

平成22年 5月18日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20790674
 研究課題名 (和文) 悪性リンパ系腫瘍における TFL 遺伝子欠失と臨床病態に関する臨床研究
 研究課題名 (英文) Clinical research for disease mechanisms associated with TFL gene dysfunction in malignant lymphoid tumors
 研究代表者
 皆川 健太郎 (MINAGAWA KENTARO)
 神戸大学・医学部附属病院・医員
 研究者番号：80432574

研究成果の概要 (和文) : 我々が見出した TFL 遺伝子の欠失の頻度をリンパ系腫瘍患者検体で解析した。染色体解析において 15.3%の欠失が起こっていることが明らかとなった。また、TFL の分子メカニズムについても解析し、細胞増殖を抑制しアポトーシスを誘導する分子であり、細胞質の P-body とよばれる顆粒に局在して RNA 制御に関わる分子であることを報告した。以上より TFL 遺伝子の欠失によりリンパ球の増殖の制御を失い、腫瘍発症に関わるメカニズムが見出された。

研究成果の概要 (英文) : We recently identified a novel gene with a similar CCCH-type zinc finger domain as a possible tumor suppressor gene that is involved in a cryptic breakpoint translocation found in human transformed follicular lymphoma. To clarify clinical significance for the gene, we analyzed the gene defect of 84 lymphoma patients. Eleven patients (15.3%) lose at least one allele. TFL protein inhibited cell growth and provoked apoptosis. As for its subcellular localization, it localized in the cytoplasmic granules called P-bodies. The inhibitory activity of TFL for lymphocyte proliferation highlights the potential utility of TFL as therapeutic targets for leukemia and/or lymphoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：TFL , ZC3H12D , Tumor suppressor gene , FISH , 6q- , Rb , Apoptosis

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々は、t(18;22)転座を有する FL から DLBCL へトランスフォームする際に新たに加わった t(2;6)転座より新たに 6q 染色体上にある未知の遺伝子をクローニングしこれを *Transformed follicular lymphoma*

(TFL) gene と命名した

(2) TFL は C-x8-C-x5-C-x3-H タイプのジンクフィンガーモチーフを有する遺伝子で 4 種類のファミリーすべての遺伝子座は悪性リンパ腫の染色体欠損のよく見られる領域

域に存在している。

2. 研究の目的

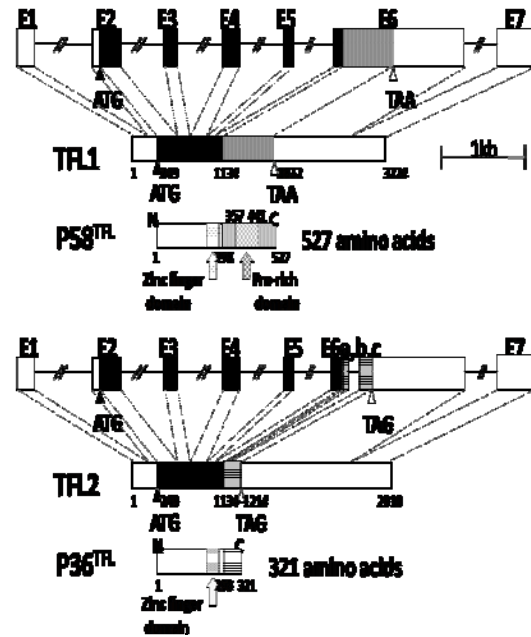
- (1) 悪性リンパ腫症例に対して臨床研究により新しい癌抑制遺伝子の候補である *TFL* の欠失の有無の頻度を調べる。
- (2) *TFL* の分子制御メカニズムを明らかにしリンパ腫発症にどのように関わるのかを調べる。

3. 研究の方法

- (1) *TFL* を含む PAC クローンを FISH 法のプローブとし、6 番染色体のセントロメア領域のプローブも併用し、dual-color による間期核 FISH の系により、診療のため一般的にカルノア固定液を用いて検査を行う。
- (2) *TFL* のスプライスバリエントの有無について調べその全長を同定する。
- (3) *TFL* の組織発現プロファイルを mRNA レベル蛋白レベルで調べるとともにリンパ系細胞株に *TFL* を発現させた際の細胞増殖やアポトーシスについて検討する。
- (4) GFP 融合蛋白を発現させ細胞内の局在につき検討する。

4. 研究成果

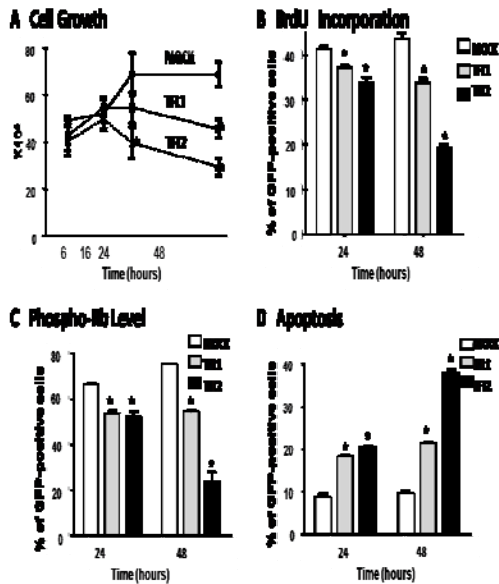
- (1) 84 例のリンパ系腫瘍の検体を FISH 解析し 15.3% に *TFL* 遺伝子座の欠失を認めた。
- (2) 我々はヒト正常リンパ節の cDNA および末梢血リンパ球の cDNA ライブラリーをもちいて詳細な解析を行い、*TFL* には少なくとも 2 つのスプライスバリエントが存在することを見出し、それぞれ発現する分子量に基づいて p58^{TFL}、p36^{TFL} と名付けた。



- (3)
 - ① ノーザンブロットの解析では *TFL* の発現は主にリンパ節・末梢血リンパ球やヒト白血病の cell line において認められ、マウスでは胸腺、脾臓に強い発現を認めた。また、いくつかの白血病の細胞株では *TFL* の欠失が認められた。
 - ② *TFL* に対するポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロットの解析も同様な結果が得られたが、内在性に主に発現が認められたのは p58^{TFL} であった。
 - ③ どちらの *TFL* もマウスの B リンパ球の細胞株である Ba/F3 に過剰発現させると急速に *TFL* を発現した細胞は消失し、BrdU の取り込みを調べると G1 から S 期への細胞増殖を抑制している事が明らかとなった。
 - ④ Rb のリン酸化を調べると *TFL* は Rb のリン酸化を抑制することが分かり、その結果細胞増殖が抑制されることが示唆された。この現象は NIH3T3 細胞においてもみられ、Ba/F3 特異的でないことが明らかとなった。
 - ⑤ アポトーシスに関して解析を行ったところ *TFL* を導入した細胞はアネキシン V の増加とともに活性化カスパーゼ 3 の上昇も認められ *TFL* によりアポトーシスが誘導されていることが分かった。以上により正常リンパ球細胞株において *TFL* は細胞増殖に抑制的に働くことが示された。
 - ⑥ 腫瘍化した細胞における *TFL* の働きを明らかにするために *TFL* を欠失しているヒト白血病細胞株の Jurkat を用いて、同様に

二つのTFLを過剰発現させると、どちらとも細胞増殖を抑制しアポトーシスを誘導した。

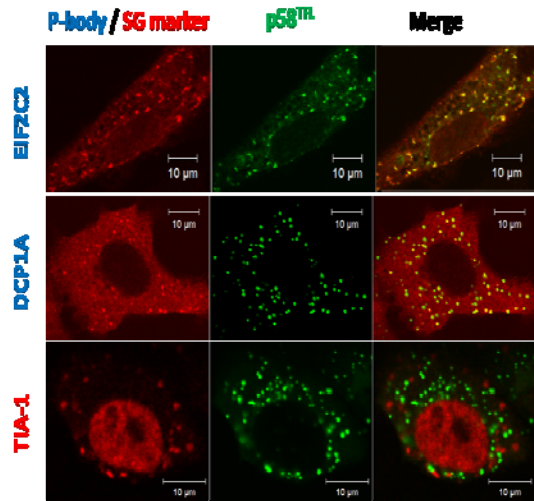
以上より、TFLが正常細胞のみならず腫瘍化した細胞においても細胞増殖を抑制し、がん抑制遺伝子として機能している可能性が考えられた。



(4)

①GFPマーカを用いてp58^{TFL}の局在をHeLa細胞を用いて調べた。すると、TFLは細胞質内に顆粒状に局在し、驚くべきことにP-body (processing body)マーカーとして知られる *Argonaute 2 (AGO2)* のヒトホモログである *eukaryotic translation initiation factor 2C (EIF2C2)* や *decapping-enzyme homolog A (DCP1a)* との共局在が認められた。しかしながらStress granuleのマーカーである *T cell intracellular antigen-1 (TIA-1)* とは近接しているものの、局在は一致しなかった。

②p36^{TFL}については全く局在が異なり主に核内に発現が認められた。

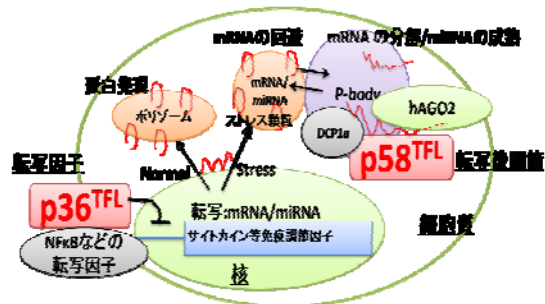


P-bodyとは近年マイクロRNAやsiRNAの機能発現の場として知られるようになった細胞質内の顆粒でStress granuleと共役してmRNAの分解なども行っていることが知られている。

TFLはCCCHタイプのユニークなジンクフィンガーを持つ蛋白であり同様のモチーフを持つ蛋白として *Tristetraprolin (TTP)* が知られている。TTPはTNF- α の3' -UTRに結合するRNA結合蛋白でありRNAの分解を促進する機能が知られている。また、TTPはP-bodyやStress granuleに局在することが報告されている。

P-bodyへの局在とRNA結合型CCCHタイプジンクフィンガーモチーフの存在によりp58^{TFL}はP-bodyに存在し細胞増殖の調節において転写後調節を行いながらRbの上流の分子の機能を調節している可能性が示唆された。

そのメカニズムは3' -UTRへの結合によるmRNAの分解なのかマイクロRNAによる翻訳抑制なのかは現時点では明らかでないが今後TFLの標的分子を同定することでさらに詳細な機能が判明するものと思われる。



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 1 件)

- ① Minagawa K, Katayama Y, Nishikawa S, Yamamoto K, Sada A, Okamura A, Shimoyama M, Matsui T. Inhibition of G1 to S Phase Progression by a Novel Zinc Finger Protein, p58^{TFL} at P-bodies. *Mol. Cancer Res.* 2009 ;7(6):880-9. 査読あり

[学会発表] (計 3 件)

- ① 皆川健太郎、片山義雄、西川真一郎、山本克也、定明子、岡村篤夫、下山学、松井利充 P-bodyに存在する新規ジンクフィンガー蛋白p58^{TFL}はヒト白血病細胞株の増殖を阻害する 第71回日本血液学会学術総会 京都 2009/10/23
- ② K.Minagawa, Y. Katayama, S. Nishikawa, K. Yamamoto, A. Sada, A. Okamura, M. Shimoyama, T. Matsui A Novel Zinc Finger Protein, P58^{TFL}, expressed in T cells inhibits cell proliferation and promotes cell death at P-bodies Keystone Symposia Regulatory T Cells Keystone, Colorado U. S. A 2009/3/4
- ③ 皆川健太郎、西川真一郎、山本克也、川森有里子、川野宏樹、川野裕子、岡村篤夫、下山学、片山義雄、松井利充 t(2;6)(p12;q25)転座悪性リンパ腫により見出された新規がん抑制遺伝子の遺伝子診断法の確立 第70回日本血液学会総会 京都 2008/10/11

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：がん検出方法
発明者：皆川 健太郎、松井 利充
権利者：神戸大学
種類：特許
番号：特願2007-195698
出願年月日：2007年7月27日
国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/im3/rinsyo/ketueki/research2.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

皆川 健太郎 (MINAGAWA KENTARO)
神戸大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：80432574