

機関番号：83901

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21790929

研究課題名 (和文) リンパ腫における TNFAIP3 の機能解析

研究課題名 (英文) Analysis of TNFAIP3 gene function in lymphomagenesis

研究代表者

本間 圭一郎 (HONMA KEIICHIRO)

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：20505945

研究成果の概要 (和文)：悪性リンパ腫は多様な性質を有しており、治療成績の向上には、均一な治療法ではなく、それぞれの分子基盤に基づいた治療法が必要となる。我々の研究成果から、悪性リンパ腫のうち(1) NF- $\kappa$ B の活性化している一部のリンパ腫に高頻度に TNFAIP3/A20 の遺伝子異常を認めた。(2) TNFAIP3 の遺伝子異常は NF- $\kappa$ B の異常を引き起こす、がん抑制遺伝子である。(3) TNFAIP3 異常を有するリンパ腫は、NF- $\kappa$ B を標的とした治療が有効な可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Malignant lymphoma possess histologic and genetic diversity, hence understanding the mechanisms of each cases is important for improving their prognosis. In our present study, we analyzed several subsets of non-Hodgkin lymphomas and found that: (1) *TNFAIP3/A20* gene is frequently altered in B-cell lymphoma with NF- $\kappa$ B activation. (2) TNFAIP3 may be involved in lymphomagenesis through inhibiting NF- $\kappa$ B. (3) Our study provides a novel insight into molecular mechanisms leading to lymphoma and that specific targeting of NF- $\kappa$ B pathways may be advantageous for treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：非ホジキンリンパ腫、NF- $\kappa$ B、TNFAIP3

## 1. 研究開始当初の背景

多くのリンパ腫において、腫瘍化機構として NF- $\kappa$ B 活性化が重要な役割を果たしていると考えられている。殊にマルトリンパ腫では、NF- $\kappa$ B 恒常的活性化に関わる遺伝子異常として、*MALT1* 遺伝子転座が知られており、リンパ腫形成に関与すると考えられている。近年マイクロアレイ技術の進歩により、びま

ん性大細胞型 B 細胞リンパ腫は、胚中心 B 細胞型と NF- $\kappa$ B の恒常的活性化が認められる活性化 B 細胞型に大別されることが明らかにされた。活性化 B 細胞型は胚中心型 B 細胞型に比べ、従来の化学療法に対する反応が悪く、難治性であり、リンパ腫形成だけでなく、治療抵抗性にも NF- $\kappa$ B が深く関与していることが示唆される。しかし、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫では、NF- $\kappa$ B 活性

化に関わる遺伝子異常の知見に乏しく、NF- $\kappa$ B 活性化に関わる分子基盤はほとんど解明されていない。我々は、既にアレイ CGH 法による、マルトリンパ腫のゲノム異常解析を行い、*MALT1* 遺伝子転座を有さないマルトリンパ腫において、6 番染色体長腕の欠失が高頻度に認められ、その標的遺伝子が *TNFAIP3/A20* であることを明らかにし、論文報告 (Kim et al. *Genes Chromosomes Cancer* 2007, Honma et al. *Genes Chromosomes Cancer* 2008) した。*TNFAIP3/A20* は NF- $\kappa$ B の抑制因子として機能することが知られており、その欠失は *MALT1* 遺伝子転座同様、NF- $\kappa$ B 活性化に寄与すると考えられた。

## 2. 研究の目的

マルトリンパ腫以外の非ホジキンリンパ腫、についても NF- $\kappa$ B 活性化のメカニズムとしての *TNFAIP3* の役割について明らかにすることを目的とする。具体的には、(1) リンパ腫各組織型における *TNFAIP3* のゲノム欠失、遺伝子変異、プロモーターのメチル化を検討する。(2) *TNFAIP3* の異常を有するリンパ腫細胞株における腫瘍形成・維持に関わる機能解析 (3) EB ウイルス感染 B 細胞に対し、siRNA による *TNFAIP3* のノックダウンを行い、造腫瘍能を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) リンパ腫各組織型における *TNFAIP3* のゲノム欠失、遺伝子変異、プロモーターのメチル化の検討

過去に我々の研究室で解析したアレイ CGH による非ホジキンリンパ腫のゲノムプロファイル、*TNFAIP3* を含む領域について各組織型ごとの *TNFAIP3* 欠失の頻度を再検討した。そこから明らかになる、*TNFAIP3* 欠失が高頻度の組織系型については、direct sequence による遺伝子変異の検討、Methylation specific PCR (MSP) によるプロモーター領域のメチル化および発現抑制との相関について検討した。

### (2) *TNFAIP3* の異常を有するリンパ腫細胞株における腫瘍形成・維持に関わる機能解析

*TNFAIP3* の欠失を有するリンパ腫細胞株 (Jeko-1, OCI-LY8) と、*TNFAIP3* の異常を有さないリンパ腫細胞株 (Raji) に対し、レンチウイルスベクターを用いて *TNFAIP3* を遺伝子導入した。*TNFAIP3* 強制発現による NF- $\kappa$ B 活性の変化をレポーターアッセイによって評価した。またアポトーシスの評価を Annexin V

によって行った。

### (3) EB ウイルス感染 B 細胞に対する、*TNFAIP3* ノックダウンによる造腫瘍能の検討

EB ウイルス不死化 B 細胞株 (UH3, CB33) に対し、レンチウイルス siRNA 発現ベクターによる *TNFAIP3* ノックダウンを行い、ノックダウン効率をウエスタンブロットにより確認した。*TNFAIP3* ノックダウンによる NF- $\kappa$ B 活性の変化をレポーターアッセイ、p50, p52 の DNA 結合能、代表的 NF- $\kappa$ B 標的遺伝子 (BCL-xL, CYCND2, FLIP, IRF4) の発現を比較した。

## 4. 研究成果

### (1) リンパ腫各組織型における *TNFAIP3* のゲノム欠失、遺伝子変異、プロモーターのメチル化の検討

アレイ CGH による非ホジキンリンパ腫各組織型における、*TNFAIP3* を含む 6q23.3 領域の欠失の頻度を以下の表 1. に示す。

表 1.

Table 1. Frequency of A20 deletion in non-Hodgkin lymphomas

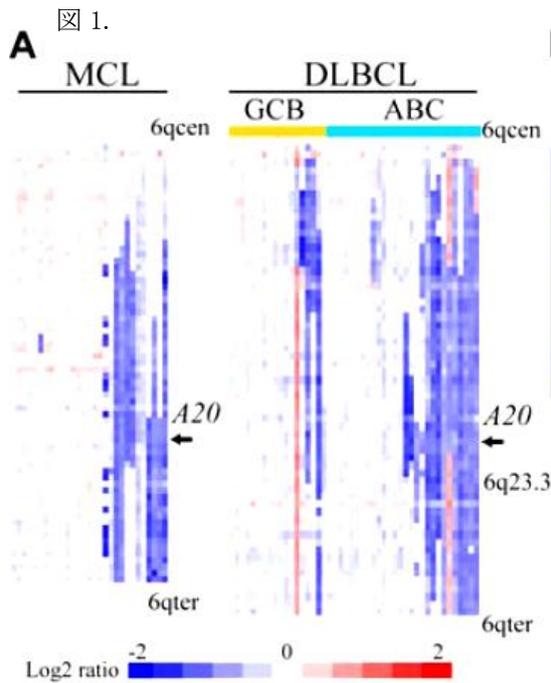
Histologic subgroup	n (%)
<b>Mantle cell lymphoma</b>	9/29 (31)
Blastoid variant	0/2 (0)
Pleomorphic variant	1/3 (33.3)
<b>MALT lymphoma</b>	11/64 (17.2)
Ocular adnexa	9/24 (37.5)
Lung	0/11 (0)
Stomach	2/29 (6.9)
<b>DLBCL</b>	39/102 (38)
GCB type	4/18 (22.2)
ABC type	14/28 (50)
<b>Follicular lymphoma</b>	6/23 (26)
Grade 1	1/7 (14.2)
Grade 2	4/14 (28.5)
Grade 3A	1/2 (50)
Burkitt lymphoma	2/19 (10.5)
<b>NK-cell lymphoma</b>	5/27 (18.5)
Aggressive NK-cell leukemia	2/10 (20)
ENKL	3/17 (17.6)
<b>ATLL</b>	7/68 (10.3)
Acute type	0/19 (0)
Lymphoma type	7/49 (14.3)
PTCL-u	5/51 (9.8)
Total	84/383 (21.9)

ENKL indicates extranodal NK-cell lymphoma.

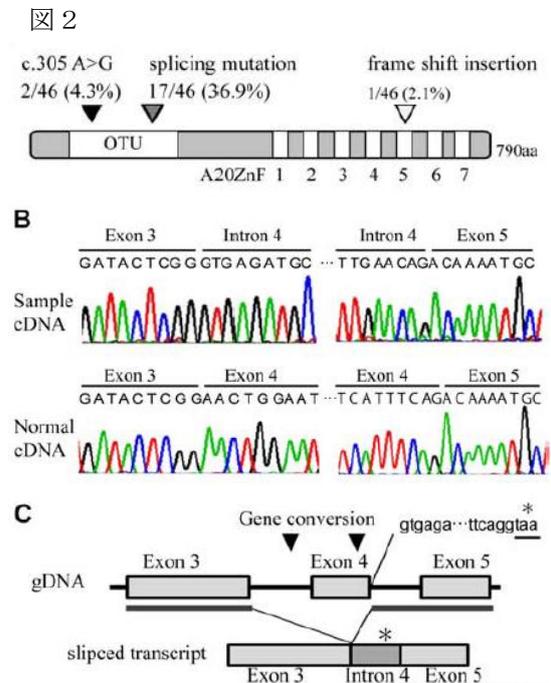
非ホジキンリンパ腫各組織型のうち、*TNFAIP3* (A20) を含む 6q23.3 領域欠失の多いものはびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) 38%、マンツル細胞リンパ腫 (MCL) 31% であった。DLBCL の中でも、活性化 B 細胞 (ABC) 型 DLBCL は 50% と特に高頻度に欠失を認めた。

DLBCL と MCL の詳細な六番染色体長腕のゲノムプロファイルを図 1 に示す。DLBCL, MCL とともに最少共通欠失領域に 6q23.3 が位置して

おり、この領域が欠失の責任領域になっていると考えられた。



TNFAIP3 欠失が高頻度に認められた ABC DLBCL 28 例と MCL 18 例あわせて 46 例について遺伝子変異について検討した。変異部位について以下の図 2 に示す。



変異部位としては OUT ドメイン内にある、脱ユビキチン酵素活性中心 C103 付近であり、とりわけこの部位のスプライシング異常が高頻度であった。このスプライシング異常は、エクソン 4 をスキップし、代わりにイントロ

ン 4 と置き換わっていた。このスプライシング異常によって、OUT ドメイン内でストップコドン (taa) が入り truncate product となる機能喪失型変異であると考えられた。ABC DLBCL, MCL それぞれの遺伝子変異の頻度を表 2. に示す。

表 2.

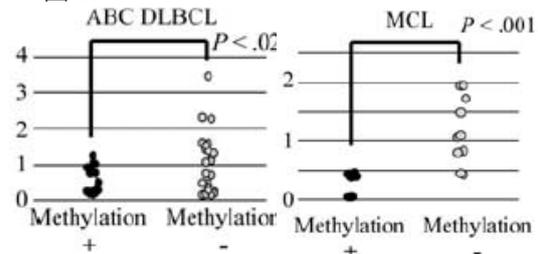
Table 2. Features of A20 inactivation in ABC DLBCL and MCL

	ABC DLBCL	MCL
<b>A20 mutation, n (%)</b>		
Total	15/28 (53.5)	3/18 (16.6)
With A20 deletion	8/14 (57.1)	1/7 (14.2)
Without A20 deletion	7/14 (50)	2/11 (18.1)
Promoter methylation, total, n (%)	10/24 (41.6)	3/8 (37.5)

ABC DLBCL, MCL の TNFAIP3 (A20) プロモーターのメチル化と発現抑制について MSP で検討した。(表 2)

TNFAIP3 (A20) の発現をリアルタイム PCR で解析し、プロモーターメチル化の有無による発現の差を検討した。(図 3)

図 3.



ABC DLBCL, MCL ともにプロモーターメチル化による発現の抑制が認められた。

まとめ：びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) とマントル細胞リンパ腫 (MCL) に、TNFAIP3 の存在するゲノム領域の欠失、TNFAIP3 の機能喪失型遺伝子変異、プロモーターメチル化による発現抑制が、高頻度に認められた。DLBCL のなかでも活性化 B 細胞型 (ABC type) に特に高頻度に TNFAIP3 の異常が認められた。これらの腫瘍で TNFAIP3 ががん抑制遺伝子として機能している可能性が示唆された。

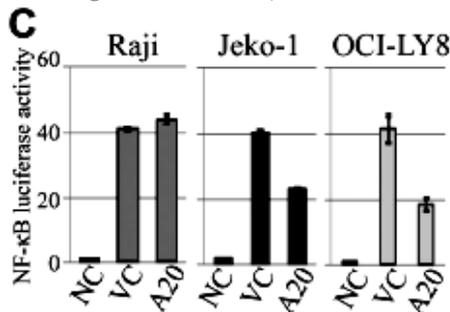
(2) TNFAIP3 の異常を有するリンパ腫細胞株における腫瘍形成・維持に関わる機能解析

TNFAIP3 (A20) の欠失を有するリンパ腫細胞株 (Jeko-1, OCI-LY8)、TNFAIP3 欠失のない細胞株 (Raji) に対しレンチウイルスを用いて TNFAIP3 を導入した。

TNFAIP3 導入によって、TNFAIP3 欠失を有するリンパ腫細胞株では、NF- $\kappa$ B の抑制を認めた。一方 TNFAIP3 欠失を有さない Raji では TNFAIP3 導入による NF- $\kappa$ B 活性の変化を認めなかった。(図 4)

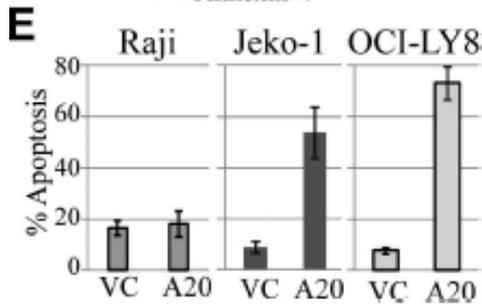
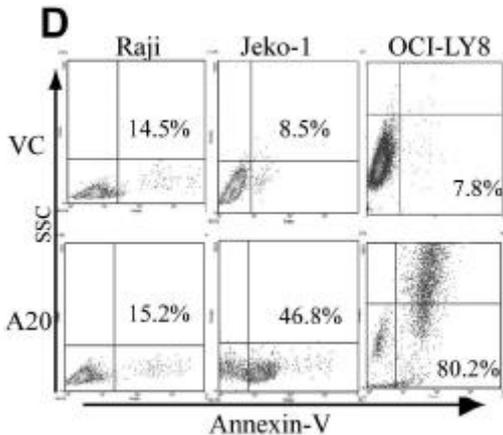
図 4.

N. C: negative control, VC: vector control



TNFAIP3 導入によるアポトーシスへの影響を Annexin-V を用いて検討した。(図 5)

図 5.



TNFAIP3 導入により NF-κB 活性の抑制を認めた Jeko-1, OCI-LY8 はアポトーシスの亢進を認めた。一方遺伝子導入により NF-κB 活性に変化がなかった Raji は TNFAIP3 導入によるアポトーシスに変化を認めなかった。

(3) EB ウイルス感染 B 細胞に対する、TNFAIP3 ノックダウンによる造腫瘍能の検討

EB ウイルス不死化 B 細胞株 (UH3, CB33) にレンチウイルスを用いて TNFAIP3 に対する shRNA を導入し、ノックダウン実験を行った。

図 6.

ノックダウン効率は、右図のように約 70~80%であった。

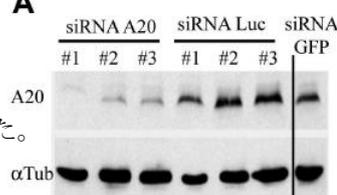
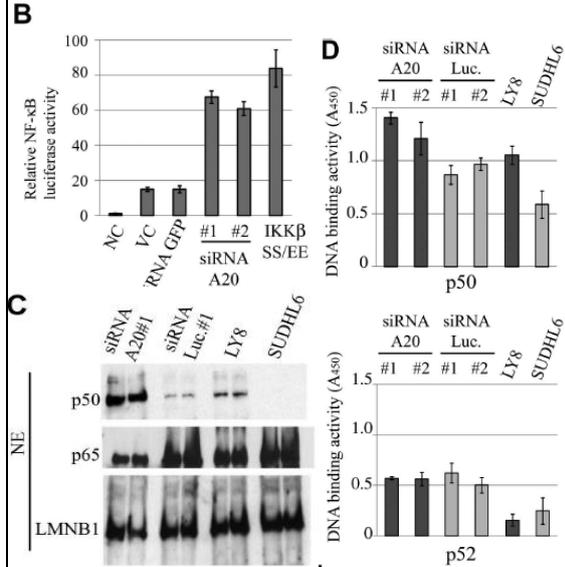
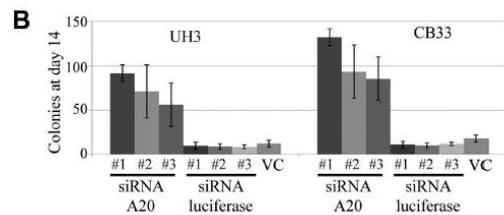
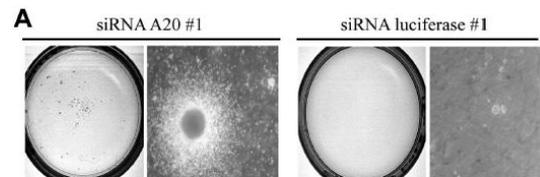
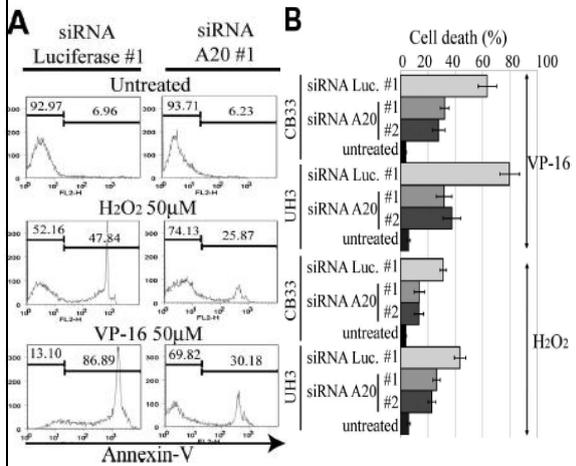


図 7.



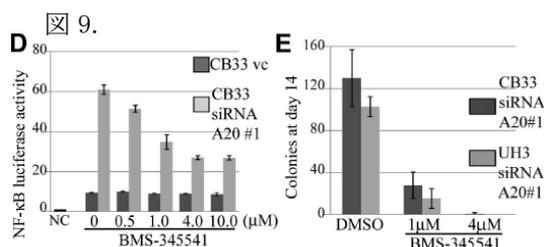
TNFAIP3 のノックダウンによって NF-κB の活性化を認めた。この活性化は p50 の核移行、DNA 結合能の亢進を認めた一方、p52 の活性には変化を認めなかったことから、主に classical pathway の活性化によるものと考えられた。(図 7)

図 8.



次に、TNFAIP3 ノックダウンによる細胞増殖、生存能への影響について検討した。TNFAIP3 ノックダウンにより、EB ウイルス不死化 B 細胞株は抗がん剤 (VP-16) や活性酸素 (H2O2) に対するアポトーシス耐性を認めた。また、コロニー形成能の亢進も認められた。(図 8.)

TNFAIP3 ノックダウンによるアポトーシス耐性能やコロニー形成能の亢進が NF-kB 活性化を介したものであることを示すため、NF-kB 阻害剤を使用してコロニー形成能を検討した。



NF-kB 阻害剤 (BMS-345541) により、コロニー形成能は低下した。(図 9)

まとめ：TNFAIP3 は NF-kB 活性を制御することにより、細胞生存や増殖能に影響を及ぼしている。TNFAIP3 を欠失した細胞は、NF-kB 活性化シグナルに生存を依存している。阻害剤実験の結果から TNFAIP3 の異常を有するリンパ腫は NF-kB を分子標的とした治療が有効な可能性が示唆された。

本研究成果は、多様な集合である DLBCL をマイクロアレイの結果をもとに分類 (GCB type, ABC type) していく試みの中で、ABC type を規定する NF-kB 恒常的活性化の分子基盤を解明する一助となる知見である。この知見は、ほぼ同時期に我々を含む複数のグループが世界で初めて明らかにした。通常の治療には難治性を示す ABC DLBCL や MCL の分子標的療法への道を開くものと考えられる。

今後の展望として、TNFAIP3 のノックアウトマウスは B リンパ球のアポトーシス耐性、増加は認められるが、リンパ腫発症の増加は認められない。このことは、TNFAIP3 と協調的に機能する他のがん関連遺伝子が、リンパ腫形成には必須であることが示唆される。TNFAIP3 と協調的にリンパ腫形成に寄与する遺伝子、パスウェイを明らかにすることは、リンパ腫形成のさらなる分子基盤の解明から、NF-kB 阻害剤単独では十分な効果の得られないリンパ腫治療のブレイクスルーとなる可能性を持っており、重要であると考えられた。

## 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 2 件)

① Seto, M., Honma, K., Nakagawa, M. Diversity of genome profiles in malignant lymphoma. *Cancer Sci.*, 101: 573-578, 2010. 査読有り。

② Honma, K., Tsuzuki, S., Nakagawa, M., et al. (他 4 名, 1 番目) TNFAIP3/A20 functions as a novel tumor suppressor gene in several subtypes of non-Hodgkin lymphomas. *Blood*, 114: 2467-2475, 2009. 査読有り。

[学会発表] (計 2 件)

① 本間 圭一郎、A20 inactivation is central role of aberrant NF-kB signaling in Non-Hodgkin lymphoma. 第 69 回日本癌学会学術総会、International Session 2010.9.22、大阪

② 本間 圭一郎、Significant role of TNFAIP3/A20 discovered by genome wide array CGH in B-cell lymphoma. 第 72 回日本血液学会・日本臨床血液学会合同総会 ASH 合同シンポジウム 2010.9.24、横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

本間 圭一郎 (HONMA KEIICHIRO)  
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：20505945

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：