

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 15日現在

機関番号：82612  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23791211  
 研究課題名（和文）Bリンパ腫特異的新規ジンクフィンガー蛋白のB細胞分化、腫瘍特性における意義の解明  
 研究課題名（英文）Functional analysis of B-cell lymphoma specific zinc finger protein

### 研究代表者

飯島 一智 (IIJIMA KAZUTOSHI)  
 独立行政法人国立成育医療研究センター・小児血液・腫瘍研究部・共同研究員  
 研究者番号：30468508

研究成果の概要（和文）：バーキットリンパ腫 (BL) において特異的に発現する Zinc Finger 型タンパク質 ZNF385B の発現と機能を解析した。ZNF385B は BL の normal counter part と考えられている、胚中心の B 細胞において発現していた。薬剤依存的に ZNF385B を発現誘導可能な B 細胞腫瘍細胞株を作成した。最も長いアイソフォーム (IF-) 1 がアポトーシスを誘導するのに対し、N 末の Zinc Finger ドメインを欠く IF-2/3 は B 細胞受容体に対する抗体刺激や CD20 架橋刺激によって誘導されるアポトーシスを抑制した。ZNF385B は成熟 B 細胞において p53 と結合し、FAS/CD95, PERP の転写活性を変化させることでアポトーシス制御に関与していることが示された。

研究成果の概要（英文）：ZNF385B is a zinc finger protein that we previously identified as a molecule specifically expressed in BL using gene expression analyses. The biological significance of this protein has not been clarified at all. Therefore, we intended to elucidate diagnostic prospects and isoform-dependent functions of ZNF385B in B cells. Ectopic expression of ZNF385B IF-1 induced up-regulation of *PERP* (*p53 apoptosis effector related to PMP-22*) and activation of caspase-3 and -8, resulting in apoptosis induction, whereas IF-1/DEL did not. Furthermore, IF-1/DEL inhibited apoptosis induced by CD20 and BCR stimulation. Immunoprecipitation and yeast two-hybrid analysis indicated the direct binding of ZNF385B with p53. Since *PERP* is known to be a p53 transcriptional target, these results suggest the involvement of ZNF385B in B-cell apoptosis by modulating p53 transactivation. ZNF385B is considered to be involved in the regulation of death and survival that specifically occurs in GC B cells.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：バーキットリンパ腫、アポトーシス

### 1. 研究開始当初の背景

小児における代表的な成熟B細胞性リンパ腫としては、バーキットリンパ腫 (BL) とびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫 (DLBCL) が挙げられる。申請者らは、小児白血病・リンパ腫の臨床検体に対するマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析の過程で、BL

に特徴的に発現する遺伝子として Zinc finger 型タンパク質をコードする ZNF385B を同定した。種々の細胞株、臨床検体を用いた解析の結果、ZNF385B はほぼ全例の BL で発現するが、その他の造血系腫瘍では発現を認めないことが明らかとなり、特に興味深いことに、BL と表面形質が類似する DLBCL でも全く発

現していなかった。しかし、ZNF385B の正常組織における発現やB細胞分化、腫瘍特性における意義は不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究は、BL に特徴的に発現する Zinc finger 型タンパク質 ZNF385B が B 細胞成熟および BL の腫瘍特性において果たす機能の解明を目的とした。B 細胞における ZNF385B の標的分子およびアポトーシス誘導・抑制の細胞内シグナル伝達経路を詳細に解析することで、B 細胞成熟における ZNF385B の機能や、BL の腫瘍特性に果たす役割について明らかにするとともに、その知見を治療法開発へ応用することを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) ZNF385B の発現解析

ヒト正常組織における ZNF385B の発現は RT-PCR により解析した。反応性リンパ節における発現は免疫染色により解析した。リンパ節正常 B 細胞分化における ZNF385B の発現は、公的データベースに登録されているマイクロアレイによる扁桃 B 細胞遺伝子発現データを使用し、CXCR4 陽性 Centroblast と CXCR4 陰性 Centrococyte における ZNF385B の発現を抽出した。正常リンパ組織や BL 細胞における各アイソフォームの発現パターンは、各アイソフォーム特異的な配列を基に設計した real-time PCR プライマーを用い、増幅配列を含むコントロールベクターを構築して検量線を作成し、定量した。

### (2) ZNF385B の機能解析

ZNF385B の機能を明らかにするため、ZNF385B IF-1 と IF-2/3 に相当する ZNF385B IF-1/DEL を薬剤依存的に発現誘導可能な BJAB 細胞株を作製した。ZNF385B と p53 との相互作用は免疫沈降法と酵母ツーハイブリッド法により解析した。BL での ZNF385B のノックダウンは、レンチウイルスベクターにより shRNA を導入して行なった。

## 4. 研究成果

### (1) 正常組織での ZNF385B の発現解析

まず、ヒト正常組織における ZNF385B の発現を RT-PCR により解析したところ、造血組織においてはリンパ節、脾臓、扁桃に限定して発現していた (Fig.1)。反応性リンパ節の免疫染色により、胚中心の B 細胞において特異的に発現していることが示された。データベースに登録されている胚中心 B 細胞の遺伝子発現のデータを抽出して解析したところ、CXCR4 陽性の centroblast に特異的に発現していることがわかった。

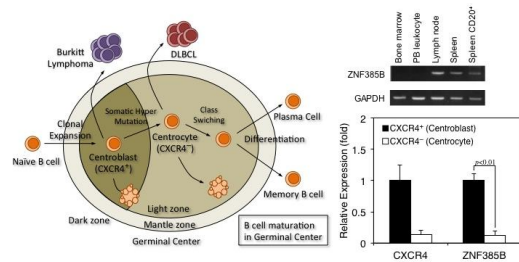


Fig.1 胚中心における B 細胞成熟と ZNF385B の発現

### (2) ZNF385B の機能解析

次に、薬剤依存的に ZNF385B を発現誘導可能な B 細胞リンパ腫細胞株を作製した。ZNF385B は少なくとも3種類のアイソフォームが存在し、4つの Zinc Finger ドメインからなる最も長いアイソフォーム (IF-) 1 と N 末の Zinc Finger ドメインを欠く IF-2/3 に相当する IF-1/DEL という欠損変異体を作製した (Fig.2A)。その結果、IF-1 の発現がアポトーシスを誘導するのに対し、IF-1/DEL はアポトーシスを誘導しなかった (Fig. 2B)。さらに IF-1/DEL は B 細胞受容体 (BCR) に対する抗体刺激や CD20 の架橋刺激によって誘導されるアポトーシスを抑制した (Fig. 2C)。

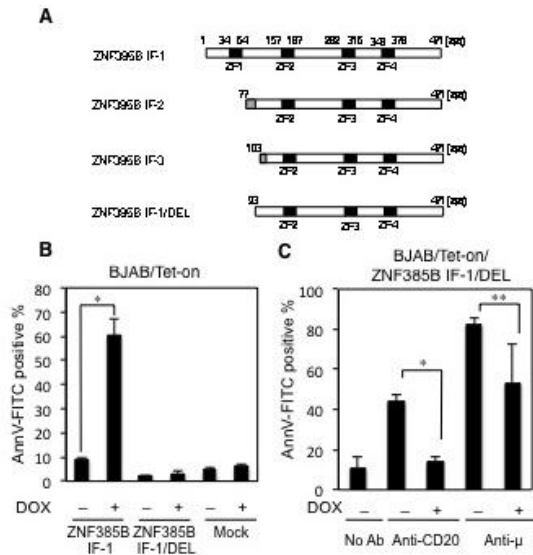


Fig.2 ZNF385B 各アイソフォームの構造と発現誘導によるアポトーシス

ZNF385B とアミノ酸レベルで高い相同性を有する HZF (ZNF385A) が p53 の DNA 結合ドメインと結合し、DNA 損傷により誘導されるアポトーシスを抑制することから、ZNF385B も p53 と結合するとの仮説を立て、その結合を免疫沈降と酵母ツーハイブリッド法により解析した。免疫沈降法および酵母ツーハイブリッド法いずれの結果も、IF-1、IF2/3 どちらも p53 と直接結合することを示していた。p53 転写産物の発現を解析したところ、IF-1 の発現によってアポトーシス促進分子である PERP および FAS/CD95 の発現の上昇が示された。ZNF385B は成熟 B 細胞に

において p53 と結合し、FAS/CD95、PERP の転写活性を変化させることでアポトーシス制御に関与していることが示唆された。

### (3) 各アイソフォームの発現パターン

上述の通り、ZNF385B はそのアイソフォームによって、アポトーシスの促進と抑制という相反する機能を有する。そこで、正常リンパ組織と BL 細胞株における ZNF385B 各アイソフォームの発現を解析した。正常リンパ組織ではアポトーシス抑制的な IF-2/3 が高発現しているのに対し、BL 細胞株ではアポトーシス促進型の IF-1 が高発現であった (Fig. 3)。

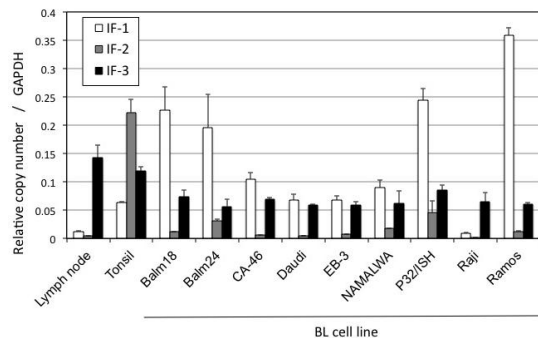


Fig. 3 正常リンパ組織、BL 細胞株における ZNF385B の各 IF の発現

centroblast は、リンパ濾胞 GC に局在し、免疫グロブリンの affinity maturation の過程にあり、体細胞レベルの DNA 組換えである体細胞超突然変異およびクラススイッチ組換えの段階に相当する。この時、DNA 損傷を引き金とする p53 応答により誘導されるアポトーシスを抑制する機構が存在すると考えられており、B-cell lymphoma-6 (BCL6) は p53 の転写を抑制することで、過度のアポトーシスを抑制している。正常リンパ組織における ZNF385B の発現がアポトーシス抑制性である IF-2/3 が主であることを考えると、GC において ZNF385B IF-2/3 は p53 に結合し、DNA 損傷によるアポトーシスを抑制しているものと推測された。

一方、BL 細胞株ではアポトーシス促進型の IF-1 が高発現していた。腫瘍においてアポトーシス促進型の IF-1 が高発現であることは腫瘍化の観点から不利とも思われるが、BL の多くで p53 のドミナントネガティブ変異が起きており、IF-1 の発現によりアポトーシスが誘導されて死ぬべき B 細胞クローンが腫瘍化している可能性が示唆された。

BL 細胞株において shRNA によって ZNF385B をノックダウンしたが、IF-1 により誘導される FAS/CD95、PERP の発現、CD20、BCR により誘導されるアポトーシス、ともに変化はみられなかった。この結果も、BL において ZNF385B-p53 アポトーシス制御が破綻していることを支持するものであった。

## 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 1 件)

(1) Iijima K, Yamada H, Miharu M, Imadome K, Miyagawa Y, Akimoto S, Kobayashi K, Okita H, Nakazawa A, Fujiwara S, Fujimoto J, Kiyokawa N., ZNF385B is characteristically expressed in germinal center B cells and involved in B-cell apoptosis., *Eur J Immunol.*, 査読有, Vol.42, No.12, pp.3405-3415. doi: 10.1002/eji.201242530.

[学会発表] (計 7 件)

(1) 飯島一智, 中澤温子, 藤本純一郎, 大喜多肇, 清河信敬, バーキットリンパ腫特異的分子 ZNF385B は p53 に結合してアポトーシスを制御する, 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011 年 10 月 5 日, 名古屋

(2) 飯島一智, 山田浩之, 三春晶嗣, 中澤温子, 藤本純一郎, 大喜多肇, 清河信敬, バーキットリンパ腫特異的分子 ZNF385B は p53 を介してアポトーシスを制御する, 第 73 回日本血液学会学術集会, 2011 年 10 月 15 日, 名古屋

(3) 飯島一智, 清河信敬, バーキットリンパ腫特異的ジंकフィンガー蛋白による B 細胞のアポトーシス制御, 第 40 回日本免疫学会学術集会, 2011 年 11 月 27 日, 幕張

(4) Kazutoshi Iijima, Hiroyuki Yamada, Masashi, Miharu, Atsuko Nakazawa, Junichiro Fujimoto, Kenichiro Kobayashi, Hajime Okita, and Nobutaka Kiyokawa, urkitt Lymphoma Specific Zinc Finger Protein ZNF385B Is Involved in Regulation of B Cell Apoptosis, 53rd American Society of Hematology Annual Meeting, 2011 年 12 月 10 日, San Diego, CA, USA

(5) 飯島一智, 中澤温子, 藤本純一郎, 大喜多肇, 清河信敬, Isoform-dependent functions of Burkitt Lymphoma specific zinc-finger protein ZNF385B, 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 09 月 20 日, 札幌

(6) Kazutoshi Iijima, Hiroyuki Yamada, Masashi Miharu, Atsuko Nakazawa, Junichiro Fujimoto, Kenichiro Kobayashi, Hajime Okita, Nobutaka Kiyokawa, Diagnostic prospects and isoform-dependent functions of Burkitt lymphoma specific protein ZNF385B, SIOP 2012 Congress, the 44th Congress of the International Society of Paediatric Oncology, 2012 年 10 月 07 日, London

(7) 飯島一智, 清河信敬, ZNF385B is characteristically expressed in germinal center centroblast and induces apoptosis via PERP and FAS, 第 41 回日本免疫学会学術集会, 2012 年

12月07日, 神戸

[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

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

飯島 一智 (IIJIMA KAZUTOSHI)

独立行政法人国立成育医療研究センター  
一・小児血液・腫瘍研究部・共同研究員

研究者番号: 30468508

### (2)研究分担者

( )

研究者番号:

### (3)連携研究者

( )

研究者番号: