

## 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24年4月26日現在

機関番号：83901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23659194

研究課題名（和文）正常NK細胞増幅法を用いたNK腫瘍に関わるゲノム異常の新たな機能的検討法の確立

研究課題名（英文）Establishment of functional analysis for genes involved in NK cell tumors using normal NK cell expansion method

研究代表者

瀬戸 加大 (SETO MASAO)

愛知県がんセンター(研究所)・遺伝子医療研究部・部長

研究者番号：80154665

研究成果の概要（和文）：

NK細胞腫瘍検体をアレイCGH解析し、最も高頻度なゲノム異常を示した6q21欠失領域（36%:39例中14例）に存在するがん抑制候補遺伝子を遺伝子発現解析と相関させ、増殖における機能検討することにより、PRDM1とFOXO3ががん抑制遺伝子であることを明らかにした。また、末梢血単核球を放射線照射後凍結保存したK562-mb15-41BBLフィーダ細胞を用いても正常NK細胞が100万倍程度増幅できた。本実験系はNK腫瘍で腫瘍化能を担う遺伝子の機能的解析のために有用である。

研究成果の概要（英文）：

In an attempt to clarify molecular mechanisms of NK cell tumor development, oligo-array CGH and expression profiling were applied. Oligo-array CGH identified two distinct minimal common deleted regions at 6q21 where the most frequent deletion was observed at the percentage of 36% (14 of 39 cases). The genes identified were PRDM1 and FOXO3 which were functionally approved by inducing expression system. Normal NK cells were known to be expanded by culturing peripheral blood mononuclear cells (PBMC) with irradiated K562-mb15-41BBL cells to one million order of magnitude. We could amplified normal NK cells to the same order of magnitude with feeder cells recovered from frozen status. This system will be useful for the functional analysis of genes involved in NK cell tumor development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
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：血液

## 1. 研究開始当初の背景

リンパ造血器腫瘍に認められる染色体転座やゲノムコピー数異常領域責任遺伝子単独では腫瘍化しないことが明らかとなっており、これらのゲノム異常がリンパ造血器細胞の分化増殖にどのような役割を果たすのかという研究は急務となっている。昨年度の挑戦的萌芽的研究で、フィーダ細胞と IL7 を用いるマウス正常 B 細胞長期培養系を利用して、悪性リンパ腫に高頻度に認められる転座関連遺伝子 CCND1, BCL2, MYC の 3 つを同時に導入すると、フィーダ細胞と IL7 に非依存性に増殖するようになり、マウス個体を死に至らしめるという実験系を確立できた (図 1)。さらに、この 3 つの遺伝子のうち 1 つを欠いた細胞に細胞株の発現 cDNA ライブラリーを感染させ、増殖してくる細胞の導入遺伝子を確認したところ、CCND1 に代わりうる遺伝子として活性化 K-RAS と CCND3 を独立した実験で繰り返し単離することができた。しかし、NK 細胞性腫瘍については限られた細胞株が存在するだけであり、腫瘍化機能を検討する実験系が確立されていない。

## 2. 研究の目的

NK 腫瘍に関連する癌関連遺伝子を見いだすとともに、正常 NK 細胞を用いて、遺伝子導入し、機能を検討できる実験系を作成することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1)NK/T 細胞性リンパ腫検体を対象に、オリゴアレイ CGH(アジレント：44000 プローブ)を行い、頻度の高いゲノム異常領域を検

討し、候補遺伝子を見いだす。また、遺伝子発現様式も検討することで、責任遺伝子を明らかにする。

(2) 正常 NK 細胞に遺伝子導入を可能とするため、正常 NK 細胞をフィーダ細胞と IL2 存在下で増幅する系を確立する。

## 4. 研究成果

### (1) ゲノム異常領域の探索

NK/T 細胞性リンパ腫の臨床検体 32 例と細胞株 7 例について、オリゴアレイ CGH を行った。6q21 は最も loss の頻度が高く (図 1)、

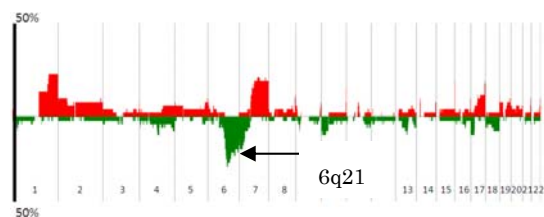


図 1：ゲノム異常の頻度

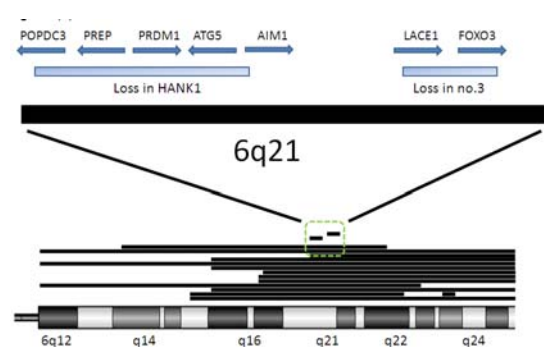


図 2：6q21 領域の欠失領域

POPDC3、PREP、PRDM1、ATG5、AIM1 を含む領域および LACE1、FOXO3 を含む領域が 39 例中 14 例 (36%) に認められ、most frequently deleted minimal common region (MCR) と考えられた (図 2)。

上記 7 遺伝子に加え、この領域近傍にある

6q 上に存在する強力ながん抑制遺伝子である A20 および HACE1 を加え、がん抑制遺伝子としての候補遺伝子とした。次に、NK 細胞性腫瘍におけるそれらの遺伝子発現を正常 NK 細胞をコントロールとして解析した。その結果、AIM1 および POPDC3 を除く 7 遺伝子は、正常 NK 細胞に比べ腫瘍組織で有意に発現の低下を示したので、これら 7 遺伝子のがん抑制遺伝子の候補遺伝子であることが推測された (図 3)。

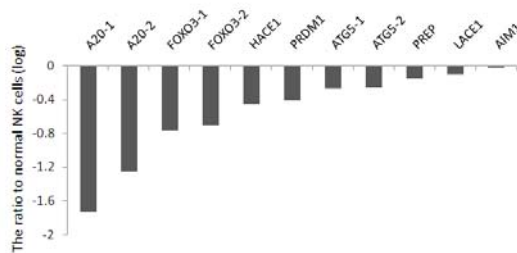
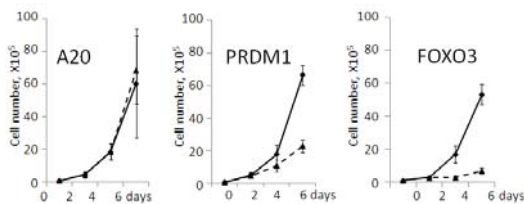


図 3 : 6q 上の各候補遺伝子の、NK 細胞性腫瘍における発現。正常 NK 細胞に対する NK 細胞性腫瘍における各遺伝子の発現レベルを示す。

がん抑制遺伝子は導入することで増殖が停止し、増殖に対する影響が調べられないことが多いので、Tet/off 発現誘導システムを用いて各候補遺伝子を導入し、薬剤選択後、DOx 選択後、テトラサイクリンを取り除くことにより、遺伝子発現を誘導した。



その結果、PRDM1 と FOXO3 遺伝子が機能的にもがん抑制遺伝子であることが確定した。今後、どのような機構で増殖抑制するのかについて検討していく予定である。

## (2) 正常 NK 細胞の増幅と遺伝子導入の試み

正常 NK 細胞を人工的に作成したフィーダ細胞を使って一時的に増殖させ、そこに遺伝子導入し、NK 細胞性腫瘍に関わる遺伝子の機能を検討するための実験系を作成することを目的とした。現在樹立されている NK 細胞性腫瘍のほとんどは IL2 依存性の増殖様式を示し、その維持にはかなりの熟練を有する。また、理由はよくわかっていないが、他の造血器腫瘍に比べて、ウイルスベクター法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法のいずれの方法でも遺伝子導入効率がきわめて悪く、機能的な検討を阻んでいる。

近年、正常 NK 細胞の増幅に人工的なフィーダ細胞を用いる方法が確立された (Imai et al., Blood, 2005)。その方法は K562 細胞に膜結合型 IL-15 とヒト 4-1BBL を導入した細胞 (K562-mb15-41BBL) と低濃度 IL2 (10U/ml) を用いるものである。従来法では精製した NK 細胞をせいぜい 400 倍に増幅するのが最大であったのに、本方法では NK 細胞を 100 万倍以上増幅することが可能であったことが記されている (Fujisaki et al., Br J Hematol, 2009)。また、それらの細胞を用いて遺伝子導入可能であり、特異的細胞傷害活性も遺伝子導入により可能であったことが示されている。

そこで、フィーダ細胞を入手し、コントロールをおきながら、精製操作を加えない末梢血単核球を K562-mb15-41BBL と共培養した。必要に応じて、フィーダ細胞を放射線照射し用いるのは、あまり実用的でないので、フィーダ細胞については 50 グレイの放射線照射したものを凍結保存し、必要ときに凍結融解したものをを用いても、100 万倍以上増幅可能であることを確認した。また、少なくとも 3-4 週間程度は維持できることが明らかとなったので、複数の遺伝子を導入するには十分な期間であることがわかった。そこで当初の

目的である、遺伝子導入実験を試みたが、樹立された NK 細胞株と同様、レンチウイルスベクターやレトロウイルスベクターを用いても感染効率が低く、NK 細胞に関しては新しい遺伝子導入法を考慮する必要があることが判明した。

#### 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 14 件)

1. Cihara D, Matsuo K, Seto M, (他7名, 7 番目): Inverse association between soy intake and non-Hodgkin lymphoma risk among women: a case-control study in Japan. *Ann Oncol.*, in press. (査読有)
2. Kato H, Yamamoto K, Seto M, (他6名, 7 番目): Clinical value of flow cytometric immunophenotypic analysis for minimal residual disease detection in autologous stem-cell products of follicular and mantle cell lymphomas. *Leukemia*, in press. (査読有)
3. Tsuzuki S, Seto M.: Expansion of functionally defined mouse hematopoietic stem/progenitor cells by a short isoform of RUNX1/AML1. *Blood*, 119: 727-735, 2012. (査読有)
4. Kato H, Yamamoto K, Seto M, (他 5 名, 6 番目): Interstitial pneumonia after autologous hematopoietic stem cell transplantation in B-cell non-hodgkin lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 11: 483-489, 2011. (査読有)
5. Karube K, Nakagawa M, Seto M. (他9名, Last Author): Identification of FOXO3 and PRDM1 as tumor suppressor gene candidates in NK cell neoplasms by genomic and functional analyses. *Blood*, 118: 3195-3204, 2011. (査読有)
6. Kumar V, Matsuo K, Seto M, (他 12 名, 11 番目): Common variants on 14q32 and 13q12 are associated with DLBCL susceptibility. *J Hum Genet*, 56: 436-439, 2011. (査読有)
7. Nakagawa M, Tsuzuki S, Honma K, Taguchi O, Seto M.: Synergistic effect of Bcl2, Myc and Ccnd1 transforms mouse primary B-cells into malignant cells. *Haematologica*, 96: 1318-1326, 2011. (査読有)
8. Kuroda A, Tsukamoto Y, Seto M, (他 14 名, 14 番目): Genomic profiling of submucosal-invasive gastric cancer by array-based comparative genomic hybridization. *PLoS One*, 6: e22313, 2011. (査読有)
9. Iqbal J, Weisenburger DD, Seto M, (他 19 名, 13 番目): International Peripheral T-cell Lymphoma Project. Natural killer cell lymphoma shares strikingly similar molecular features with a group of non-hepatosplenic  $\gamma\delta$ T-cell lymphoma and is highly sensitive to a novel aurora kinase A inhibitor in vitro. *Leukemia*, 25: 348-358, 2011. (査読有)
10. Tsuzuki S, Taguchi O, Seto M.: Promotion and maintenance of leukemia by ERG. *Blood*, 117: 3758-3868, 2011. (査読有)
11. Nakada C, Tsukamoto Y, Seto M, (他 7 名 9 番目): Overexpression of miR-210, a downstream target of HIF1 $\alpha$ , causes centrosome amplification in renal carcinoma cells. *J Pathol*, 224: 280-288, 2011. (査読有)
12. Umino A, Nakagawa M, Seto M. (他 4

名, Last Author): Clonal evolution of adult T-cell leukemia/lymphoma takes place in lymph node. *Blood*, 117: 5473-5478, 2011. (査読有)

13. Kato H, Kagami Y, Seto M, (他 10 名, 11 番目): Nodal relapse after helicobacter pylori eradication in a patient with primary localized gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Am J Gastroenterol*, 106: 549-551, 2011. (査読有)
14. Sung CO, Kim SC, Seto M, (他 10 名, 12 番目): Genomic profiling combined with gene expression profiling in primary central nervous system lymphoma. *Blood*, 117:1291-1300, 2011. (査読有)

[学会発表] (計 15 件)

1. Kenosuke Karube, Masao Seto: Genomic and functional analyses of NK-cell neoplasms. 4th T cell lymphoma forum, 2011, サンフランシスコ(米国), [口演] 2012. 1. 26
2. Kiyoko Yamamoto, Shinobu Tsuzuki, Tomoki Naoe and Masao Seto: Deregulated activity of AML1/RUNX1 cooperates with BCR-ABL to immortalize hematopoietic progenitor cells and induces blast crisis-like disease of chronic myelogenous leukemia in mice 第 53 回米国血液学会総会, 2011, サンディエゴ(米国) [ポスター (示説)] 2011. 12. 12
3. Harumi Kato, Kazuhito Yamamoto, Masao Seto (他 8 名, Last Author): Gene Expression Profiling of Age-Related Epstein-Barr Virus (EBV)-Associated B-Cell Lymphoproliferative Disorder Uncovers Alterations in Immune and

Inflammatory Genes: Possible Implications for Pathogenesis. 第 53 回米国血液学会総会, 2011, サンディエゴ(米国) [ポスター (示説)] 2011. 12. 12

4. 加藤 春美, 山本 一仁, 瀬戸 加大 (他 7 名, Last Author): 加齢性 EBV 関連 B 細胞性リンパ増殖性疾患の遺伝子発現プロファイル. 第 73 回日本血液学会学術集会, 2011, 名古屋国際会議場(名古屋) [口演] 2011. 10. 16
5. 都築 忍, 瀬戸 加大: ERG 発現による白血病化. 第 73 回日本血液学会学術集会, 2011, 名古屋国際会議場(名古屋) [ポスター (示説)] 2011. 10. 14
6. Masaharu Tashima. Masao Seto (他 6 名, 8 番目): Development of a mouse model for blastoid variant of mantle cell lymphoma. 第 73 回日本血液学会学術集会, 2011, 名古屋国際会議場(名古屋) [ポスター (示説)] 2011. 10. 14
7. 加留部謙之輔, 中川 雅夫, 瀬戸 加大 (他 4 名, Last Author): Identification of FOXO3 and PRDMI as tumor suppressor gene candidates in NK cell neoplasms. 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011, 名古屋国際会議場(名古屋) [ポスター (示説)] 2011. 10. 5
8. 加藤 春美, 山本 一仁, 瀬戸 加大 (他 7 名, Last Author): Gene expression profiling of EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) of the elderly. 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011, 名古屋国際会議場(名古屋) [口演] 2011. 10. 4
9. 瀬戸 加大: Molecular bases of malignant lymphoma. 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011, 名古屋国際会議場(名古屋) [シンポジウム] 2011. 10. 4
10. 松浦 恵子, 中田 知里, 瀬戸 加大 (他 4

名, 8 番目): Frequent deregulation of the Hippo signaling pathway in high-grade clear cell renal cell carcinoma. 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011, 名古屋国際会議場(名古屋) [シンポジウム] 2011. 10. 3

11. 成松 隆弘, 松浦 恵子, 瀬戸 加大 (他 7 名, 8 番目): 9p24.1-p13.3 loss may be indicator to predict metastasis of clear cell renal cell carcinoma. 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011, 名古屋国際会議場(名古屋) [シンポジウム] 2011. 10. 3
12. 都築 忍, 瀬戸 加大: Altered differentiation and enhanced self-renewal activity of B cells by the leukemia-associated TEL (ETV6)-AML1 (RUNX1) fusion gene. 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011, 名古屋国際会議場(名古屋) [シンポジウム] 2011. 10. 3
13. 加留部謙之輔, 瀬戸 加大: NK腫瘍の統合的な分子病態解析. 第51回日本リンパ網内系学会総会, 2011, 福岡国際会議場(福岡), [シンポジウム] 2011. 7. 1
14. 瀬戸 加大: 悪性リンパ腫研究の楽しみ方. 第51回日本リンパ網内系学会総会, 2011, 福岡国際会議場(福岡), [口演] 2011. 7. 1
15. Kennosuke Karube, Masao Nakagawa, Masao Seto(他3名, Last Author): Identification of FOXO3 and PRDM1 as tumor suppressor gene candidates in NK cell neoplasms by the combination of genomic and functional analyses. 第11回国際リンパ腫会議, 2011, ルガノ(スイス) [口演] 2011. 6. 16

[その他]

ホームページ等

Mhttp://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/04idenshi\_iryō/index.html

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

瀬戸 加大 (SETO MASAO)

愛知県がんセンター (研究所)・遺伝子医療研究部・部長

研究者番号 : 80154665