

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790998  
 研究課題名（和文）：中枢神経原発悪性リンパ腫におけるオーロラキナーゼの発現・機能解析  
 研究課題名（英文）：Expression and functional analysis of Aurora kinases in primary intracranial CNS lymphoma  
 研究代表者  
 水川 克（MIZUKAWA KATSU）  
 神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員  
 研究者番号：80403260

研究成果の概要：2000年以降の当施設で手術摘出した頭蓋内悪性リンパ腫30例の組織でのAurora発現を検討した所、ほぼ全ての組織でAurora-A, Aurora-Bキナーゼの発現亢進を認めた。また、Auroraキナーゼの発現は、特に分裂期の細胞およびMIB-1で染色される細胞での発現が多かった。摘出した悪性リンパ腫からの細胞株の樹立は難しく、現在も細胞株の樹立中である。また、Auroraキナーゼのノックダウンによる細胞死や細胞周期の解析も現在検討中であるが、Auroraキナーゼのノックダウンによりアポトーシスが増加する傾向が認められた。頭蓋内悪性リンパ腫におけるAurora-A, Aurora-B蛋白の高発現より、頭蓋内悪性リンパ腫の治療標的としてこれらの蛋白の阻害が奏功する可能性があると考えられた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	420,000	3,220,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：癌、遺伝子、ゲノム、脳・神経

## 1. 研究開始当初の背景

悪性リンパ腫でのオーロラキナーゼに関する報告は少ない。Hamadaらは頭蓋外non-Hodgkin's lymphomaにおいてオーロラmRNAの発現が増加し、アンチセンスオリゴにてオーロラAの発現抑制を行うとG1 arrestを起し、細胞増殖能が低下したことを報告

している。また、mantle cell lymphomaでは非常に高頻度に染色体の異常が認められたが、そのような異常細胞ではオーロラAのmRNAの発現量が非常に増大していたことが報告されている。しかし、中枢神経原発悪性リンパ腫においてオーロラキナーゼの発現を解析した報告はない。

## 2. 研究の目的

我々は、中枢神経原発悪性リンパ腫患者の組織でのオーロラキナーゼ発現を調べ、更に、中枢神経原発悪性リンパ腫細胞株を樹立させ、オーロラキナーゼの過剰発現、オーロラキナーゼのノックダウン細胞を作製・解析して、その細胞株でのオーロラキナーゼの役割を調べ、さらに治療のターゲットになり得るかについて検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 申請者の施設で現在までに手術摘出した標本から免疫染色によりオーロラA, -Bの蛋白発現量を解析する

(2) 当施設で摘出した中枢神経悪性リンパ腫の組織から細胞株をいくつか樹立させ、その後の解析に使用する。

(3)

① 樹立させた細胞株でのオーロラの発現状態を解析

② 中枢神経原発悪性リンパ腫細胞株にオーロラキナーゼを過剰発現させ、他の腫瘍細胞株と同様に細胞分裂異常を来たすか検討。オーロラキナーゼの発現ベクターをトランスフェクションさせ、発現誘導させることはグリオーマ培養細胞では施行しており、方法は確立している。グリオーマ細胞と同様、オーロラキナーゼ (A, B, C) の発現ベクター (pcDNA3-オーロラ) を中枢神経原発悪性リンパ腫細胞にトランスフェクションさせ、細胞周期、細胞死や染色体分離異常について解析する。また、エストロゲンレセプターにて発現誘導されるベクターを導入させ、オーロラの発現誘導を行ったときの変化も上記同様解析する。

③ 樹立細胞株でオーロラキナーゼをsiRNAの方法を用いてノックダウンさせ、細胞分裂、細胞増殖、アポトーシスなど検討。この手法を用いて、中枢神経原発悪性リンパ腫においてオーロラキナーゼの発現を抑制させ、その時の細胞分裂、細胞増殖、細胞周期、細胞死や染色体異常などについて解

析する。

## 4. 研究成果

(1) 現在、いくつかの摘出した腫瘍組織から細胞株を樹立する試みを行っている。頭蓋内悪性リンパ腫の細胞株樹立は、増殖能があまりないために難しく、また樹立した細胞株が、中枢神経原発悪性リンパ腫細胞であるかは、免疫染色やFACS, 染色体検査など樹立した細胞も細胞表面抗原で検討したが、リンパ腫細胞と断定できないこともあり、細胞株樹立に困難であった。しかし、今後も、さらに手術摘出した組織より細胞株を樹立するようにする。

(2) 中枢神経原発悪性リンパ腫の患者 30 例の腫瘍組織のパラフィン切片を用いて、Aurora-A の発現を検討すると、ほぼ全ての症例のリンパ腫細胞で Aurora の発現を認めた。特に分裂期の細胞では発現が特に亢進しており、MIB-1 染色を行い、増殖能のある細胞を見ると、Aurora は増殖能の盛んな細胞で特に発現が上昇していることが観察された。これは、やはり Aurora-A が分裂期キナーゼであることを示唆する所見であった。

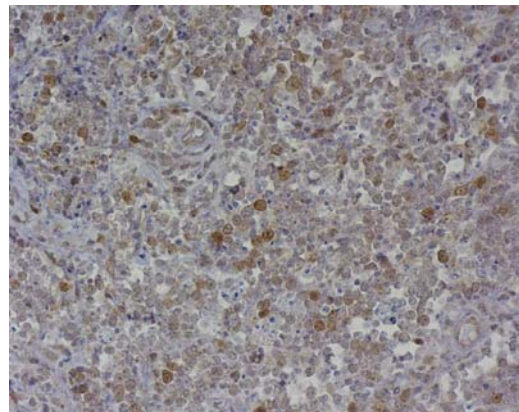


図1 (diffuse large B cell lymphoma での Aurora-A 蛋白の発現: 多くのリンパ腫細胞にて Aurora-A の発現を認める。特に分裂期の細胞での発現亢進が著明である。)

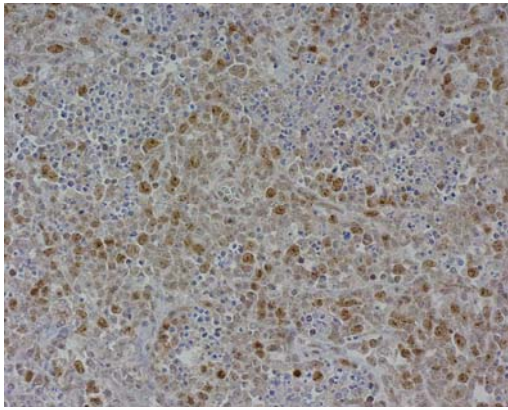


図2 (diffuse large B cell lymphoma で Aurora-B 蛋白の発現：多くのリンパ腫細胞にて Aurora-A の発現を認める。特に分裂の細胞での発現亢進が著明である。)

(3) 頭蓋内原発悪性リンパ腫の細胞株である BML 細胞に Aurora-A 蛋白を siRNA でノックダウンして細胞周期、細胞死等を検討したが、十分なノックダウンが出来ず、現在も解析中である。しかし、Aurora キナーゼのノックダウンによりアポトーシスが増加する傾向が認められた。

#### 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 Takashi Sasayama, Katsu Mizukawa, Yoshio Sakagami, Takashi Mizowaki, Kazuhiro Tanaka, Chiho Ohbayashi Kiyoshi Mori, Sohei Kitazawa  
Eiji Kohmura, Glioblastoma multiforme associated with Klinefelter syndrome, Case report and review of the literature Neurologia medico-chirurgica, 2009, (in press)

② Tanaka K, Sasayama T, Mizukawa K, Kawamura A, Kondoh T, Hosoda K, Fujiwara T, Kohmura E.  
Specific mTOR inhibitor rapamycin enhances cytotoxicity induced by alkylating agent 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea (ACNU) in human U251 malignant glioma cells.  
*J Neurooncol.* 84(3):233-44, 2007,  
査読あり

③ Sasayama T, Tanaka K, Mizukawa K, Kawamura A, Kondoh T, Hosoda K, Kohmura E. Trans-4-Iodo, 4'-boranyl-chalcone induces antitumor activity against malignant glioma cell lines in vitro and in vivo. *J Neurooncol.* 85(2):123-32, 2007  
査読あり

④ Sasayama T, Nishihara M, Tanaka K, Mizukawa K, Ehara K, Kanomata N, Kohmura E. Two metachronous tumors induced by radiation therapy  
*J Neurooncol.* 88(3):315-20, 2008,  
査読あり

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

水川 克 (MIZUKAWA KATSU)

神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員  
研究者番号：80403260

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者