

平成21年4月29日現在

研究種目：基礎研究（C）

研究期間：2007-2008

課題番号：19591143

研究課題名（和文） マルトリンパ腫における抗アポトーシス作用の分子機構の解明と臨床応用

研究課題名（英文） Molecular mechanism underlying anti-apoptotic action in MALT lymphoma and clinical application

研究代表者

細川 好孝（YOSHITAKA HOSOKAWA）

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：60229193

研究成果の概要：

本研究は、MALT リンパ腫の染色体転座 t(11;18) (q21;q21) の本態が API2-MALT1 遺伝子融合であることを世界に先がけて明らかにし、次いで API2 ならびに MALT1 に対するモノクローナル抗体を作製すると共にキメラ遺伝子を検出するための高感度 RT-PCR 法を樹立した。また、免疫沈降法と LC-MS/MS（液クロと質量分析計を繋げた蛋白解析装置）を組み合わせ、API2-MALT1 に結合する蛋白質として、アポトーシスに深く関わる Smac, Htra2, Hsp71 を同定してきた。さらに、API2-MALT1 に抗アポトーシス作用があることを世界に先駆けて実証した。この抗アポトーシス作用の分子的基盤には、Smac を介したミトコンドリア経路と NF- κ B 活性化経路の二つの経路が関与しているとの仮説を提唱した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

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：マルトリンパ腫・アポトーシス・プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

本研究は、悪性リンパ腫の転座関連がん遺伝子 API2-MALT1 融合遺伝子の機能を明らかにすることにより、悪性リンパ腫の診断、治療の実現へ向けての臨床応用を図ることを目的としたものである。我々は、MALT リンパ腫の染色体転座 t(11;18) (q21;q21) の本態が API2-MALT1 遺伝子融合であることを世界に

先がけて明らかにし、次いで API2 ならびに MALT1 に対するモノクローナル抗体を作製すると共にキメラ遺伝子を検出するための高感度 RT-PCR 法を樹立した。また、免疫沈降法と LC-MS/MS（液クロと質量分析計を繋げた蛋白解析装置）を組み合わせ、API2-MALT1 に結合する蛋白質として、アポトーシスに深く関わる Smac, Htra2, Hsp71 を同定してき

た。さらに、API2-MALT1 に抗アポトーシス作用があることを世界に先駆けて実証した。この抗アポトーシス作用の分子的基盤には、Smac を介したミトコンドリア経路と NF- κ B 活性化経路の二つの経路が関与しているとの仮説を提唱した。API2-MALT1 融合遺伝子ならびに BCL6 遺伝子の研究は、悪性リンパ腫の新しい診断法の開発に結びつくだけでなく、BCL1, BCL2 の研究が細胞周期やアポトーシス研究を先導したように、生命科学における新しいパラダイムを生み出す可能性を大いに秘めている。

2. 研究の目的

本研究は、我々自身が単離した API2-MALT1 融合遺伝子の機能を明らかにすることにより、悪性リンパ腫の診断、治療へ向けての臨床応用を実現することを目的としている。

粘膜関連リンパ組織 (MALT) に発生する低悪性度 B 細胞リンパ腫である MAL リンパ腫は、節外性臓器に発生する悪性リンパ腫の主要な部分を占め、臨床的にも非常に注目を集めているリンパ腫である。我々は、MALT リンパ腫に高頻度に認められる染色体転座 t(11;18)(q21;q21) を詳細に解析し、t(11;18)(q21;q21) によって生ずる遺伝子変化の本態が API2-MALT1 遺伝子融合であることを世界に先がけて明らかにした。API2 ならびに MALT1 に対するモノクローナル抗体を作製すると共にキメラ遺伝子を検出する高感度 RT-PCR 法を樹立した。さらに、MALT1 はユビキチン化されてプロテアソームで急速に分解されるが、一度 API2-MALT1 キメラが形成されると安定化され、その半減期が著しく

延長することを見出した。また、免疫沈降法と LC-MS/MS (液クロマトと質量分析計を繋げた蛋白解析装置) を組み合わせて、API2-MALT1 に結合する蛋白質として、アポトーシスに深く関わる Smac, Htra2, Hsp71 を同定してきたので、そのシグナル伝達系の解明も行っていく。国際的には、ドイツのグループが MALT リンパ腫の染色体転座 t(11;18)(q21;q21) から API2-MLT 融合遺伝子 (MALT1 と MLT は同一遺伝子) を単離している (Blood, 1999)。しかし、世界的にもその機能にまで及んだ研究は皆無である。今後、API2-MALT1 融合遺伝子による MALT リンパ腫発生の分子的機構を明らかにしていくと同時に、新しい診断、治療へ向けての臨床応用を図っていくことを目的とする。

3. 研究の方法

- 1) トランスフェクト細胞内局在
- 2) 免疫沈降法と LC-MS/MS を組み合わせたプロテオミクス
- 3) ユビキチン化の解析
- 4) cDNA マイクロアレイ法

4. 研究成果

染色体転座関連がん遺伝子 BCL6 ならびに我々自身が単離した API2-MALT1 融合遺伝子の機能を解明することにより、悪性リンパ腫の診断、治療への臨床応用を実現することを目的として以下の諸点を明らかにした。

1) MALT リンパ腫に高頻度に認められる染色体転座 t(11;18)(q21;q21) の本体が API2-MALT1 遺伝子融合であることを明らかにした。API2-MALT1, API2, MALT1 それぞれを tag を付加した発現ベクターを用いて各種細胞株にトランスフェクトし蛋白の安定性を検討したところ、API2, MALT1 は proteasome 阻害剤の添加により半減期の延長が観察された。一方、API2-MALT1 キメラは proteasome 阻害剤を添加しなくても半減期の延長がみられた。また、細胞内局在を検討したところ、API2 は核と細胞質に局在したが、API2-MALT1 キメラの形成によって局在は細胞質へ移動した。

2) 我々は、これまでに免疫沈降法と LC-MS/MS を組み合わせたプロテオミクスの手法により、API2-MALT1 に会合する蛋白質の同定に成功し、すでに報告した (発表論文 3)。これらは、アポトーシスに深く関わる Smac, Htra2, TRAF2, Hsp70 であった。同様な手法を駆使することによって、CARMA1, BCL10, MALT1, NEMO に会合する新しい分子を同定する準備は十分に整っており、そのような新規分子はすべて分子標的療法にとって理想的な標的分子となり得る。

3) API2-MALT1 下流シグナル伝達系の解析: NEMO のユビキチン化の解析
抗原受容体シグナル BCL10/MALT1 の下流において、MALT1 自身あるいは TRAF6 による NEMO (IKK 複合体の調節サブユニット) のユビキチン化が NF- κ B 活性化に不可欠であることが相次いで報告された (Nature2003, Mol. Cell 2004)。
また、NEMO のユビキチン化部位として、399 番目のリジン残基が候補部位であることが同時に報告された。申請者らも、399 番目リジン残基に変異をもつ NEMO 発現ベクターを構築して同様な検討を行ったが、意外にも Nature の報告とは反する

結果を得た。そこで、新たにリジン残基に変異をもつNEMO発現ベクターを総計15ヶ構築して検討した結果、NEMOのエピキチン化部位と思われる新しい標的候補部位を同定することに成功した。

4) API2-MALT1 抗アポトーシス作用

我々はAPI2-MALT1安定発現株を樹立し、この細胞株を用いてAPI2-MALT1が抗アポトーシス作用を有することを世界に先駆けて実証した。次に、この安定発現株を用いてcDNAマイクロアレイ法を行い、API2-MALT1下流標的候補遺伝子を同定することに成功した。引き続き、遺伝子上流の各種欠失ならびにNF- κ B部位に変異を導入したコンストラクトを用いたレポーターアッセイを行い、現在までに少なくとも4つのAPI2-MALT1下流標的遺伝子を同定している(投稿準備中)。これらの標的分子もMALTリンパ腫の診断治療に役立つマーカーや分子標的療法のターゲットとなる可能性がある。

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4件)

1. Murakami K, Haneda M, Makino T, Yoshino M. Prooxidant action of furanone compounds: Implication of reaction oxygen species in the metal-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *Food and Chemical Toxicology* 45, 1258-1262, 2007.

2. Murakami K, Haneda M, Qiao S, Naruse M, Yoshino M. Prooxidant action of rosmarinic acid: Transition metal-dependent generation of reactive oxygen species. *Toxicology in Vitro* 21, 613-617, 2007.

3. 村上恵子, 羽根田みや子, 細川好孝, 吉野昌孝 ぺリジンカルボン酸遷移金属複合体による活性酸素の生成 微量栄養素研究 24, 49-55, 2007

4. 村上恵子, 羽根田みや子, 喬善楼 (中部大・生命科学), 細川好孝, 吉野昌孝 ミモシンのプロオキシダント作用 遷移金属複合体による活性酸素種の生成微量栄養素研究 25, 76-80, 2008

[学会発表] (計12件)

1. 村上恵子, 羽根田みや子, 細川好孝, 吉

野昌孝 ぺリジンカルボン酸遷移金属複合体による活性酸素の生成 第24回微量栄養素研究会シンポジウム 2007年6月7日 京都

2. 坪内涼子, 吉野恵子, 羽根田みや子, 細川好孝, 吉野昌孝 (金城学院大) レスベラトロールによる活性酸素の生成とアポトーシスの誘導 第80回日本生化学会大会 2007年12月11日 横浜

3. Yukio Nisimoto, Ryoko Tsubouchi, Yositaka Hosokawa, Becky Diebold (Dept of Pathol., Med. Sch. Emory Univ.), Shanlou Qiao (Dept. of Biomed. Sci., Chubu Univ. College of Life and Health Sci.), Hisamitsu Ogawa (Dept. of Biol., Fujita Health Univ., Sch. of Med.) Rac1-dependent NADPH oxidase 1 activation in tumor colon epithelial cell. 第80回日本生化学会大会 2007年12月13日 横浜

4. 三浦裕次, Elinor Lee (NIH), Adrian Wiesther (NIH), 細川好孝 慢性リンパ性白血病におけるCXCR4/SDF-1による遊走反応と細胞生存の制御機構 第80回日本生化学会大会 2007年12月11日 横浜

5. 細川好孝, 西本行男, 吉野恵子, 坪内涼子, 三浦裕次 マルトリンパ腫の責任癌遺伝子API2-MALT1はNF- κ Bの活性化を介してアポトーシス抑制因子API2の転写を促進する。第80回日本生化学会大会 2007年12月14日 横浜

6. 村上恵子, 羽根田みや子, 成瀬誠, 細川好孝, 吉野昌孝 (金城学院大) キノリン誘導体のプロオキシダント機能: ハロゲンの導入による活性酸素種生成能の低下 第80回日本生化学会大会 2007年12月14日 横浜

7. 村上恵子, 羽根田みや子, 喬善楼*, 細川好孝, 吉野昌孝 ミモシンのプロオキシダント作用: 遷移金属複合体による活性酸素種の生成 第25回微量栄養素学会学術集会 2008年5月30日 京都

8. 三浦裕次, 細川好孝 悪性中皮腫におけるNox4の抑制によるアポトーシス誘導 第67回日本癌学会学術総会 2008年10月28日 名古屋

9. 坪内涼子, 三浦裕次, 田中元也, 細川好孝 中皮腫細胞におけるレスベラトロールによるアポトーシス誘導 第81回日本生化学会大会 2008年12月10日 神戸

10. 羽根田みや子, 大橋寛史, 星野弘典, 三浦裕次, 坪内凉子, 細川好孝 マントル細胞性リンパ腫細胞株におけるレスベラトロールによるアポトーシスの誘導 第81回日本生化学会大会 2008年12月10日 神戸

11. 三浦裕次, 坪内凉子, 羽根田みや子, 竹内章夫, 吉野恵子, 西本行男, 細川好孝 マントル細胞リンパ腫におけるストローマ依存性薬剤体制の克服 第81回日本生化学会大会 2008年12月10日 神戸

12. 村上恵子, 羽根田みや子, 細川好孝, 番善楼 (中部・生命科学), 吉野昌孝 (金城学院大) ミモシン鉄複合体による活性酸素生成 第81回日本生化学会大会 2008年12月12日 神戸

〔図書〕 (計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 件)

○取得状況 (計 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細川 好孝 (YOSHITAKA HOSOKAWA)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号: 60229193

(2) 研究分担者

村上 恵子 (KEIKO MURAKAMI)
愛知医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 10139652

(3) 連携研究者