

研究成果の概要(英文)：We have investigated causative roles of given genes or mutated genes in the development of malignant lymphoma and multiple myeloma using our high-throughput mouse model system, in which germinal center B cells (normal counterparts of many lymphomas) were induced in vitro, infected with retroviruses for gene of interest, and transplanted into mice. Results showed that a combination of CARD11 mutant and BCL6 or a combination of Myc and Bcl2 was sufficient for the development of lymphoma. Our models may provide a platform for the development of therapy of these lymphomas known as being associated with poor clinical outcome. Although we were unable to develop a mouse myeloma model within the assigned period of time, we have developed a Cre-LoxP-mediated gene expression system employing retrovirus vector, and thus will make an effort to accomplish the aims.

研究分野：造血器腫瘍

キーワード：悪性リンパ腫 マウスモデル レトロウイルス

1. 研究開始当初の背景

我が国では、年間約2万5千人が悪性リンパ腫に罹患し、約1万1千人が死亡する。罹患率は年々増加しており、その病態解明が急務である。

悪性リンパ腫のうち、胚中心B細胞に由来するものが最も多く約4割を占める。近年の遺伝子解析技術の進歩によりヒト臨床検体で多数の遺伝子異常が見出され、その病態形成における意義が遺伝子改変（ノックイン/トランスジェニック）マウスの作成を通じて解析されてきた。しかし、これらのマウスには胚中心細胞がほとんど存在しないので、このままでは胚中心B細胞に由来するリンパ腫が発生しない。そこで、異物（羊赤血球など）を投与してマウスに胚中心反応を惹起し、生成する胚中心B細胞に腫瘍が発生するかどうかを検証されてきた。しかし、マウスに胚中心反応を惹起すれば体細胞高頻度突然変異(somatic hyper-mutation; SHM)により多数の遺伝子変異が起きてしまうので、ノックイン/トランスジーン遺伝子の直接的な効果に加えて、SHMによって生じた遺伝子異常の総和としてリンパ腫が発生することになる。実際、こうしてマウスに発生したリンパ腫を次世代シーケンズすると100個以上の遺伝子変異が見つかったと報告されており、その意義づけが難しい。Crispr/Cas9でマウスを作成したとしてもこの事情は変わらない。

代わって、研究代表者はマウスの胚中心B細胞を *in vitro* で誘導し、レトロウイルスにより任意の（変異）遺伝子や shRNA を導入してマウスに移植することにより、迅速に悪性リンパ腫を作成するシステムを新規に確立した。本法により誘導する胚中心B細胞はAID活性が低いためにSHMが生じない。また、従来は個々の遺伝子異常を有するマウスを作成し、交配して複数の遺伝子異常を有するマウスを樹立することで、複数の遺伝子異常の協調作用が研究されてきたが、遺伝子異常が多数になるとその組み合わせの数は膨大になり、極めて困難となる。研究代表者の確立した方法であれば、多数の遺伝子異常の任意の組み合わせの協調作用を迅速に研究可能である。

2. 研究の目的

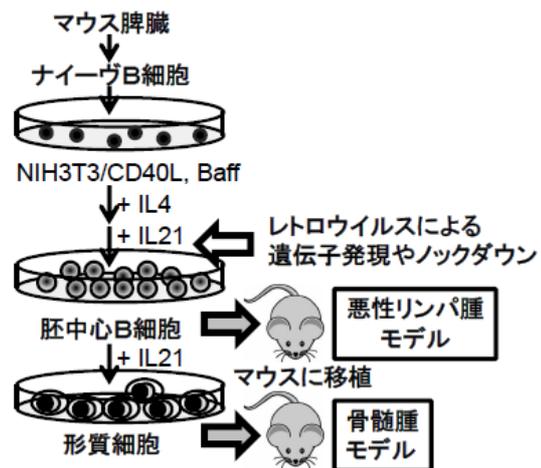
研究代表者が確立した悪性リンパ腫モデル作成法を応用することにより、臨床検体解析で見出された複数の遺伝子異常につき、どの組み合わせで腫瘍が発生するかを調べることで、腫瘍の「成立」と「維持」に必要な遺

伝子異常の組み合わせを明らかにする。さらに本法を改変することにより、ハイ・スループットに多発性骨髄腫モデルを作成するシステムを確立する。

3. 研究の方法

マウス脾臓から採取したB細胞を、CD40 リガンドとサイトカイン BAFF を発現する NIH3T3 細胞上で培養し、IL4, IL21 を順次に加えて誘導した胚中心B細胞に、レトロウイルスで特定の遺伝子・変異遺伝子を感染発現させ、マウスに移植する（図1参照）（胚中心B細胞誘導の原法は東京理科大学・免疫学 北村博士らの論文による）。胚中心B細胞を誘導した後、そのまま培養を続けると形質細胞にまで分化するので、同様の手法で多発性骨髄腫モデルを作成できる可能性があり、その手法を確立する。

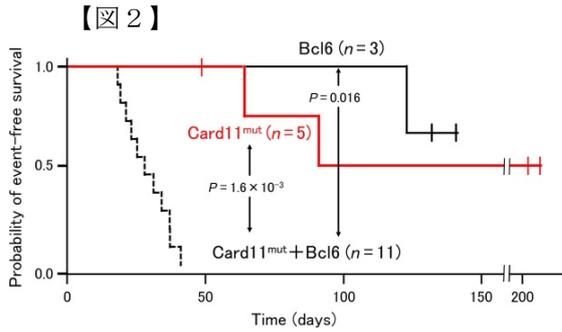
【図1】



4. 研究成果

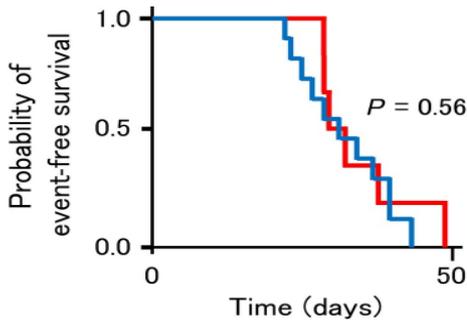
胚中心B細胞に由来する悪性リンパ腫の中で、臨床的に悪性度が高いリンパ腫の一部にCARD11 遺伝子の活性型変異が存在すること知られている。そこで上記方法に従って悪性リンパ腫モデルを作成したが、腫瘍は発生しなかった。このことはCARD11 単独では腫瘍化に不十分であることを意味する。そこで、ヒト悪性リンパ腫に於いてCARD11 変異と共存する遺伝子を文献的に検索し、BCL6 がCARD11 と協調的に作用する可能性を考えた。BCL6 は染色体転座・プロモーター変異・MEF2B 変異などにより高発現する遺伝子である。実際、我々の方法でマウスモデルを作成すると、CARD11 あるいはBCL6 単独に発現させた場合に比べて、両者を同時に発現させると早期に100%の確率で悪性リンパ腫が発生すること

が判明した (図 2)。



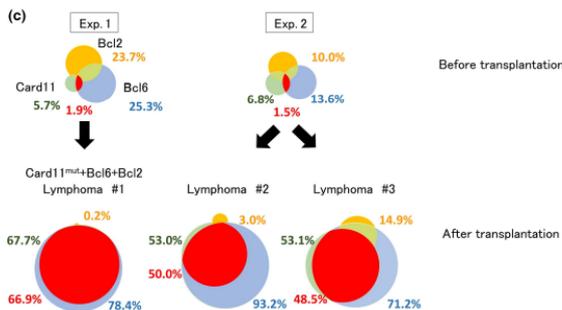
CARD11 と BCL6 によるリンパ腫の発生速度と発生確率は、BCL2 発現を追加しても変化がなかった (図 3) ことから、CARD11 と BCL6 によって BCL2 などの抗アポトーシス遺伝子の発現が誘導されている可能性が考えられ、実際に CARD11 と BCL6 の協調作用により、BCL2 の蛋白レベルが上昇することを観察した。

【図 3】



本実験系では、CARD11・BCL6・BCL2 は各々異なる代替マーカー (GFP・human CD4 細胞外ドメイン・human CD8 細胞外ドメイン) を同時発現させているため、1 個 1 個の細胞に、3 種の遺伝子のどれがどの組み合わせで発現しているかをフローサイトメトリーで容易に判別することが可能である。その結果を図 4 に示す。

【図 4】



移植前の細胞は、CARD11・BCL6・BCL2 の 3 者を各々 1 種類だけ、あるいはいずれか 2 種類、あるいは 3 種類すべてを発現する細胞が種々の割合で存在していたが、マウス体内で発生したリンパ腫の大半は CARD11・BCL6 の 2 種発現細胞に由来すること、一部はさらに BCL2 が発現していることが判明した。このことから、CARD11 と BCL6 が協調的に作用することが悪性リンパ腫の発生に重要かつ十分であることが確認された。

このように、本系を用いることにより、ヒトの悪性リンパ腫臨床検体で見いだされる遺伝子異常のうち、どの遺伝子のどの組み合わせがリンパ腫の発生に必須であるかを迅速に解析することが可能となる点で有用性が高いと考える。

なお、図 1 に示した方法では、培養時間を延長することで形質細胞を誘導することも可能であるため、多発性骨髄腫モデルの作成も可能であると考えて実験を行ってきたが、遺伝子導入後は形質細胞への分化効率が大幅に低下することが判明したため、実現できなかった。代替法としてレトロウイルスベクターに LoxP 配列を搭載し使用したところ、B 細胞特異的に、主にその分化段階の後期に遺伝子を発現させることが可能となったので、この実験システムを用いれば骨髄腫モデルの作成も可能になると考えており、今後も研究を継続する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 5 件)

①レトロウイルスによる遺伝子導入を用いた成熟B細胞リンパ腫マウスモデル

在田 幸太郎, 都築 忍, 大島 孝一, 杉山 敏郎, 瀬戸 加大

Cytometry Research 25巻2号

Page15-19 (2015. 10) 総説 (査読なし)

②リンパ腫研究の動向 悪性リンパ腫モデル細胞の作成とその薬剤スクリーニングへの応用

都築 忍 日本臨床(0047-1852)73巻増刊8 「リンパ腫学」 Page196-200 (2015. 10)

解説/特集 (査読なし)

③悪性リンパ腫の遺伝子異常とその機能的意義

都築 忍

日本染色体遺伝子検査学会雑誌 33巻1号 Page20-25 (2015. 05) 解説 (査読なし)

④Yoshida N, Tsuzuki S, Karube K, Takahara T, Suguro M, Miyoshi H, Nishikori M, Shimoyama M, Tsukasaki K, Ohshima K, Seto M.
STX11 functions as a novel tumor suppressor gene in peripheral T-cell lymphomas. Cancer Sci. 2015, 106(10): 1455-1462 (査読あり)

⑤Takahara T, Matsuo K, Seto M, Nakamura S, Tsuzuki S.
Synergistic activity of Card11 mutant and Bcl6 in the development of diffuse large B-cell lymphoma in a mouse model. Cancer Sci. 2016 107(11):1572-1580 (査読あり)

[学会発表] (計 3件)

① マウスモデルを用いたDiffuse large B cell lymphoma (DLBCL) 関連遺伝子の機能解析
高原 大志, 都築 忍
74回 日本癌学会総会

② The rs3779620 in the PBK gene is closely associated with myeloma cell growth
Hanamura Ichiro Ota Akinobu, Karnan Sivasundaram, Md Wahiduzzaman, Mizuno Shohei, Uchino Kaori, Kanasugi Jo, Horio Tomohiro, Murakami Satsuki, Suzuki Susumu, Tsuzuki Shinobu, Konishi Hiroyuki, Ueda Ryuzo, Hosokawa Yoshitaka, Takami Akiyoshi
第79回日本血液学会学術集会

③ High expression of MEF2D-fusion protein by escaping from the regulation by microRNA.
Hirano Daiki, Hayakawa Fumihiko, Yasuda Takahiko, Yamamoto Hideyuki, Kojima Yuki, Morishita Takanobu, Imoto Naoto, Tsuzuki Shinobu, Mano Hiroyuki, Naoe Tomoki, Kiyoi Hitoshi
第79回日本血液学会学術集会

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.aichi-med-u.ac.jp/su06/su0607/su060702/03.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

都築 忍 (TSUZUKI, Shinobu)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号: 00342965