

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790345

研究課題名（和文） 濾胞性リンパ腫の腫瘍化における濾胞樹状細胞の機能解析：新規治療法の開発を目指して

研究課題名（英文） Comprehensive analysis base on the interaction between follicular lymphoma cells and follicular dendritic cells

研究代表者

山本 浩平（YAMAMOTO KOUHEI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：50451927

研究成果の概要（和文）：濾胞性リンパ腫の腫瘍性増殖を成立させるメカニズムを明らかにするべく、レーザーマイクロダイセクションとショットガンプロテオミクスを用いた病変部特異的タンパク網羅解析を行った。同定しえた 2002 種のタンパクのうち、濾胞性リンパ腫に高頻度に発現する GRHPR および非腫瘍性濾胞に高頻度に発現する PACAP に着目し、転写レベルでの発現の亢進と組織切片上でのタンパクの発現を確認した。本研究により、濾胞性リンパ腫の腫瘍化にかかわるマーカー候補を策定しえた。今後これらの因子がどのように腫瘍化の制御に関わっているか、分子学的機能解析が望まれる。

研究成果の概要（英文）：

To elucidate mechanism of lymphomagenesis of follicular lymphoma, we examined comprehensive protein detection analysis using laser microdissection and shotgun proteomics. We detected approximately two thousand kinds of proteins, focused on GRHPR and PACAP, which detected frequently in follicular lymphoma, and non-neoplastic follicle respectively. These genes were over-expressed in transcriptional level and each protein expressions are affirmed in human histology sample. This study suggested these genes are the candidate marker in follicular lymphomagenesis, and further molecular biological and functional analyses are desirable.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：人体病理学

科研費の分科・細目：人体病理学、血液腫瘍学

キーワード：悪性リンパ腫 濾胞性リンパ腫 ショットガンプロテオミクス レーザーマイクロダイセクション フェージディスプレイ法

## 1. 研究開始当初の背景

濾胞性リンパ腫は、およそ 80% の症例で t(14;18) (Igh/bc12) 転座を染色体異常として有するが、この転座のみでは濾胞性リンパ腫を発症しないことがマウスを用いた実験系や臨床サンプル

の解析データから示唆されている。つまり、t(14;18) 転座を背景とした二次的な遺伝子異常やタンパクの発現異常が、濾胞性リンパ腫の発症や進展に寄与していることが予想される。過去における濾胞性リンパ腫の遺伝子発現異常の研究では、

マイクロアレイ法を用いた網羅的解析が行われているが、決定的な付加的遺伝子発現異常ははっきりしていない。また、タンパクレベルでは免疫組織化学的手法が多く用いられているが、網羅的発現検討はなされていない。

## 2. 研究の目的

濾胞性リンパ腫は濾胞樹状細胞の介在を必要とする特殊な組織構築を有している。これは腫瘍細胞が濾胞樹状細胞から腫瘍性増殖に関係する何らかのシグナルを得ることで、増殖アドバンテージを獲得し、腫瘍性増殖を成立させていることを強く示唆する。この性質に着目し、この相互関係に必要なタンパクを同定することで、濾胞性リンパ腫の腫瘍化のメカニズムを明らかにすることが期待される。

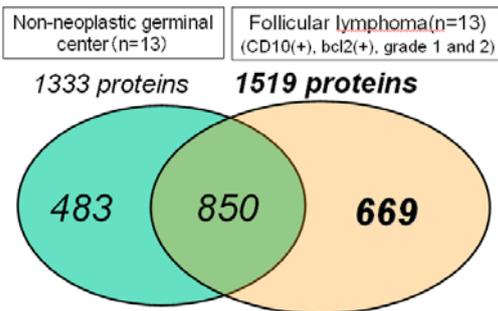
## 3. 研究の方法

上記目的を達成すべく、報告者はレーザーマイクロダイセクション法およびショットガンプロテオミクスを用いたタンパク同定を計画・実行した。具体的には組織切片から腫瘍性濾胞および非腫瘍性濾胞を選択的に抽出し、それぞれの濾胞内で発現する液体クロマトグラフおよび質量分析計を用いて発現タンパクを網羅的に同定した。そのうち、それぞれに高頻度に発現する候補タンパクについて、定量的 RT-PCR および免疫組織化学的手法を用いて、発現の確認を行った。なお、組織切片でのタンパク同定に関しては、ファージディスプレイ法も検討に用いた。

## 4. 研究成果

13 症例の濾胞性リンパ腫および扁桃組織を用い、レーザーマイクロダイセクションにてそれぞれの濾胞を切り取り、トリプシン消化、精製したサンプルをイオントラップ型 LC-MS/MS を用いて各ペプチドの質量を計測しデータ解析ソフト MASCOT を用いたタンパクの同定を行った。解析の結果、合計 2002 種のタンパクを同定し、濾胞性リンパ腫では 669 種、および非腫瘍性胚中心にて 483 種の特異的なタンパクが同定された。

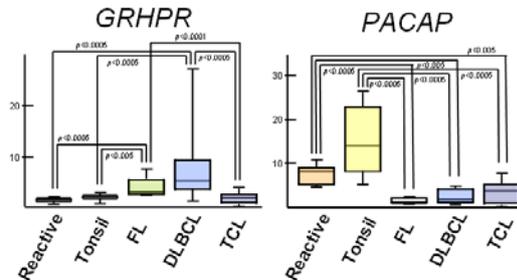
### Protein detection



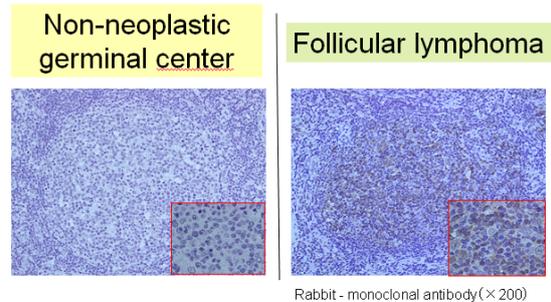
これらの候補タンパクから、濾胞性リンパ腫にて高頻度に同定される GRHPR および非腫瘍性胚中心で高頻度に同定される PACAP に着目し、組織内での発現の確認を行った。定量的 RT-PCR の解析では、GRHPR では濾胞性リンパ腫やびまん大細胞 B 細胞性リンパ腫において非腫瘍性リンパ組

織および T 細胞性リンパ腫に比べて発現が有意に高く、一方 PACAP では非腫瘍性リンパ組織において悪性リンパ腫検体に比して有意な発現亢進がみられた。免疫組織化学染色では GRHPR は腫瘍性濾胞に陽性所見を得た。

### mRNA Expression Analysis ~ Realtime RT-PCR ~

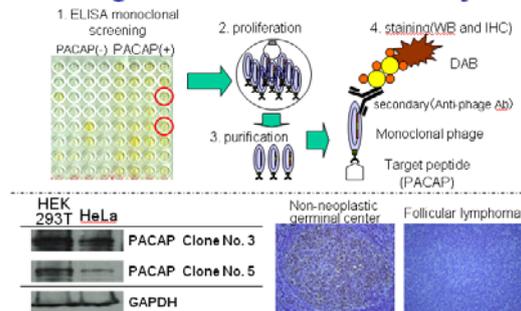


### Immunohistochemistry ~ GRHPR ~



PACAP については市販で手に入れられる適当な抗体がなかったため、ファージディスプレイ法を用いて、パラフィン切片およびウェスタンブロットティングでの発現を確認し得た。

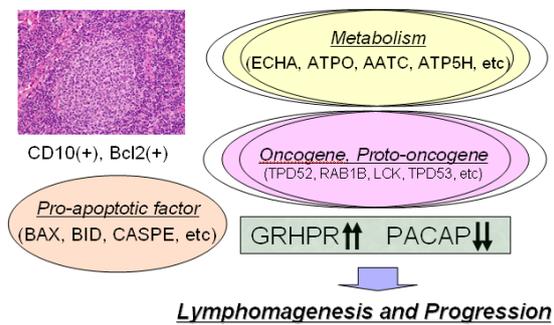
### "Phage Western Blotting" "Phage Immunohistochemistry"



今回の研究成果から、GRHPR および PACAP という濾胞性リンパ腫の病態に関与する 2 種のタンパクを同定した。PACAP は非腫瘍性胚中心に特異的に発現しており、このタンパク発現が抑制されることが腫瘍化の一端を担っている可能性が

ある。GRHPR については、あらたな腫瘍マーカーとなりうると同時に、若年性尿路結石症患者にてGRHPR遺伝子異常がみられることが知られている。この遺伝子異常ではGRHPRの酵素活性が失われることで、シュウ酸代謝経路が阻害され、その結果尿路結石をきたす。ただし、この遺伝子異常患者では尿路結石を発症する以外には致死的な疾患の発症は認められない。つまり、GRHPRの阻害により腫瘍性増殖が抑制されれば、これをターゲットとする分子治療が急速に発展する可能性がある。今後はこれらのタンパクと bcl2 遺伝子発現との関連性など、悪性リンパ腫細胞におけるこれらの分子生物学的機能解析が望まれる。

### 【Follicular lymphomagenesis】



## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計1件)

発表者: 山本浩平(代表)

発表表題: 濾胞性リンパ腫における濾胞選択的シ  
ョットガンプロテオミクス

学会名: 第50回リンパ網内系学会総会

発表年月日: 2010年6月18日

発表場所: 朱鷺メッセ(新潟)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 浩平 (YAMAMOTO KOUHEI)

東京医科歯科大学医歯学総合研究科包括病理学  
分野・助教

研究者番号: 50451927

研究者番号:

### (2) 研究協力者

花方 信孝 (HANAKATA NOBUTAKA)

独立行政法人 物質材料研究機構

中核機能部門 ナノテクノロジー融合ステー  
ション ステーション長

橋本 淳 (HASHIMOTO JUN)

東京医科歯科大学医学部医学科

竹村 太郎 (TAKEMURA TARO)

独立行政法人 物質材料研究機構

阿部 晋也 (ABE SHINYA)

東京医科歯科大学医歯学総合研究科包括病理学  
分野・助教

名桐 俊也 (NAGIRI TOSHIYA)

東京医科歯科大学医歯学総合研究科包括病理学  
分野