

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460436

研究課題名(和文)NK/T細胞リンパ腫のプロテオーム解析による病態解明と臨床応用

研究課題名(英文)Identification of molecular basis of NK/T cell lymphoma by using proteomics

## 研究代表者

本間 圭一郎(HONMA, KEIICHIRO)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20505945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：NK細胞リンパ腫細胞株とEBV関連遺伝子を導入したヒトNK細胞とのプロテオーム解析により抽出された候補蛋白の中で、SOCS1とDFCP1が臨床検体でも発現亢進が認められた。これらはヒトNK細胞への遺伝子導入では明らかな細胞増殖やアポトーシスへの影響は認められなかった。一方NK細胞リンパ腫株ではDFCP1の遺伝子導入によって細胞増殖能の亢進が見られ、DFCP1のノックダウンではアポトーシス亢進が認められた。免疫沈降ウエスタンブロットによりDFCP1はA73と結合することを明らかにした。DFCP1がEBV関連蛋白との協調によりリンパ腫の増殖、生存に関与することが明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：We conducted quantitative proteomics analysis by iTRAQ. Marked quantitative differences were observed in the four proteins in NK/T cell lymphoma cell lines compare to the control NK cells introducing EBV genes. Concordance of protein expression pattern was observed in one protein (DFCP1) between NK/T cell lymphoma clinical samples and normal NK cell samples by using immunohistochemical analysis. Induction of clonogenicity by DFCP1 and cellular apoptosis by knockdown of DFCP1 was observed in the NK lymphoma cell line and NK cells introducing EBV genes, whereas DFCP1 was no effect in cellular survival and proliferation in control NK cells. Next we analysed cooperative interactions of DFCP1 and EBV genes using large-scale proteome analysis co-immunoprecipitation coupled to mass spectrometry. We identified the interaction of DCFP1 with EBV gene A73. These results revealed that DFCP1 may play an important role in NK lymphomagenesis.

研究分野：外科病理学

キーワード：NK/T細胞リンパ腫

### 1. 研究開始当初の背景

NK/T 細胞リンパ腫は欧米では極めて稀で、日本をはじめ東アジア地域において多く見られ、Epstein Barr virus (EBV) が腫瘍細胞中に検出される悪性リンパ腫である。腫瘍形成における基礎研究の知見に乏しいことから、現在でも有効な治療法が確立されておらず、進行例では早期に死亡する例が多い。ゲノム解析や遺伝子発現解析を行った研究は既にあるが、治療につながる病態を解明するに至っていない。悪性リンパ腫においてユビキチン化、リン酸化による蛋白の翻訳後修飾に関わる遺伝子異常が近年相次いで報告されており、こうした翻訳後修飾の異常が腫瘍形成において重要な役割を果たしていることが示唆されている。しかし、欧米に多い B 細胞リンパ腫に比し、NK/T 細胞リンパ腫におけるこうした知見は極めて乏しい。

### 2. 研究の目的

I) iTRAQ による、NK/T 細胞リンパ腫株で変動しているリン酸化タンパクの同定  
IMAC やアフィニティーカラムによるリン酸化タンパク、ユビキチン化タンパクの精製を行い、NK/T 細胞リンパ腫と正常 NK 細胞、T 細胞の MS/MS スペクトルから、プロテオーム解析を行い、腫瘍において発現が変動しているリン酸化タンパクの同定を行う。

( ) 同定されたタンパクの、臨床検体における意義を検討

iTRAQ 解析で抽出されたタンパクについて NK/T 細胞リンパ腫の臨床検体における発現を免疫染色で検討し、細胞株で得られた結果との整合性を検討する。

( ) リンパ腫細胞における機能解析

抽出された遺伝子について、以下に示した項目の機能解析を行う。

(A) EBV との相互協調作用

NK/T 細胞リンパ腫細胞には EBV 感染がほぼ全例認められるのに対し、正常 NK 細胞に EBV を感染させるとアポトーシスが誘導される。これらは B 細胞における、EBV 感染による不死化から遺伝子異常の蓄積を経てリンパ腫形成・進展に至るステップとは、異なるメカニズムが考えられる。NK/T 細胞リンパ腫における EBV と同定されたタンパクの相互作用を明らかにする。

(B) 細胞周期・増殖・生存など細胞動態・造腫瘍性への影響

(C) ノックダウン・阻害剤による腫瘍増殖抑制効果など治療標的としての可能性の検討

### 3. 研究の方法

I) iTRAQ による、NK/T 細胞リンパ腫株で変動しているリン酸化タンパクの同定

NK/T 細胞株 (NK-YS, NKL, SNK6, SNK10, HANK-1) と正常 NK 細胞のタンパク質試料を、は IMAC により (コスモバイオ社 PhosphoCruz を使用) リン酸化タンパク精製後、lysis buffer で変性・還元・アルキル化、消化した。

正常 NK 細胞、T 細胞は末梢血中の白血球分画を ficol paque PLUS (GE ヘルスケア社) で分離し、増幅後、MACS カラム (Milteny biotec 社) キットで isolation した。4-1BB 遺伝子及び IL-15 遺伝子を組み込んだ K562 細胞株と、PBMC を IL-2 添加混合培養により正常 NK 細胞を約 100 倍増幅し、実験に供した。正常 NK 細胞にレンチウイルスベクターを用いて EBV 関連遺伝子 (EBER1) を導入した細胞を EBV 感染 NK 細胞の代替として検討した。多検体間の比較定量が可能な iTRAQ 法を用い、異なる試料から得られた試料を異なる iTRAQ 試薬でラベル後、iTRAQ 修飾ペプチドを MS/MS 解析に供し、網羅的タンパク質発現解析を行うことで、正常 NK 細胞、EBV 関連遺伝子を導入した NK 細胞とリンパ腫細胞株において発現が亢進あるいは、減弱しているリン酸化タンパクの同定を行った。ウエスタンブロット解析によって iTRAQ MS/MS の結果の確認を行った。

( ) 同定されたタンパクの、臨床検体における意義を検討

NK/T 細胞リンパ腫の臨床検体において同定されたタンパクの発現亢進が見られるか、免疫染色で検討した。iTRAQ MS/MS により NK リンパ腫細胞株で発現亢進が確認されたタンパクが、実際の臨床検体でも同様の発現プロファイルを示すか確認した。

( ) リンパ腫細胞株や invio における機能解析

(A) Epstein Barr virus (EBV) との相互協調作用

同定されたタンパクの NK 細胞における EBV 感染維持への関与などについて検討する。同定されたタンパクと EBV 関連タンパクとの相互作用を検討した。

(B) 細胞周期・増殖・生存など細胞動態・造腫瘍性への影響

同定されたタンパクの、NK 細胞における細胞増殖、生存、造腫瘍性について、正常 NK 細胞および EBV 関連遺伝子を導入した NK 細胞にレンチウイルスベクターで遺伝子導入し検討した。

(C) ノックダウンによる腫瘍増殖抑制効果など治療標的としての可能性の検討

NK/T 細胞リンパ腫細胞株に、同定されたタンパクをコードする遺伝子を siRNA によるノックダウンや阻害剤による研究から、治療標的への応用について検討した。

### 4. 研究成果

I) iTRAQ による、NK/T 細胞リンパ腫株で変動しているリン酸化タンパクの同定

NK/T 細胞リンパ腫で、正常 NK 細胞および EBER1 導入 NK 細胞に比し発現亢進が認められたタンパクは 4 種類同定された。そのうち、DFCP1 および SOCS1 はウエスタンブロットでタンパク発現自体の明らかな亢進が認められた。

( ) 同定されたタンパクの、臨床検体におけ

る意義を検討

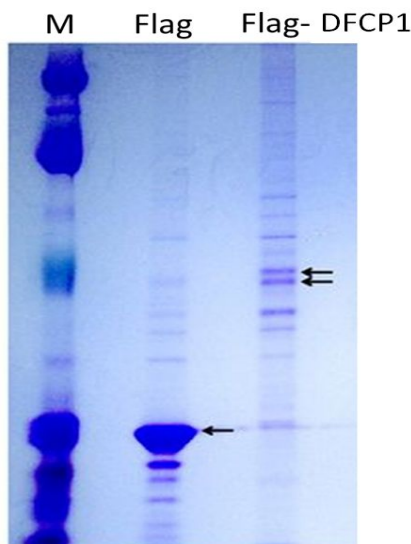
NK/T 細胞リンパ腫 52 例のホルマリン固定パラフィン包埋標本に対する SOCS1 および DFCP1 の免疫染色を施行した結果、SOCS1 は 43 例 (82%)、DFCP1 は 50 例 (96%) に陽性を認めた。末梢血 NK 細胞および EBV 関連遺伝子導入 NK 細胞のペレットをホルマリン固定しパラフィン包埋を行った検体 4 検体でも検討した結果、SOCS1 は免疫染色で 4 例いずれも陽性を示し、DFCP1 は 4 例ともに明らかな陽性像を認めなかった。遺伝子変異についても DFCP1 および SOCS1 について検討したが、明らかな遺伝子変異を認めなかった。以上の結果から、DFCP1 が特に NK/T 細胞リンパ腫の lymphomagenesis において重要な役割をしているとの仮説を立て、以下の機能解析を施行した。

( ) リンパ腫細胞株や in vivo における機能解析

(A) Epstein Barr virus (EBV) との相互協調作用

Flag tag を付加した DFCP1 および Flag のみのコントロールを NK/T 細胞リンパ腫細胞株 NK1 に導入し、ライセートを anti-flag tag M2 磁気ビーズを用いて精製、免疫沈降を行った。PAGE ゲルで電気泳動後、クーマシーブルー染色を行い Flag-DFCP1 の発現を確認した (図 1)。リン酸化によるバンドを含む 2 本のバンドが確認され、ゲル内消化を行った。相互作用を示すタンパク同定のため、LC-MS/MS によるプロテオーム解析を行った。相互作用を示すタンパクのうち、EBV 関連遺伝子産物 A73 が同定された。

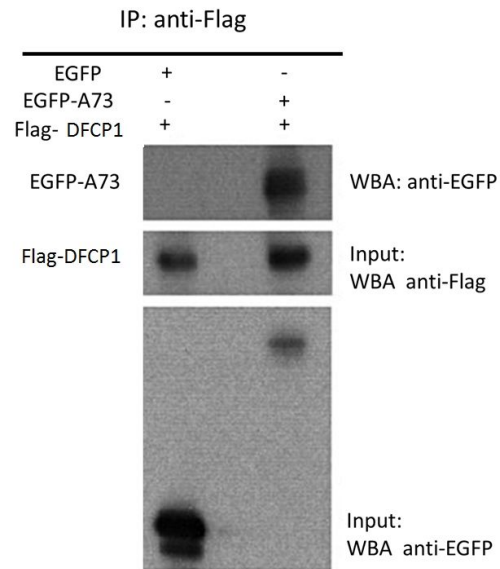
図 1



次に DFCP1 と EBV 関連タンパク A73 との相互作用の確認に免疫沈降-ウエスタンブロット解析 (IP-WBA) を施行した。EGFP tag-A73 と Flag tag-DFCP1 を細胞株 NK1 に導入し、ライセートを anti-flag tag M2 磁気ビーズを用いて精製、免疫沈降を行った。その後抗 EGFP 抗体で IP-WBA を行い、DFCP1 と A73 との相互

作用が IP-WBA でも確認された (図 2)。

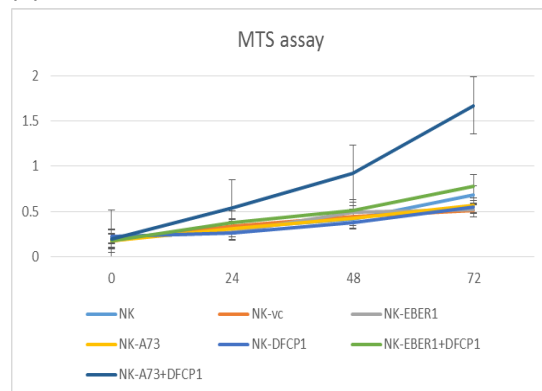
図 2



(B) 細胞周期・増殖・生存など細胞動態・造腫瘍性への影響

ヒト末梢血 NK 細胞および EBV 関連遺伝子 EBER1、A73 を導入したヒト NK 細胞にレンチウイルスベクターで DFCP1 を発現させ、その造腫瘍性について検討した。NK 細胞への EBER1 と DFCP1、A73 と DFCP1 の遺伝子導入にはタンDEM発現レンチウイルスベクターを使用した。細胞増殖能について MTS アッセイによる解析を行った。NK 細胞はフィーダー細胞を用いず IL-2、IL-15 添加培地で培養した。正常末梢血 NK 細胞、NK 細胞にベクターのみの対照 (NK-vc) と比較して、A73、EBER1、DFCP1 を単独で遺伝子導入した NK 細胞、EBER1 と DFCP1 の共発現した NK 細胞いずれも増殖能に明らかな差を認めなかった。一方、A73 と DFCP1 の共発現した NK 細胞は増殖能の亢進が見られた (図 3)。DFCP1 は EBV 関連遺伝子 A73 との相互作用により、NK 細胞の増殖能を亢進することで、リンパ腫形成に参与している可能性が示唆された。

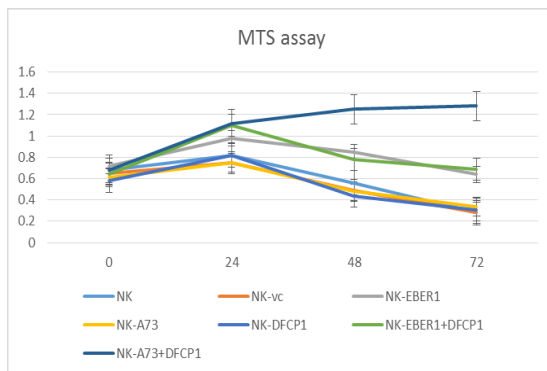
図 3



次に IL-2、IL-15 無添加培地での培養におけるアポトーシス耐性に対する DFCP1 の影響に

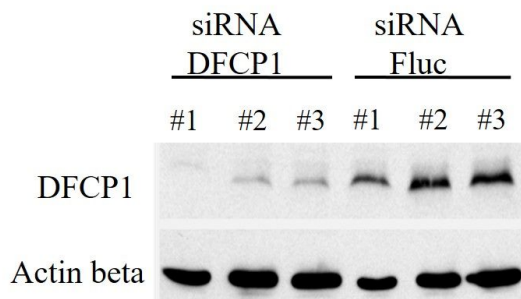
ついて検討した。IL-2、IL-15 無添加培地での培養で正常末梢血 NK 細胞および NK-vc は細胞数の減少が認められた。NK 細胞への A73、DFCP1 単独の遺伝子導入では細胞数の減少への抑制効果は見られなかった。一方 EBER1 は単独で NK 細胞の細胞減少への抑制効果が見られたが、DFCP1 との共発現による協調作用は認めなかった。DFCP1 と A73 の共発現は NK 細胞における IL-2、IL-15 無添加培地培養での細胞数減少の抑制効果が見られた (図 4)。Annexin V およびカスパーゼ 3 活性化によるアポトーシス解析では、DFCP1 と A73 の共発現は NK 細胞における IL-2、IL-15 無添加培地培養でのアポトーシス抑制効果が認められた。

図 4



(C) ノックダウンによる腫瘍増殖抑制効果など治療標的としての可能性の検討  
NK リンパ腫細胞株 NK1 で DFCP1 の発現を siRNA でノックダウンすることによる細胞生存、増殖にたいする効果を検討した。DFCP1 に対する 3 種類の siRNA をデザインし、オフターゲット効果のコントロールにファイアーフライルシフェラーゼに対する siRNA (siRNA Fluc) を用いて検討した。デザインした siRNA によって少なくとも 70% 以上のノックダウン効果をウエスタンブロットで確認した (図 5)。

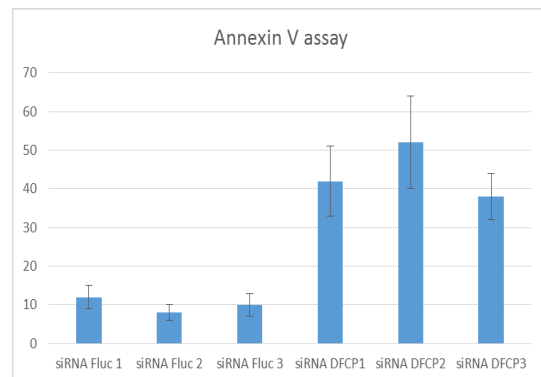
図 5



EBV 陽性 NK リンパ腫細胞株 NK1 に対し DFCP1 をノックダウンし、アポトーシス効果について Annexin V の検討をおこなった。DFCP1 のノックダウンにより、NK1 は高度にアポトーシスが誘導された (図 6)。これにより、NK 細胞リンパ腫において DFCP1 が治療の分子標

的となる可能性が示唆された。

図 6



## 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)

Nakatsuka S, Honma K, Aozasa K, When to use in situ hybridization for the detection of Epstein-Barr Virus: a review of Epstein-Barr virus-associated lymphomas. J Hematopathol 8:61-70, 2015

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

本間 圭一郎 (Honma Keiichiro)  
大阪大学大学院・医学系研究科病態病理学教  
室・助教

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：