

平成 22 年 5 月 17 日現在

研究種目：若手スタートアップ
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20890298
 研究課題名（和文）節外性 NK/T 細胞リンパ腫、鼻型の遺伝子プロファイルおよび発がん遺伝子の同定
 研究課題名（英文）The gene expression profile of extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type
 研究代表者
 加留部 謙之輔（Karube Kennosuke）
 愛知県がんセンター（研究所）遺伝子医療研究部 主任研究員
 研究者番号：20508577

研究成果の概要（和文）：T/NK 細胞腫瘍の分類において、自然免疫・獲得免疫の視点から網羅的遺伝子発現プロファイルを用いて解析した研究はない。われわれは、自然免疫に關与する正常 NK 細胞および 型 T 細胞およびそれらの腫瘍性細胞株の発現プロファイルから自然免疫に關与する特徴的遺伝子発現を抽出し、その他の T/NK 細胞腫瘍の分類への応用が可能かを検討した。その結果、NK 細胞リンパ腫および 型リンパ腫は、正常自然免疫関連 T/NK 細胞に近い性質を示し、その他の T 細胞性腫瘍と異なるグループを形成することがわかった。

研究成果の概要（英文）：There have not been the study attempting to classify T/NK cell tumor by using the comprehensive gene expression profiles and referring the dogma of innate immune system versus adaptive immune system. We picked up “innate immune associated genes” that were higher expressed in normal NK cell, normal gamma-delta T cell, NK cell lines and gamma-delta T cell lines than normal T cell and T cell lines. These genes could distinguish clinical samples of NK cell/gamma delta T cell tumors from clinical samples of other type T cell lymphomas. Furthermore, clustering analysis revealed NK/gamma-delta T cell lymphomas were regarded as same group with normal innate immune cells, and “innate immune signatures” still remained in these neoplastic samples.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：血液病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：悪性リンパ腫，NK 細胞リンパ腫，発現解析，ゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

T/NK 細胞腫瘍の分類においては、これまで T 細胞の各分化段階に応じた分類や、細胞傷害性分子などの特異的な蛋白の発現に重点を置いた分類などが報告されている。近年、稀である T 細胞リンパ腫の病態が徐々に解明され、*γ* 型 T 細胞リンパ腫とかなり異なる病像を示すことが明らかになった。このことから、自然免疫と獲得免疫の観点から T/NK 細胞腫瘍を見直す重要性が高まってきている。Granzyme M は NK 細胞、*γ* 型 T 細胞に高発現し、その他の helper/cytotoxic T cell には発現しない分子である。2003 年、Krenacs らは T/NK 細胞腫瘍でこの発現を検討し、NK 細胞腫瘍、*γ* 型 T 細胞腫瘍に Granzyme M が高発現していることを報告した。このように、自然免疫・獲得免疫の視点から T/NK 細胞を分類することは有効な手段と思われるが、いまだ網羅的遺伝子発現プロファイルの視点から解析した研究はない。

2. 研究の目的

1. の背景から、自然免疫に関与する正常 NK 細胞および *γ* 型 T 細胞およびそれらの腫瘍性細胞株の発現プロファイルから自然免疫に関与する特徴的遺伝子発現を抽出し、その他の T/NK 細胞腫瘍の分類への応用が可能かを検討した。

3. 研究の方法

NK/T 細胞リンパ腫細胞株に関しては 10 株 (HANK1、SNK6、SNT8、SNT13、SNT15、KHYG1、NKL、SNK10、NK-YS、NK-92) について、臨床検体は NK/T 細胞リンパ腫 11 例について、RNA を抽出し、Agilent 社の 44K オリゴ DNA マイクロアレイを使用して発現解析を行った。対象検体として CD4 および CD8 陽性末梢血 T リ

ンパ球、CD16+末梢血 NK 細胞、CD16-末梢血 NK 細胞さらにそれらを活性化したリンパ球の RNA を採取する。細胞分離においては、磁気ビーズを用いた分離法とフローサイトメーターを用いたソーティングを併用する。

4. 研究成果

(1)リンパ球サブセットの遺伝子発現プロファイル

自然免疫関連遺伝子発現プロファイルを解析するためにまず、健康人末梢血から採取した CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、NK 細胞および *γ* 型 T 細胞について検討した。Unsupervised clustering の結果、NK 細胞と *γ* 型 T 細胞は同一のクラスターを形成し、CD4/8 陽性 T 細胞とは異なるグループとなった (Figure1(a), (b))。

(2)NK/*γ* 型 T 細胞系腫瘍株と T 細胞腫瘍株の発現プロファイル

続いて、NK 細胞株 7 例、*γ* 型 T 細胞リンパ腫株 3 例、T 細胞腫瘍株 4 例の遺伝子発現プロファイルを解析、比較した。unsupervised clustering において NK 細胞株、*γ* 細胞株は同一クラスターとなり、T 細胞株と分かれた (Figure1(b))。判別分析においても、細胞株は T 細胞株よりも NK 細胞株に近い結果となった。GSEA にて、KEGG の gene set は、T 細胞株に比べ *γ* 細胞腫瘍株で高発現であったが、有意差はなかった (data not shown)。

(3)自然免疫関連遺伝子群の構築

1. の結果から、正常自然免疫関連細胞 (NK/*γ*) に高発現している遺伝子群を抽出した。NK/*γ* 群と CD4/8T 細胞群の発現を比較し、Student t-test にて FDR<25% および z score の差が 0.5 以上ある遺伝子を抽出したところ、800 probes (628 Genes) が抽出できた。引き続き、T 細胞株に対し NK/*γ* 細胞株で高発

現である遺伝子を同様の条件で絞ったところ 1701 probe (1451genes) が抽出できた。しかし、それらの条件を同時に満たすプローブは 95 プローブ(74 遺伝子)のみであった。しかしこれらの遺伝子は、正常の自然免疫/獲得免疫を分ける分化マーカーであり、かつ腫瘍化によっても発現が比較的保たれていると考えられた。これらを Innate immune signature(IIS)として、以降の解析に用いることにした。

(4) *Innate immune signature* は *ENKTL*、*gamma-delta TCL* の臨床検体において、高発現であり、他の *T-cell lymphoma* と区別できる。

IIS の実際の臨床検体における発現を見るため、*ENKTL*11 例、*ATLL*14 例、および *PTCL-U2* 例の発現解析を行った。まず、これらの症例を *unsupervised clustering* で解析したところ、*ENKTL* は一つのクラスターにならず、異なるグループに配属された。しかし、IIS74 遺伝子のみを用いてクラスタリングしたところ、*ENKTL* は一つのグループになり、*ATLL* および *PTCL-U* とは異なるグループになり、疾患単位ごとに分類することができた。

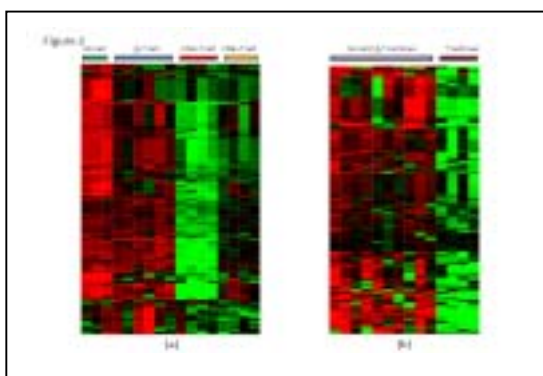
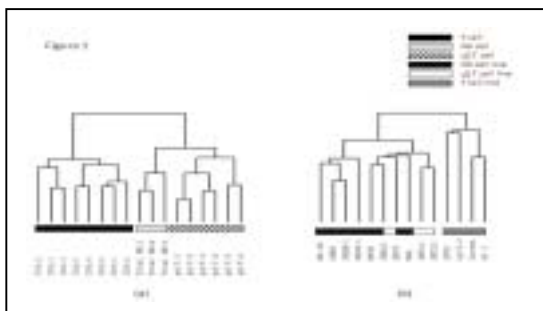


Figure 1

(a);正常 T/NK サブセットのクラスタリング解析。NK細胞はgd-T細胞に近い性質を示す。

(b):T/NK細胞株のクラスタリング解析。Gd-T細胞株は、T細胞株よりもNK細胞株に近い性質を示す。

Figure2

(a)(b):IIS74 遺伝子を用いた、クラスタリング解析。IIS は正常 NK 細胞、gd-T 細胞、NK 細胞株および gd-T 細胞株に高発現である。

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 1 0 件)

(すべて査読あり)

1. Nomura Y, Kimura H, Karube K (他 11 名,3 番目) Hepatocellular apoptosis associated with cytotoxic/natural killer-cell infiltration in chronic active EBV infection. *Pathol Int.*2009 ;59:438-42
2. Suzumiya J, Ohshima K, Tamura K,Karube K(他 6 名,4 番目) The International Prognostic Index predicts outcome in aggressive adult T cell leukemia/lymphoma: analysis of 126 patients from the International peripheral T-cell lymphoma project *Annal Oncol.* 2009;20:715-21
3. Koyama M, Hashimoto D, Aoyama K, Matsuoka K, Karube K (他 5 名,5 番目) Plasmacytoid dendritic cells prime alloreactive T cells to mediate graft-versus-host disease as antigen presenting cells. *Blood*

2009;113; 2088-95

(以上 2009 年)

4. Karube K, Ohshima K(他 12 名,1 番目)
BCL6 gene amplification/3q27 gain
is associated with unique
clinicopathological
characteristics among follicular
lymphoma without BCL2 gene
translocation. *Mod Pathol.* 2008;
21:973-8.
5. Karube K, Ohshima K(他 11 名,1 番目)
The relationship of FOXP3
expression and clinicopathological
characteristics in adult T cell
leukemia/lymphoma. *Mod Pathol.*
2008 ;21:617-25
6. Karube K, Ohshima K(他 7 名,1 番目)
Usefulness of flow cytometry for
differential diagnosis of
precursor and peripheral T-cell and
NK-cell lymphomas: analysis of 490
cases. *Pathol Int.* 2008;58:89-97
7. Nomura Y, Karube K, Ohshima K(他 7
名,2 番目) High-grade mature B-cell
lymphoma with Burkitt-like
morphology: results of a
clinicopathological study of 72
Japanese patients. *Cancer Sci.*
2008;99:246-52
8. Shide K, Shimoda HK, Kumano T,
Karube K, Shimoda K(他 13 名,4 番目)
Development of ET, primary
myelofibrosis and PV in mice
expressing JAK2 V617F. *Leukemia.*
2008;22:87-95. (以上 2008 年)

[学会発表](計 2 件)

1. Karube K et al. The gene expression

profile of NK/T cell neoplasm(ポスター), 第 68 回日本癌学会学術総会 (横浜)2009.10.2

2. 加留部 謙之輔 NK/T細胞性腫瘍の遺伝子発現プロファイル (ポスター), 第 67回日本癌学会学術総会(名古屋) 2008.10.28

[その他]

ホームページ等

<http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/400/420/421/421-04.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

加留部 謙之輔 (KARUBE KENNOSUKE)

愛知県がんセンター (研究所) 遺伝子医療

研究部 主任研究員

研究者番号 : 20508577

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :