

平成22年 5月14日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17013016

研究課題名（和文） Maf がん遺伝子による細胞のがん化機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of tumorigenesis induced by Maf oncogenes

研究代表者

高橋 智 (TAKAHASHI SATORU)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

研究者番号：50271896

研究成果の概要（和文）：発がんにおける Maf 遺伝子群の機能を解明するために、モデルマウスを作製した。その結果、c-Maf のリンパ球への単純過剰発現により、リンパ腫が発症することを明らかにした。腫瘍細胞における c-Maf の標的遺伝子を探索したところ、ARK5、Cyclin D2、Integrin β 7 等であることを明らかにした。また、ヒトの T 細胞性リンパ腫における発現を解析したところ、血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫（Angioimmunoblastic T cell lymphoma：AILT）症例で c-Maf の過剰発現が認められることを明らかにした。以上の結果から、c-Maf の単純過剰発現により、リンパ球のがん化することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：To elucidate in vivo function of Maf oncogenes for tumorigenesis, I tried to generate transgenic mice which overexpressed c-Maf in lymphoid cells. By analyzing these mice, I identified the development of lymphomas. ARK5, Cyclin D2 and Integrin β 7 were confirmed as target genes of c-Maf in the tumor cells. In addition, I analyzed patients with T cell lymphomas and found that c-Maf was overexpressed in Angioimmunoblastic T cell lymphoma (AILT) cells in collaboration. These results indicate that c-Maf is the responsible gene for tumorigenesis of lymphocytes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	9,400,000	0	9,400,000
2006年度	9,400,000	0	9,400,000
2007年度	9,400,000	0	9,400,000
2008年度	9,400,000	0	9,400,000
2009年度	9,400,000	0	9,400,000
総計	47,000,000	0	47,000,000

研究分野：分子生物学、発生工学

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：転写因子、発がん、c-Maf、T 細胞性リンパ腫、多発性骨髄腫

1. 研究開始当初の背景

Maf がん遺伝子は、ニワトリに筋腱膜線維腫を発症させる発がんウイルス AS42 の形質転換遺伝子として、日本において同定されたものであり、日本の研究が常に世界をリードしてきた歴史を有している。一方、報告者ら

の研究グループでは、c-Maf 欠損マウスの作製と解析を通じて、c-Maf が目の水晶体線維細胞の形成および維持に必須の転写因子であることを個体レベルで明らかにするとともに、ゼブラフィッシュにおける新規の大 Maf 群転写因子 SMaf1、SMaf2（ほ乳類の MafA

ホモログ)を同定した。さらに、一つの生物種に MafA、MafB、c-Maf、Nr1 の 4 種類の大 Maf 群転写因子が存在し、様々な臓器に発現していることを明らかにした。このように、大 Maf 群転写因子の研究において、申請者は先端的な研究を行ってきた経緯があり、Maf 群転写因子の発がんにおける機能解析を実施した。

2. 研究の目的

Maf がん遺伝子は、日本で発見されたがん遺伝子で、細胞のがん化に重要な機能を果たしていると考えられていた。実際に、ヒトの多発性骨髄腫症例の約30%で、c-Maf 及び MafB の免疫グロブリン領域への微小転座があり、それらの転座が認められなくても、症例の約半数で大 Maf 群転写因子の過剰発現が観察されることが明らかにされていた。しかし、その過剰発現により直接がん化が誘導されていることは証明されていなかった。そこで本研究では、Maf がん遺伝子の遺伝子改変マウスの作製および解析を通して、細胞のがん化における Maf がん遺伝子の機能を動物モデルを用いて詳細に明らかにし、多発性骨髄腫を含むヒトがんの原因の究明および治療法への応用を目指した。

3. 研究の方法

(1) T 細胞特異的に c-Maf を過剰発現するトランスジェニックマウスの解析

申請者は以前に、T 細胞特異的に c-Maf を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製した。これらマウスを経時的に解析したところ、加齢マウスの 40% にリンパ腫の発症を観察した。発症したマウスより細胞株を樹立し、それらの細胞を解析することにより、どのような遺伝子変化が引き起こされているかを解析した。

(2) B 細胞特異的に c-Maf を過剰発現するトランスジェニックマウスの解析

前述したように、多発性骨髄腫症例の約50%で c-Maf の過剰発現が確認されていた。この過剰発現が多発性骨髄腫の直接の原因であることを検証するために、B 細胞特異的に c-Maf を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製した。このマウスにおいて、加齢変化に伴って多発性骨髄腫が発症するかどうかを解析した。

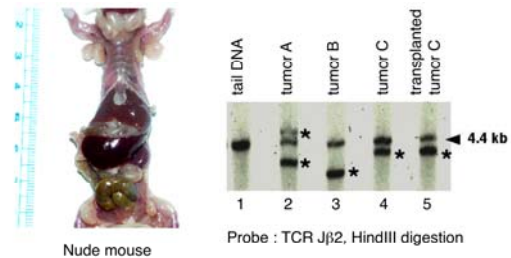
4. 研究成果

(1) T 細胞特異的に c-Maf を過剰発現するトランスジェニックマウスの解析

始めに、c-Maf トランスジェニックマウスの T 細胞分画を解析したところ、胸腺、脾臓において、double negative (CD4⁻、CD8⁻) T

細胞の割合の有意な増加がみられ、T 細胞の分化異常が観察された。また本マウスを長期間飼育すると、脾臓を始めとする全身各臓器へのリンパ球浸潤を認め、リンパ腫の発症が確認された。この浸潤リンパ球の多くは、異型を示す大型の細胞であり、免疫染色や FACS などの解析から幼弱な T 細胞性であることが示された。ヌードマウスへの移植実験と TCR 再構成の解析から、これらの細胞は単ク

T 細胞特異的に c-Maf を過剰発現させたマウスに発症した腫瘍細胞の自己増殖能およびクローナリティの解析



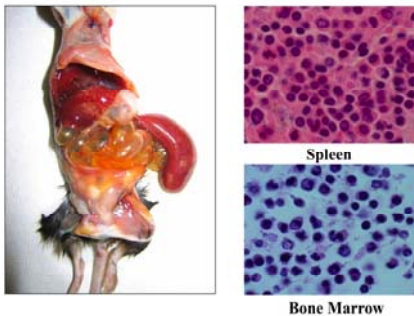
ローン性の腫瘍であることが確認された。c-Maf は転写因子であることから、腫瘍細胞における標的遺伝子を同定するために、細胞および組織を用いて RT-PCR 解析を行ったところ、ARK5 や cyclin D2、integrin β7 の発現亢進を確認した。ARK5 は、腫瘍形成と転移を加速することが報告されており、本リンパ腫においても重要な機能を果たしていると考えられた。さらに、ヒト T 細胞リンパ腫における c-Maf の関与を解析するために、共同研究によりヒト T 細胞リンパ腫の解析を行ったところ、血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫 (Angioimmunoblastic T cell lymphoma : AILT) において、c-Maf の過剰発現が認められた。AILT では 31 症例中 23 症例で c-Maf の過剰発現が確認できることを明らかにした。以上のことから、c-Maf は、マウスおよびヒトの T 細胞性リンパ腫の発症に関与していることが示唆された。

(2) B 細胞特異的に c-Maf を過剰発現するトランスジェニックマウスの解析

ヒト多発性骨髄腫の約半数で認められる c-Maf の過剰発現を再現する為に、B 細胞特異的に c-Maf を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製した。B 細胞に c-Maf を過剰発現することにより、頻度は低いものの形質細胞腫が発症した。それらのマウスでは、高免疫グロブリン血症が観察され、腎臓に免疫グロブリンが沈着する骨髄腫腎の発症が認められた。骨髄中にも腫瘍細胞の浸潤が認められたが、明らかな骨破壊像は見られなかった。c-Maf の過剰発現により上昇している標的遺伝子を解析したところ、ARK5、CyclinD2、Integrin-β7、

Osteopontin、Blimp1、Xbp-1 の発現の上昇が認められた。Osteopontin は骨破壊を抑制する作用があるため、骨破壊が少ないと考えら

B細胞特異的c-Maf過剰発現マウスに認められた形質細胞腫の組織学的解析



れた。

以上の結果から、Maf 群転写因子の単純過剰発現で、ヒトおよびマウスにリンパ腫が発症することが示唆された。またこれらのマウスはヒトリンパ腫の良いモデルマウスとなると考えられ、今後の治療法の開発に有用であると思われる。

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)

[雑誌論文] (計 24 件)

(1) T 細胞特異的に c-Maf を過剰発現するトランスジェニックマウスの解析

1. Sultana DA, Tomita S, Hamada M, Iwanaga Y, Kitahama Y, Khang NV, Hirai S, Ohigashi I, Nitta S, Amagai T, Takahashi S, Takahama Y. Gene expression profile of the third pharyngeal pouch reveals role of mesenchymal MafB in embryonic thymus development. *Blood*. 113, 2976-2987, 2009. (査読有)
2. Nakamura M, Hamada M, Hasegawa K, Kusakabe M, Suzuki H, Greaves DR, Moriguchi T, Kudo T, Takahashi S. c-Maf is essential for the F4/80 expression in macrophages *in vivo*. *Gene*. 445, 66-72, 2009. (査読有)
3. Shi L, Itoh F, Itoh S, Takahashi S, Yamamoto M, Kato M. Ephrin-A1 promotes the malignant progression of intestinal tumors in *Apc^{min/+}* mice. *Oncogene* 27, 3265-3272, 2008. (査読有)
4. Idate-Murakami Y, Yatabe Y, Sakaguchi T, Sasaki E, Yamashita Y, Morito N, Yoh Y, Fujioka Y, Matsuno F, Hata H, Mitsuya H, Imagawa S, Suzuki A, Esumi H, Sakai M, Takahashi S, Mori N. c-Maf expression in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Am J Surgical Pathol*. 31, 1695-1702, 2007. (査

読有)

5. Morito N, Yoh K, Fujioka Y, Nakano T, Shimohata H, Yamada A, Maeda A, Matsuno F, Hata H, Suzuki A, Imagawa S, Mitsuya H, Esumi H, Koyama A, Yamamoto M, Mori N, Takahashi S. Overexpression of c-Maf contributes to T-cell lymphoma in both mice and human. *Cancer Res*. 66, 812-819, 2006. (査読有)
6. Moriguchi T, Hamada M, Morito N, Terunuma T, Hasegawa K, Zhang C, Yokomizo T, Esaki R, Kuroda E, Yoh K, Kudo T, Nagata M, Greaves DR, Engel JD, Yamamoto M, Takahashi S. MafB is essential for renal development and F4/80 expression in macrophage. *Mol Cell Biol*. 26, 5715-5727, 2006. (査読有)
7. Yanagida M, Osato M, Yamashita N, Liqun H, Jacob B, Wu F, Cao X, Nakamura T, Yokomizo T, Takahashi S, Yamamoto M, Shigesada K, Ito Y. Increased dose of Runx1/AML1 acts as a positive modulator of myeloid leukemogenesis in BXH2 mice. *Oncogene*. 24, 4477-4485, 2005. (査読有) 他 5 編

(2) B 細胞特異的に c-Maf を過剰発現するトランスジェニックマウスの解析

8. Tanaka T, Ichimura K, Sato Y, Takata K, Morito T, Tamura M, Kondo E, Ohara N, Yanai H, Sasaki M, Takahashi S, Yoshino T. Frequent downregulation or loss of CD79a expression in plasma cell myelomas: potential clue for diagnosis. *Pathol Int*. 59, 804-808, 2009. (査読有)
9. Matsumoto K, Obara N, Ema M, Horie M, Naka A, Takahashi S, Imagawa S. Antitumor effects of 2-oxoglutarate through inhibition of angiogenesis in a murine tumor model. *Cancer Sci*. 100, 1639-1647, 2009. (査読有)
10. Yokomizo T, Hasegawa K, Ishitobi H, Ema M, Osato M, Ito Y, Yamamoto M, Takahashi S. Runx1 is involved in primitive erythropoiesis in the mouse. *Blood* 111, 4075-4080, 2008. (査読有)
11. Yokomizo T, Takahashi S, Mochizuki N, Kuroha T, Ema M, Wakamatsu A, Shimizu R, Ohneda O, Osato M, Okada H, Komori T, Ogawa M, Nishikawa S, Ito Y, Yamamoto M. Characterization of GATA-1(+) hemangioblastic cells in the mouse embryo. *EMBO J*. 26, 184-196, 2007. (査読有)
12. Matsumura H, Kudo K, Harada A, Esaki R, Suzuki H, Kato M, Takahashi S. Suppression of MafA dependent transcription by transforming growth factor- β signaling.

- Biochem Biophys Res Commun.* 364, 151-156, 2007. (査読有)
13. Ema M, Yokomizo T, Wakamatsu A, Terunuma T, Yamamoto M, **Takahashi S**. Primitive erythropoiesis from mesodermal precursors expressing VE-cadherin, PECAM-1, Tie2, endoglin and CD34 in the mouse embryo. *Blood.* 108, 4018-4024, 2006. (査読有)
 14. Suzuki A, Iida S, Kato-Uranishi M, Tajima E, Zhan F, Hanamura I, Huang Y, Ogura T, **Takahashi S**, Ueda R, Esumi H. ARK5 is transcriptionally regulated by large Maf family to mediate IGF-1-induced cell invasion in multiple myeloma. *Oncogene.* 24, 6936-6944, 2005. (査読有)
 15. Zhang C, Moriguchi T, Kajihara M, Esaki R, Harada A, Shimohata H, Oishi H, Hamada M, Morito N, Hasegawa H, Kudo T, Engel JD, Yamamoto M, **Takahashi S**. MafA is a key regulator of glucose-stimulated insulin secretion. *Mol Cell Biol.* 25, 4969-4976, 2005. (査読有)
- 他4編

[学会発表] (計1件)

1. Takahashi S. Functional analysis of large Maf transcription factors for hematopoiesis and oncogenesis. 第66回 日本癌学会総会シンポジウム 2007. 10. 4 パシフィコ横浜

[その他]

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/anatomy/embryology/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 智 (TAKAHASHI SATORU)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

研究者番号：50271896