

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2007-2008

課題番号：19591273

研究課題名（和文） 小児悪性リンパ腫における p27 発現調節と p27 ペプチド療法による抗腫瘍効果の検討

研究課題名（英文） p27 expression and growth suppression by p27 peptide in pediatric lymphoma

研究代表者

中川 温子 (Nakagawa Atsuko)

国立成育医療センター（研究所）・医長 研究者番号：90227736

研究成果の概要：

悪性リンパ腫細胞株における細胞周期関連分子 (p14, p16, p21, p27, Rb, phospho-Rb) の発現についてウエスタンブロット法にて検索した。Anaplastic large cell lymphoma(ALCL)細胞株では Rb/phospho-Rb, p27 は 4 株とも発現が認められた。Burkitt lymphoma(BL)7 株においては、全ての株で p16<sup>INK4a</sup> 発現がなく、Rb/phospho-Rb は過剰発現の傾向がみられた。p21, p27 発現については細胞株の間でばらつきがあり、一定の傾向を示さなかった。ALCL では、SCID マウスに腫瘍を形成する DEL, SR786, Karpas299 では p16<sup>INK4a</sup> の発現が認められなかったが、SCID マウスに腫瘍を形成できない Su-DHL1 では p16<sup>INK4a</sup> の発現が認められた。p16<sup>INK4a</sup> 機能ペプチドによる腫瘍増殖抑制効果は、DEL のみでなく、Su-DHL1 においても認められ、トランスポーターペプチドを用いることにより、細胞内導入が効率的に行われた。今後、これらの増殖抑制が p16<sup>INK4a</sup> 機能ペプチドが機能的に p16<sup>INK4a</sup> を補っているかどうかを確認するため、p16<sup>INK4a</sup> 機能ペプチド投与時の Rb のリン酸化抑制を検討する予定である。In vivo における腫瘍増殖抑制効果を SCID マウス xenograft を用いて検討しているが、局所皮下投与では、効果が不明瞭であったため、投与量、投与方法を検討中である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：小児血液学・悪性リンパ腫の分子標的治療

## 1. 研究開始当初の背景

小児悪性リンパ腫の 20-30% を占める Anaplastic large cell lymphoma では、p27 の発現低下が腫瘍化における重要なメカニズムと考えられており、t(2;5)転座による NPM/ALK キメ

ラ遺伝子が P13/Akt 経路を介して p27 の分解を促進することが最近明らかにされた (Blood 2005;105:827-829)。また Anaplastic large cell lymphoma では Jab1 による p27 の核外移行も p27 の分解促進に働くことが推察されている (Clin

Cancer Res 2003;9:1121-1128)。したがってこれらのp27 発現調節に関わる分子機構を解明することは、治療戦略上非常に有意義と考えられる。

## 2. 研究の目的

Anaplastic large cell lymphoma 細胞株において p27, p16 などの CDK インヒビターの発現と p27 発現調節機構に関連する既知の分子(Skp2, P13, Akt, Jab1, Cox-2 など)について検索するとともに Akt, P13, Jab1, cox-2 インヒビターを用いて p27 分解抑制を介した ALCL の細胞増殖抑制効果について検討を行う。さらに p27 機能ペプチドを合成し、p27 機能ペプチドの抗腫瘍効果について Anaplastic large cell lymphoma 細胞株およびマウス xenograft モデルを用いて検討する。

## 3. 研究の方法

### 1) 悪性リンパ腫細胞株における細胞周期関連分子の発現について

悪性リンパ腫細胞株(Burkitt リンパ腫 7 株; Ramos, Daudi, EB-3, Raji, Balm18, Namalwa, Balm24)、Anaplastic large cell lymphoma 4 株; SR-786, DEL, Su-DHL1, Karpas299)細胞周期関連分子 (p14, p16, p21, p27, Rb, phospho-Rb) の発現についてウエスタンブロット法にて検討する。

### 2) Anaplastic large cell lymphoma 細胞株を用いた p27 発現調節関連分子阻害剤あるいは Cox-2 阻害剤による細胞増殖抑制効果の検討

i) Anaplastic large cell lymphoma 細胞株 4 株について p27 の発現を確認し、p27 発現株と非発現株に分けて、Akt, P13, Jab1 阻害剤による細胞増殖抑制効果、p27 分解抑制効果について検討する。

ii) Anaplastic large cell lymphoma 細胞株 4 株について Cox-2 の発現を確認し、Cox-2 発現株と非発現株に分けて Cox-2 阻害剤による細胞増殖抑制効果、p27 分解抑制効果について検討する。

### 3) p27 ペプチド療法の基礎的検討

p27 機能ペプチドの合成とトランスポーターペプチドの合成を行う。研究分担者の吉川は p16 ペプチドを効率的に核内に輸送する Wr-T トランスポーターシステムを開発し、高悪性度リンパ腫における抗腫瘍効果を細胞株およびマウス xenograft で確認している(Mol Cancer Ther 2004;3:1623-1630)。

Anaplastic large cell lymphoma 細胞株の p27 発現株と非発現株に対し、p27 ペプチドの in vitro での抗腫瘍効果の検討を行う。

さらにマウス xenograft に対する in vivo での抗腫瘍効果を検討する。

## 4. 研究成果

### 1) 悪性リンパ腫細胞株における細胞周期関連分子の発現について

Anaplastic large cell lymphoma 細胞株 SR-786, DEL の 2 種の細胞株では p16<sup>INK4a</sup> 発現がみられなかった。Rb/phospho-Rb, p27 は 4 株とも発現が認められた (図 1)。

Burkitt リンパ腫 7 株においては、全ての株で p16<sup>INK4a</sup> 発現がなく、Rb/phospho-Rb は過剰発現の傾向がみられた。p21, p27 発現については細胞株の間でばらつきがあり、一定の傾向を示さなかった (図 2)。

当初計画した p27 については、ウエスタンブロット法により、Anaplastic large cell lymphoma 細胞 4 株すべてで発現が認められた。マウス xenograft に対する in vivo での抗腫瘍効果を検討するために、まず、Anaplastic large cell lymphoma 4 株 (SR-786, DEL, Ki-JK, SU-DHL-1) を細胞培養し、SCID マウスの皮下に移植した。SR-786, DEL の 2 種の細胞株は、SCID マウスに腫瘍を形成したが、Ki-JK, SU-DHL-1 の 2 株は腫瘍を形成できなかった。マウス xenograft の作成に成功した SR-786, DEL の 2 種の細胞株では p16<sup>INK4a</sup> 発現がみられなかったため、p27 に代わり、p16<sup>INK4a</sup> ペプチド療法の基礎的検討を行うこととした。

	Rb	pRb	p16	p21	p27
<b>SR-786</b>	+	+	-	+	+
<b>DEL</b>	+	+	-	+	+
<b>Su-DHL1</b>	+	+	+	+	+
<b>Karpas299</b>	++	++	-	-	+

図1: Anaplastic large cell lymphoma 細胞株における細胞周期関連分子の発現

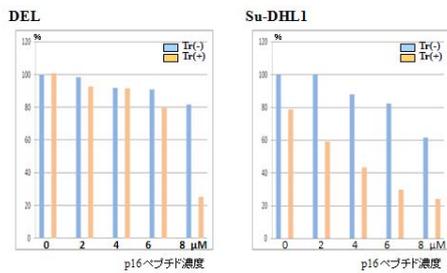
	Rb	pRB	p16	p21	p27
<b>Ramos</b>	+	+	-	-	-
<b>Daudi</b>	++	++	-	+	-
<b>EB-3</b>	++	+	-	-	-
<b>Raji</b>	+/-	-	-	+	++
<b>Balm18</b>	++	++	-	-	+
<b>Namalwa</b>	++	++	-	++	+
<b>Balm24</b>	+/-	+/-	-	-	+

図2: Burkitt lymphoma 細胞株における細胞周期関連分子の発現

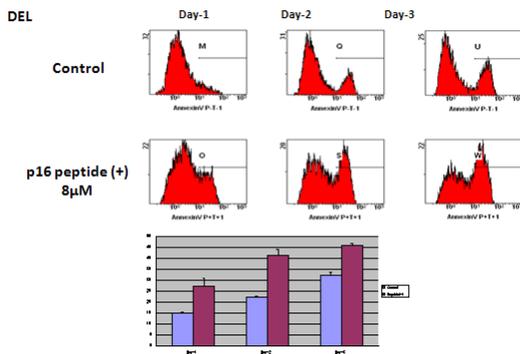
### 2) p16<sup>INK4a</sup> 機能ペプチドによる細胞増殖抑制効果

p16<sup>INK4a</sup>-cyclinD-CDK4-Rb の発現のない Anaplastic large cell lymphoma 細胞株

(DEL) と p16<sup>INK4a</sup>-cyclinD-CDK4-Rb の発現を認める Anaplastic large cell lymphoma 細胞株 (Su-DHL1) を用いて Transporter peptide を用いた p16<sup>INK4a</sup> 細胞内分子標的療法の基礎的検討を行った。対数増殖期にある ALCL 細胞 2 株 (DEL、Su-DHL1) を 96 穴プレートに 5000/well の濃度で蒔き、p16<sup>INK4a</sup> ペプチドを添加し、37°C で 3 日間培養し、WST アッセイにて生細胞数を計測した。p16<sup>INK4a</sup> ペプチド導入後 72 時間の時点での増殖抑制率は 8 $\mu$ M でそれぞれ 76%、75% であった。データは示さないが、同様の実験を健常者の末梢血単核球を用いて行ったが、ペプチド複合体導入は認められたが、細胞傷害効果はみられなかった。



対数増殖期にある ALCL 細胞 2 株 (DEL、Su-DHL1) を 96 穴プレートに 5000/well の濃度で蒔き、p16<sup>INK4a</sup> ペプチドを添加し、37°C で 3 日間培養し、Anexin V 陽性細胞を flow cytometry にて測定した。ALCL 細胞株 DEL はもともと増殖しながら、死んでいく細胞であるので、きれいな結果ではないが、ペプチド導入 1 日後では Anexin V 陽性のアポトーシス早期の細胞がコントロールに比較して増加していた。



## 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 3 件)

Kondo E, Tanaka T, Miyake T, Ichikawa T, Hirai M, Adachi M, Yoshikawa K, Ichimura

K, Ohara N, Moriwaki A, Date I, Ueda R, Yoshino T.

Potent synergy of dual antitumor peptides for growth suppression of human glioblastoma cell lines. *Mol Cancer Ther* 7: 1461-1471, 2008

Li C, Takino H, Eimoto T, Ishida T, Inagaki A, Ueda R, Suzuki R, Yoshino T, Nakagawa A, Nakamura S, Inagaki H. Prognostic significance of *NPM-ALK* fusion transcript overexpression in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Mod Pathol* 20:648-55, 2007

Shimazui T, Ami Y, Yoshikawa K, Uchida K, Kojima T, Oikawa T, Nakamura K, Honda N, Hinotsu S, Miyazaki J, Kunita N, Akaza H: Prediction of in vitro response to interferon-alpha in renal cell carcinoma cell lines. *Cancer Sci* 98: 529-534, 2007

[学会発表] (計 1 件)

第 25 回日本染色体遺伝子検査学会学術集会「小児がん」における遺伝子・病理診断 2007 年 11 月 17 日 東京

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 温子 (Nakagawa Atsuko)

国立成育医療センター (研究所)・病理診断科・医長

研究者番号: 90227736

(2) 研究分担者

吉川 和宏 (Yoshikawa Kazuhiro)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 60109759