

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22790363

研究課題名（和文）

SKP2 遺伝子の DLBCL 治療抵抗機構の解明

研究課題名（英文）

Mechanism of the treatment resistance in DLBCL according to Skp2 expression.

研究代表者

関 律子 ( R ITSUKO SEKI )

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：50446077

研究成果の概要（和文）：

Skp2蛋白発現を確認した凍結組織を用いて、マイクロアレイ解析を行ない、クラスタリングを行った。Lymphochip limma解析で有意差を認める遺伝子を抽出。さらに、IPA(Ingenuity pathway analysis)より、正の相関を認めた候補遺伝子群として細胞周期、MAPK、JAK/Stat、Myc経路が関与していた。Skp2遺伝子とMTA3遺伝子が正相関をしめしB細胞分化にも重要である事を初めて明らかにした。さらに候補遺伝子からさらに20遺伝子を抽出し、Real time PCR法にて解析した結果、Skp2高発現群は、Skp2低発現群に比してMyc、MTA3、PRDM1が有意に高い事が明らかとなった。Skp2過剰発現は主にp27などの細胞周期抑制分子を分解するだけでなく、細胞分化、増殖に関与している事が明らかとなった。Myc遺伝子FISH解析を行うと増幅所見をSkp2高発現に多く認め、Skp2によるMyc遺伝子への関与が明らかとなった。その他のMyc関連遺伝子増強も確認できた。In vitroでリンパ腫細胞株を用いたSkp2遺伝子導入実験を行い、この系で得られた細胞株においては、阻害剤効果を確認し、同様のコンストラクトを用いてマウスでリンパ腫細胞の悪性化獲得及び阻害剤を用いた治療効果を明らかにし、治療への応用への検討を行う。

研究成果の概要（英文）：

Using the frozen tissues which confirmed Skp2 protein expression, I performed microarray analysis and went to the cluster ring. Skp2 identified that it was an independent prognostic factor as (GC, ABC type) by the cell origin by array analysis than Lymphochip information. Furthermore, I extract a gene in acknowledgment of significant difference by limma analysis. Furthermore, IPA(Ingenuity pathway analysis) showed clearly the network composed of cell cycle regulators. Several genes related to cyclins and cell cycle regulation and to the MAPK, WNT, and Myc mediated apoptosis signaling pathways were altered in DLBCLs when compared with Skp2 levels. Skp2 gene and MTA3 gene showed a positive correlation and made clear that it was important to B-cell differentiation for the first time. Furthermore, as a result of extracting 20 genes from a candidate gene more, and having analyzed it by the Real time PCR method, it became clear that both Myc and MTA3 were significantly higher than Skp2 low expression group in the Skp2 high expression group. It was revealed that not only I broke down restraint molecules mainly in cell cycles such as p27, but also the Skp2 high expression participated in cell differentiation, and proliferation. I was able to confirm other Myc-related gene reinforcement, too.

Additional biochemical and functional in vitro studies are needed to determine whether several genes regulate the expression of the Skp2 oncogene .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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

キーワード：細胞・組織，遺伝子，蛋白質

### 1. 研究開始当初の背景

1) びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (DLBCL) は、日本で最も多いリンパ腫で、全リンパ腫の 33% を占める。また、DLBCL は、非常に heterogenous な疾患であり、腫瘍細胞の生物学的特性に基づく、様々な予後因子が多数報告されている。

2) 私ともは、癌を含めたさまざまな疾患が細胞増殖制御因子の蛋白分解システムの異常により引き起こされていることに注目し研究を進めてきた。DLBCL において、Skp2 強発現群は、Skp2 弱発現群に比較し、有意に予後不良であるという知見を示し、DLBCL の IPI とは独立した予後予測因子の一つになることを明らかにした。DLBCL の約 30% が Skp2 強発現であり、治療の標的となりうる事が十分に予想される。

3) DNA microarray による gene expression の検討により、胚中心 B 細胞型 (GC type)、活性化 B 細胞型 (ABC type) に亜分類され、GC type の方が有意に予後良好であることが報告された。また、CARD11, などいくつかの target gene 発現群と予後相関が DLBCL で報告されたが、Skp2 発現有無別での検討はされ

ていない。さらに、Skp2 発現有無別に検討した DNA マイクロアレイのデータの中から、Skp2 遺伝子と相関する候補遺伝子を抽出し、治療抵抗機構を解明したい。

### 2. 研究の目的

私ともは、多くの癌において過剰発現が認められている細胞周期関連蛋白 Skp2 について着目し、DLBCL において、Skp2 強発現群は、有意に予後不良であるという知見を示し、さらに、その有用性は、リツキササン導入後も予後不良因子となることを報告している。本研究では、Skp2 発現有無別での検討はなされていない DNA microarray による gene expression の検討により target gene を解明し、基礎的検討を行い、治療への可能性を総括していく。

### 3. 研究の方法

1) DNA マイクロアレイ法を用いて、Skp2 発現の治療抵抗機構解明を目的とする。中央診断された DLBCL 症例における CD10, MUM1, Bcl-6 などの蛋白の発現による Cell Origin とマイクロアレイを用いた層別化との相関を検討する。Skp2 遺伝子と相関する標的遺伝子を抽出

する。

- 2) Skp2・ならびに標的遺伝子の B 細胞性腫瘍での役割の検討。細胞周期、ならびにアポトーシスの関与をヒト B 細胞腫瘍細胞株系で検討する。
- 3) 転写制御されている標的遺伝子に対して阻害剤の効果を検討し、治療薬としての可能性を検討する。

#### 4. 研究成果

- 1) Skp2 蛋白発現を確認した凍結組織から totalRNA を抽出し、これを基に cRNA を増幅し、Human WG-6 Beadarray (Illumina) を用いてマイクロアレイ解析を行なった。Skp2 発現別にクラスタリング可能であった。さらに Lymphochip によるクラスタリング図に含まれる 100 遺伝子のうち、アノテーション情報か Illumina と対応の取れる 77 遺伝子のプローブについてクラスタリング図を作成。Skp2 は細胞起源による (GC, ABC type) とは独立した予後因子である事をアレイ解析で確認した。
- 2) limma プログラムを用いてアレイ解析を行い、 $P < 0.01$  で有意差が認められた遺伝子を抽出し、得られた遺伝子リストを IPA (Ingenuity pathway analysis) で解析した。正の相関を認めた候補遺伝子群として細胞周期、MAPK、WNT、Myc 関連のアポトーシス等が含まれていた。
- 3) 候補遺伝子からさらに 20 遺伝子を抽出し、Real time PCR 法にて解析した。Skp2 高発現群は、Skp2 低発現群に比して MTA3, Myc が有意に高い事が明らかとなった。Skp2 過剰発現は主に p27 などの細胞周期抑制分子を分解するだけでなく、細胞分化、増殖に関与している事が明らかとなった。臨床検体において蛋白発現を免疫組織化学染色で確認した。
- 4) Myc 染色体転座については、Myc dual color breakpoint probe (Dako No. Y5410) を用いた

FISH法を行った。Myc 遺伝子 FISH 解析を行うと増幅所見を Skp2 高発現に多く認め、Skp2 による Myc 遺伝子への関与が明らかとなった。その他の Myc 関連遺伝子増強も確認している。

5) In vitro でリンパ腫細胞株を用いた各種の人為的シグナル導入実験を行い確認した。またこの系で得られた細胞株においては、阻害剤効果も確認し既存の抗腫瘍薬との併用効果をさらに検討中である。

6) 同様のコンストラクトを用いてマウスでリンパ腫細胞の悪性化獲得及び阻害剤を用いた治療効果を明らかにし、治療への応用への検討を行う。

#### 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 9 件)

- 1) Imamura R, Mouri F, Nomura K et al (8 番目、他 13 名) Successful treatment of small cell variant anaplastic large cell lymphoma with allogeneic peripheral blood stem cell transplantation, and review of the literature. *Int J Hematol* 97(1):139-43 2013. 査読有  
doi: 10.1007/s12185-012-1242-3.
- 2) Castillo JJ, Sinclair N, Beltrán BE et al. (8 番目、他 12 名) Similar outcomes in Asian and Western patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Leuk Res.* 37(4):386-91. 2013. 査読有  
doi: 10.1016/j.leukres.2013.01.002.
- 3) Seki R, Yamagishi S, Matsui T, et al (1 番目、他 8 名) Pigment epithelium-derived factor (PEDF) inhibits survival and proliferation of VEGF-exposed multiple myeloma cells

- through its anti-oxidative properties. Biochem Biophys Res Commun. 431(4):693-697. 2013. 査読有  
doi: 10.1016/j.bbrc.2013.01.057.
- 4) Yuka Takata, Taisuke Kanaji, Masaaki Moroi, Ritsuko Seki, et al (4 番目、他 9 名) Platelets with a W127X mutation in GPIX express sufficient residual amounts of GPIb $\alpha$  to support adhesion to von Willebrand factor and collagen. Int J Hematol 96(6):733-742 2012. 査読有  
doi: 10.1007/s12185-012-1216-5.
- 5) Castillo JJ, Beltran BE, Song MK et al (7 番目、他 12 名) The Hans algorithm is not prognostic in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. LeukRes. 36(4):413-417. 2012 査読有  
doi: 10.1016/j.leukres.2011.12.012.
- 6) Takayuki Nakamura, Eijiro Oku, Kei Nomura, et al (6 番目、他 16 名) Unrelated cord blood transplantation for patients with adult T-cell leukemia/lymphoma: experience at a single institute. Int J Hematol. 2012, 96:657-663. 査読有  
doi: 10.1007/s12185-012-1177-8.
- 7) 関律子、大島孝一、岡村孝. びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫における Skp2/p27kip 蛋白の予後因子としての有用性. 臨床血液. 2010, 51:1741-1743. 査読有  
[https://www.jstage.jst.go.jp/FF01S040Init?sourceurl=%2Farticle%2Finketsu%2F51%2F12%2F51\\_12\\_1741%2F\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/FF01S040Init?sourceurl=%2Farticle%2Finketsu%2F51%2F12%2F51_12_1741%2F_pdf)
- 8) Seki R, Ohshima T, Nagafuji K, et al. (1 番目、他 13 名) Rituximab in

- combination with CHOP chemotherapy for the treatment of diffuse large B-cell lymphoma in Japan: A retrospective analysis of 1,057 cases from Kyushu Lymphoma Study Group. Int J Hematol. 2010, 91:258-266. 査読有  
doi: 10.1007/s12185-009-0475-2.
- 9) Ritsuko Seki, Koichi Ohshima, Tomoaki Fujisaki, et al. (1 番目、他 13 名) Prognostic significance of S-phase kinase-associated protein 2 and p27<sup>kip1</sup> in patients with diffuse large B-cell lymphoma: effects of rituximab. Annals of Oncology, 21:833-841, 2010 査読有  
doi: 10.1093/annonc/mdp481.

[学会発表] (計 2 件)

- 1) DNA Microarray Analysis in DLBCL Dependent on Skp2 Expression  
Ritsuko Seki, Fumiko Arakawa, Kaori Yasuda, Atushi Doi, Toshihiro Miyamoto, Koichi Akashi, Koichi Ohshima, and Takashi Okamura 53rd American Society of Hematology (ASH) 2011/12/10 San Diego Convention Center, USA
- 2) DLBCL における Skp2 発現に関する cDNA マイクロアレイ解析. 関律子、荒川 文子、長藤 宏司ら第 51 回日本リンパ網内系学会総会, 2011 年 6 月 30 日, 福岡国際会議場 (福岡県)

[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  
<http://www.kurume-u-blood.net/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

関 律子 (SEKI RITSUKO )  
久留米大学・医学部・助教  
研究者番号：50446077

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：