

平成 23 年 6 月 10 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2008～2010

課題番号：20590366

研究課題名（和文）反応性濾胞と濾胞性リンパ腫の転写後翻訳機構の違いに注目した発現分子の比較研究

研究課題名（英文）Comparative analysis of micro RNA expressions on between reactive lymphoid follicles and follicular lymphomas focusing to post-translational process.

研究代表者

近藤英作 (KONDO EISAKU)

愛知県がんセンター（研究所）腫瘍病理学部・部長

研究者番号：30252951

研究成果の概要（和文）：

非腫瘍性胚中心B細胞とそこを発生母地とする難治性リンパ腫である濾胞性リンパ腫について、特異的に発現変動のある micro RNA を探索することにより、濾胞性リンパ腫発生の転写後遺伝子制御機構の特徴の一端を明らかにすることを目指した。ヒト病理組織からのマイクロダイセクションサンプルの miRNA プロファイリングおよびセルソーティング法による抽出細胞の real-time PCR 両手法を総合した解析では、濾胞性リンパ腫で胚中心に比較して、miR-146a および miR-193b の発現亢進が認められ、一方 miR-26a は発現が抑制されていた。B 細胞特異的に miR-146a の過剰発現をもたらすトランスジェニックマウスを作製した検索では、胚中心形成刺激に対して野生型よりも胚中心の増生傾向が認められるようである。この現象については現在検証中である。

研究成果の概要（英文）：

We planned the expression analysis of micro RNAs on between human follicular lymphomas (FLs) and their non-neoplastic counterpart, germinal centers (GCs) to elucidate the lymphomagenesis of FLs. From the results of miRNA profiling of human FLs in comparison with that of GCs, also of quantitative analysis by real-time PCR for sorted GC cells and FL cells, miR-146a and miR-193b revealed to be up-regulated in FLs than GCs, whereas miR-26a seemed to be down-regulated. Based on these results, we further generated transgenic mice overexpressing mouse miR-146a under regulation by immunoglobulin enhancer/promotor, and explore the phenotypic features of their B cells. Consequently, splenic GCs in miR-146a Tg mice seemed to be enlarged in response to stimulation by an exogenous antigen than those in wild type mice. The details are still under investigation now.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学 6908

キーワード：分子病理、濾胞性リンパ腫、microRNA、胚中心、トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

近年注目されている snoRNA, miRNA などの small non-coding RNA は、細胞の分化や増殖制御に大きな影響を与えることが知られているが、個別の細胞腫での発現動態に関する具体的情報は不足している。snoRNA は RNA の修飾による遺伝子産物の変化を、miRNA は mRNA の分解による遺伝子産物の抑制をもたらすが、両者とも一般的な遺伝子活性化過程と異なり、転写後翻訳過程というユニークなプロセスで働き、また一分子の発現動態が多数の標的遺伝子を動かす点で、細胞機能の獲得や腫瘍の基本的な分子生物学的特徴を網羅的に捉える手がかりとなると言える。一方、リンパ腫とその発生母地細胞集団の精確な対比（本研究では、濾胞性リンパ腫とその発生母地である胚中心、さらにマントル帯）は、腫瘍化プロセスのみならず正常免疫機構形成のしくみを精密な表裏一体の情報として得られる利点がある。

2. 研究の目的

われわれは従来の研究の問題点であった特異的細胞集団の純化・抽出にマイクロダイセクション技術を応用してこの夾雑細胞の混入の問題を克服しつつ、この3者についての snoRNA, miRNA に注目した精密な発現プロファイリングを実施し、この情報をもとに未だ明らかにされていない腫瘍化および B 細胞免疫機構形成に関わる発現分子群の特徴を具体的・網羅的に解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(研究戦略の概要)

I : マイクロダイセクションで抽出した特異的細胞集団の遺伝子の特徴を snoRNA, miRNA を中心とした small RNA プロファイリングで比較解析。

II : 正常胚中心、濾胞性リンパ腫、マントル帯夫々に特異的な変動を示す RNA を同定し、腫瘍細胞株にこれらを導入してその細胞生物学的変化（機能・分化・動態）を追跡。

III : small RNA の標的候補分子をデータベースを利用して絞込み、その発現をリンパ腫・反応性リンパ組織外科材料に対する免疫組織化学によりパネル的に検索し具体的・詳細に検討。

(研究期間3年間の具体的な研究方法)

[平成20年度の計画]

◎ snoRNA, miRNA の発現プロファイリングと real-time PCR による解析 (近藤の作業)。

●まず、reactive lymphoid hyperplasia (3件)、grade1 濾胞性リンパ腫 (3件) の外科病理診断材料凍結切片からマイクロダイセクションを実行する。切り取った胚中心、マントル帯、腫瘍性濾胞 (FL) について small RNA を含む total RNA を抽出・純化し、

sonRNA, miRNA プロファイリングをアレイシートを用いて実施。比較により変動を示す候補 (GC vs FL, GC vs MZ, FL vs MZ) について sno, miRNA 用 real-time PCR を用いて再現性を確認し、特異的 RNA の絞込みを行う。(前ページ図第一段階)

●snoR, miR 特異的 real-time PCR による再現性の確認作業に際しては、その解析 RNA 用サンプルとして、アレイに用いた RNA とともに、摘出されたヒト扁桃より CD38+, IgD+ 分画 (胚中心分画)、CD38-, IgD+ 分画 (マントル帯分画) をセルソーター (FACS Aria) にて分離抽出した RNA、及びヒト濾胞性リンパ腫細胞株 (FL-18 (FL grade I): 大野仁嗣博士より供与) RNA を併せて同様に解析に用いることによって、結果の信頼性を高める作業を加える。

●次に、これらピックアップした複数 (それぞれ約 5~10 遺伝子前後) を細胞に導入してその細胞の動態 (増殖能・アポトーシス抵抗性・メチル化の有無や遺伝子・タンパク発現変動などのフェノタイプの変化) を追跡・解析する。

例えば、胚中心 (GC) ↑かつ濾胞性リンパ腫 (FL) ↓パターンでは、ヒト濾胞性リンパ腫細胞株 (FL-18) に当該 miR, snoR を導入する (導入法は電気穿孔

Nucleofector; Amaxa 社、或いはリポカチオン導入試薬 (RNAiMax; Invitrogen 社) など)。

逆に胚中心 (GC) ↓かつ濾胞性リンパ腫 (FL) ↑パターンでは、FL-18 に anti-miR

を導入する、あるいは末梢 B リンパ球を芽球化させた一種の GC アナログに当該 miR,

snoR を導入する。導入後の細胞について、細胞の増殖動態、アポトーシス感受性、形態変化や免疫フェノタイプの変化について、

MTT assay、抗原受容体刺激や ionomycin 処理、血清除去などのアポトーシス刺激につ

く apoptosis marker による FACS 解析、ウェスタンブロット、RT-PCR、メチル化検出

PCR、顕微形態観察、免疫組織化学などを併用して解析を進める。有意な変化が見られる

snoR, miR については、FL-18 への単独 RNA 導入のみならず複数 RNA 分子の導入も適宜考

えて実施し、同様の解析を行う。また、得られたデータに基づいて、さらに数種類のヒト

濾胞性リンパ腫細胞株で結果が再現されるか否かを同様の手法にて検定する。

[平成21年度の計画]

●前年度に実施した実験結果から、胚中心と濾胞性リンパ腫の間で特徴的に増減のコントラストが認められた miRNA について、生

体での実際の機能 (腫瘍原性や細胞生存・アポトーシス抵抗性などに注目) を探索するため、

モデルとして特異的 miRNA 発現トランスジェニックマウスの作製を試みる。具体的には、

絞り込んだヒト miRNA についてアナログと

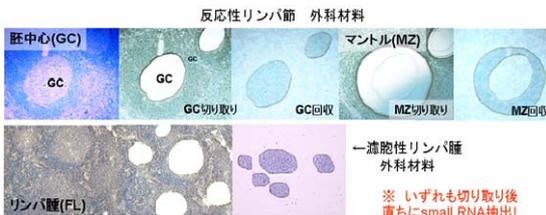
なるマウス miRNA ゲノム領域をクローニングし、immunoglobulin enhancer/promotor 発現制御下にこれをマウス B cell で特異的に発現する transgenic mouse を作成する。

[平成22年度の計画]

●前年度に作成した Tg マウスについて、胚中心細胞の増殖制御に関与する様々な刺激を加えて、胚中心細胞の動態の変動の有無を解析し、特異的なフェノタイプを示すか否かを探索し、難治性リンパ腫である濾胞性リンパ腫の発生母地における特定の miRNA の関与と働きを明らかにしていく。これによって、濾胞性リンパ腫およびその母地である胚中心 B 細胞の新たな分子学的性状の解明の手掛かりをつかむ。

4. 研究成果

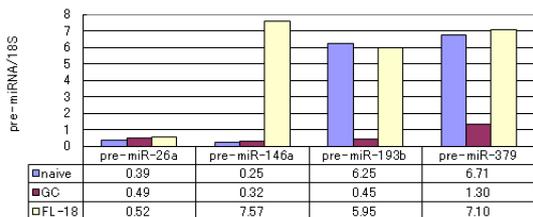
①: miR-146a は胚中心に比較し、濾胞性リンパ腫で特異的に発現上昇している。



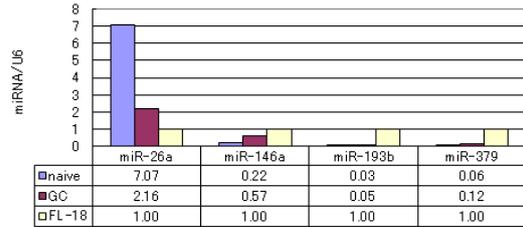
上図のごとく、凍結患者病理組織切片(各3例)から胚中心部分、リンパ腫の結節状増殖部をマイクロダイセクションで切り出して miRNA array, snoRNA array に展開した。プロファイルの結果、下表のような miR が特徴的変動分子の候補として挙げられた。

	snoRNA	miRNA
GC ↑ & FL ↓	U92, U20 etc.	hsa 379, 194 etc.
GC ↓ & FL ↑	ACA5, 14q(lI-8) etc.	hsa miR26a, 146a etc.
GC ↑ & MZ ↓	U93, U78 etc.	hsa miR193b, 323 etc.
GC ↓ & MZ ↑	14q(lI-8), U50 etc.	hsa miR99b, etc.

この結果から、さらに扁桃摘出患者から胚中心細胞をソーティングした細胞サンプル(2例)と濾胞性リンパ腫細胞株 FL-18 を比較材料に、real-time PCR 法でプロファイリング結果からの候補遺伝子数個について発現量比較してさらに特異的変動 miR を絞り込んだ。下記は real-time PCR による発現定量結果。



(※上記は pre-miR の発現比較)

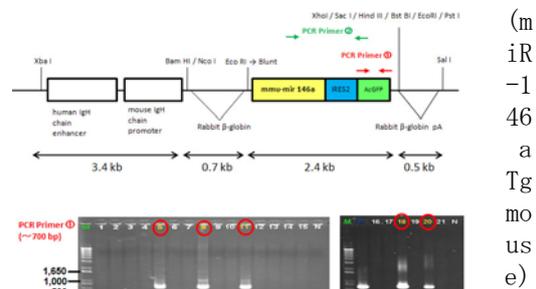


(※上記は mature miR の発現比較)

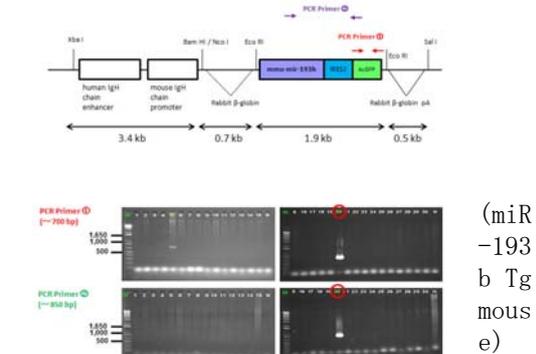
Pre-, mature miR の変動を比較した結果より、miR-146a は濾胞性リンパ腫において胚中心よりも約2倍近く発現が亢進していることが確認された。また、mi-193b も同様の傾向(1.0倍増幅)が見られ、逆に miR-26a は胚中心において発現が高く、濾胞性リンパ腫では発現が抑えられていることが判明した。

②: miR-146a, miR-193b 高発現トランスジェニックマウスを作製。

B細胞特異的に上記二つの micro RNA を発現する(Ig enhancer/promotor-driven)トランスジェニックマウスを理化学研究所との共同研究で作成した。下図はベクターコンストラクションと、当ベクターを胚操作によりインジェクション後発生したマウステール抽出 genomic DNA を用いたタイピングの結果例である。



(m
iR
-1
46
a
Tg
mo
us
e)



(miR
-193
b Tg
mous
e)

③: トランスジェニックマウスの B 細胞フェノタイプ

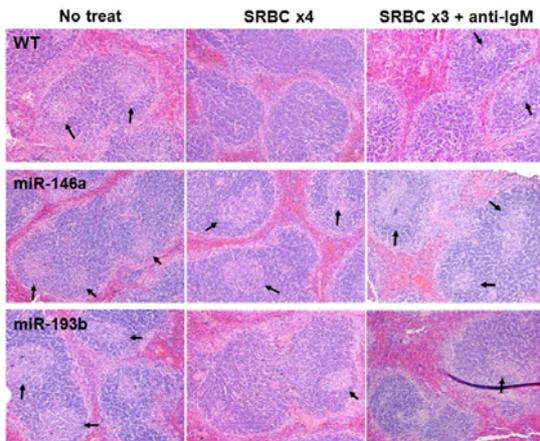
イブの解析研究。

上記 miR-146a Tg, miR-193b Tg マウスを wild type とともにフェノタイプ検索実験に用いて解析中である。

現在までに判明している結果：

- ・異種抗原（羊赤血球の腹腔内注射）に対して形成される反応性濾胞内胚中心のサイズに差異がある。
- ・胚中心形成後、B 細胞膜表面受容体 (BCR; B-cell antigen receptor) を介するリガンド刺激（抗 IgM 抗体注射）に対する反応に差異がある。（形成された胚中心 B 細胞の性状・動態を解析するため。）

（矢印は胚中心を指す。）



miR-146a Tg マウスの胚中心は、SRBC 刺激に対して WT や miR-193b マウスのそれが委縮性に退縮するのに比較して明らかに増生・拡大する傾向がある。

miR-146a Tg マウスの胚中心は、SRBC 刺激による誘導形成後、BCR のリガンドである抗マウス IgM 抗体投与によっても退縮しない。一方、WT や miR-193b マウスでは非刺激コントロール群よりもさらに委縮傾向にある。以上の結果の再検証とその分子機序、胚中心構成細胞の性状について現在解析中である。

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 17 件）

1. Sato, Y., Ichimura, K., Tanaka, T., Takata, K., Morito, T., Sato, H., Sato, Y., Kondo, E., Yanai, H., Ohara, N., Oka, T., Yoshino, T.: Duodenal follicular lymphomas share common characteristics with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas.” *J. Clin. Pathol.* 61: 377-381, 2008.
2. Akimzhanov, A., Krenacs, L., Schlegel, T., Klein-Hessling, S., Bagdi, E.,

Stelkovic, E., Kondo, E., Chuvpilo, S., Wilke, P., Avots, A., Gattenlöhner, S., Müller-Hermelink, H-K., Palmetshofer, A., Serfling, E.: Epigenetic Changes and Suppression of the Nuclear Factor of Activated T Cell 1 (*NFATC1*) Promoter in Human Lymphomas with Defects in Immunoreceptor Signaling. *Am. J. Pathol.* 172: 215-224, 2008.

3. Kondo, E., Tanaka, T., Miyake, T., Ichikawa, T., Hirai, M., Adachi, M., Yoshikawa, K., Ichimura, K., Ohara, N., Moriwaki, A., Date, I., Ueda, R., Yoshino, T.: Potent synergy of dual antitumor peptides for growth suppression of human glioblastoma cell lines. *Mol. Cancer Ther.* 7: 1461-1471, June 1, 2008.

4. Ohashi, K., Rai, K., Fujiwara, Y., Osawa, M., Hirano, S., Takata, K., Kondo, E., Yoshino, T., Takata, M., Tanimoto, M.: Induction of lung adenocarcinoma in transgenic mice expressing activated *EGFR* driven by the SP-C promoter. *Cancer Sci.* 99(9):1747-53, 2008.

5. Sato, Y., Ohshima, K., Ichimura, K., Sato, M., Yamadori, I., Tanaka, T., Takata, K., Morito, Y., Kondo, E., Yoshino, T.: Ocular adnexal IgG4-related disease has uniform clinicopathology. *Pathol. Int.* 58: 465-470, 2008.

6. Nakahara H, Misawa H, Hayashi T, Kondo E, Yuasa T, Kubota Y, Seita M, Kawamoto H, Hassan WA, Hassan RA, Javed SM, Tanaka M, Endo H, Noguchi H, Matsumoto S, Takata K, Tashiro Y, Nakaji S, Ozaki T, Kobayashi N.: Bone repair by transplantation of hTERT-immortalized human mesenchymal stem cells in mice. *Transplantation.* 88(3): 346-353, 2009.

7. Takata K, Sato Y, Nakamura N, Kikuti YY, Ichimura K, Tanaka T, Morito T, Tamura M, Oka T, Kondo E, Okada H, Tari A, Yoshino T.: Duodenal and nodal follicular lymphomas are distinct: the former lacks activation-induced cytidine deaminase and follicular dendritic cells despite ongoing somatic hypermutations. *Mod Pathol.* 22: 940-949, 2009.

8. Tanaka T, Ichimura K, Sato Y, Takata K, Morito T, Tamura M, Kondo E, Ohara N, Yanai H, Sakai 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.

9. Navarro-Alvarez N, Soto-Gutierrez A, Chen Y, Caballero-Corbalan J, Hassan W,

Kobayashi S, Takei J, Kondo Y, Iwamuro M, Yamamoto K, Kondo E, Tanaka N, Fox IJ, Kobayashi N: Intramuscular transplantation of engineered hepatocyte constructs corrects acute and chronic liver failure in mice. *Journal of Hepatology* 52: 211-219, 2010.

10. Okamoto N, Kuwahara K, Ohta K, Kitabatake M, Takagi K, Mizuta H, Kondo E and Sakaguchi N: Germinal center-associated nuclear protein (GANP) is involved in mRNA export of Shugoshin-1 required for centromere cohesion and in sister-chromatid exchange. *Genes to Cells*, 15: 471-484, 2010.

11. *Navarro-Alvarez N, *Kondo E, *Soto-gutierrez A, Kawamoto H, Hassan W, Yuasa T, Kubota Y, Seita M, Nakahara H, Hayashi T, Nishikawa Y, Hassan RARA, Javed SM, Noguchi H, Matsumoto S, Nakaji S, Tanaka N, Kobayashi N: Isolation and propagation of a human CD133-negative colon tumor-derived cell line with tumorigenic and angiogenic properties. *Cell Transplantation* 19: 865-877, 2010. (*these authors are equally contributed.)

12. Kawamoto H, Yuasa T, Kubota Y, Seita M, Sasamoto H, Javed SM, Hayashi T, Nakahara H, Hassan R, Iwamuro M, Kondo E, Nakaji S, Tanaka N, Kobayashi N: Characteristics of CD133(+) human colon cancer SW620 cells. *Cell Transplantation* 19: 857-864, 2010.

13. Matsui M, Shimizu, Y Ikehara Y, Kondo E, Kodera Y, Nakanishi H: Targeted delivery of oligomannose-coated liposome to the omental micrometastasis by peritoneal macrophages from patients with gastric cancer. *Cancer Sci*, 101: 1670-1677, 2010.

14. Iwamuro M, Komaki T, Kubota Y, Seita M, Kawamoto H, Yuasa T, Javed SM, Hassan RARA, Nakaji S, Nishikawa Y, Kondo E, Yamamoto K, Kobayashi N: Comparative analysis of endoderm formation efficiency between mouse ES cells and iPS cells. *Cell Transplantation* 19: 831-839, 2010.

15. Iwamuro M, Komaki T, Kubota Y, Seita M, Kawamoto H, Yuasa T, Javed SM, Hassan RARA, Nakaji S, Nishikawa Y, Kondo E, Yamamoto K, Fox IJ, Kobayashi N: Hepatic differentiation of mouse iPS cells in vitro. *Cell Transplantation* 19: 841-847, 2010.

16. Nakaya T, Kuwahara K, Ohta K, Kitabatake M, Toda T, Takeda N, Tani T, Kondo E, Sakaguchi N: Critical role of

Pcid2 in B cell survival through the regulation of MAD2 expression. *J. Immunol*, 185: 5180-5187, 2010.

17. Yamamoto T, Navarro-Alvarez N, Soto-Gutierrez A, Yuasa T, Iwamuro M, Kubota Y, Seita M, Kawamoto H, Javed SM, Kondo E, Noguchi H, Kobayashi S, Nakaji S, Kobayashi N: Treatment of acute liver failure in mice by hepatocyte xenotransplantation. *Cell Transplant*, 19: 799-806, 2010.

[学会発表] (計 25 件)

「平成 20 年度」

第 97 回日本病理学会総会 (2 件)
第 12 回日本がん分子標的治療学会 (1 件)
第 67 回日本癌学会学術総会 (1 件)
第 3 回産学官連携新産業創出研究会 (1 件)
Ehrlich II-2nd world Conference on Magic Bullets (1 件)
20th EORTC-NCI-AACR Symposium (1 件)

「平成 21 年度」

第 98 回日本病理学会総会 (2 件)
第 13 回日本がん分子標的治療学会 (1 件)
第 68 回日本癌学会学術総会 (1 件)
The 2nd Annual Protein and Peptide Conference (PepCon-2009) (1 件)
CTS - JSOPMB Joint Conference Symposium (1 件)

「平成 22 年度」

第 99 回日本病理学会総会 (2 件)
第 19 回日本がん転移学会総会 (1 件)
第 14 回日本がん分子標的治療学会 (1 件)
第 69 回日本癌学会学術総会 (5 件)
第 83 回日本胃癌学会総会 (2 件)
22nd EORTC-NCI-AACR Symposium (1 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤英作 (KONDO EISAKU)
愛知県がんセンター (研究所) 腫瘍病理学
部・部長
研究者番号：30252951

(2) 研究分担者

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：