

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590413

研究課題名(和文) B細胞リンパ腫における Mastermind の役割

研究課題名(英文) The role of Mastermind in B-cell lymphoma

研究代表者

東 守洋 (Higashi, Morihiro)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：00323395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：Mastermind(Mam)はNotchシグナルを正に制御し胚中心B細胞から辺縁帯B細胞への分化に重要な役割をはたす。本研究では、1) 正常リンパ節では芽中心B細胞、辺縁帯B細胞でMam11, Mam13とも発現がみられた。2) ホジキンリンパ腫ではMCにおいて半数程度の症例で発現がみられた。3) 辺縁帯B細胞性リンパ腫では減弱していた。4) 細胞株ではB細胞性腫瘍においてはレセプター、リガンド両方発現し、細胞自律的に働いている可能性が示された。今後さらにB細胞性リンパ腫の腫瘍起源の詳細との関連を解明することにより、胚中心由来のB細胞性リンパ腫の生物学的差異を明らかにできると考えている。

研究成果の概要(英文)：Mastermind (Mam) is a pivotal modulator of Notch signaling and has essential roles in the differentiation of B-cells from GC to MZ. We showed that 1) MamL1 and MamL3 were expressed in the GC and MZ of reactive lymph node. 2) Mam was expressed in 50% of cases with MC subtype of the Hodgkin lymphoma, whereas the expression was low in the cases with NS subtype. 3) Mam was expressed in the cases with follicular lymphoma and was low in the cases with marginal zone lymphoma. 4) The expression of Hes-1 was correlated with the expression of Notch1 or Jag2 in lymphoma cell lines, suggesting the Notch pathway is activated by cell-autonomously within lymphoma cell lines. 5) The expression of Hes-1 was correlated with LR11 expression. LR11 may be activated in parallel with Notch activation. Further investigation of the expression of Notch related molecules and the status of Notch activation is needed to clarify the biological and pathological differences in B-cell lymphomas originated from the GC.

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 B細胞性リンパ腫 Mastermind Notch

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍発生は、正常対応細胞の分化異常と増殖異常と捉えられる。悪性リンパ腫の分類はリンパ球の分化段階に応じた腫瘍起源に基づいており、腫瘍発生と分化異常の関連についてよいモデルとなっている。ホジキンリンパ腫、濾胞性リンパ腫、バーキットリンパ腫、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫の一部は、リンパ濾胞の胚中心(GC)由来であることが示されてきた。これらのリンパ腫の発生において胚中心 B 細胞の分化がストップすると想定されている。

Mastermind は Notch の核内 co-activator として同定され、Notch シグナルの増強・安定に寄与する。Notch は個体発生、細胞分化の key 分子の一つであり、B 細胞においては GC から post GC の辺縁帯 B 細胞への分化に必須であることが知られている。Mastermind は Notch シグナルを正に制御し、そのノックアウトマウスでは胚中心 B 細胞から辺縁帯 B 細胞への分化が抑制される。Notch についてはその遺伝子変異により恒常的に活性化された Notch が T 細胞性急性白血病発生に関与することが知られている。一方 B 細胞性腫瘍では、ホジキンリンパ腫、未分化大細胞リンパ腫(ALCL)で Notch1 が発現し、Notch リガンド刺激でホジキンリンパ腫細胞株、未分化大細胞リンパ腫株の増殖を促すという研究や、恒常的 Notch 活性化によりアポトーシスを誘導するといった研究がなされており、これらの相反する結果に未だ決着がつかない。Mastermind については B 細胞リンパ腫での報告は未だない。耳下腺および気管支の粘液性類表皮癌や T 細胞性急性白血病で Mastermind の転座が報告されており、これらと同様 Mastermind の転座の可能性も考えられる。最近 Bcl-6 は Mastermind を直接抑制し、その結果 Notch シグナルを抑制することが報告された。Bcl-6 は GC に発現し、GC B 細胞から post GC への分化を抑制することが知られて

いる。さらに Bcl-6 の異常は GC 由来の B リンパ腫の腫瘍発生をもたらすことも知られている。GC から post GC への分化異常という観点から Mastermind と Bcl-6 発現や機能変化の解析も必要と考えられる。

2. 研究の目的

本研究では GC 由来の B 細胞性リンパ腫とりわけホジキンリンパ腫における Mastermind の発現と機能異常について検討することを目的とした。さらに Notch のリガンドである Jagged、DLL ターゲットである Hes1 の発現も検討した。

3. 研究の方法

1) リンパ腫細胞株における Mastermind の発現

培養細胞株は HDLM-2 (Hodgkin lymphoma;HL), L-540 (HL), KM-H2 (HL), L-428 (HL), Karpas 299 (ALCL), SUDH-1 (ALCL), Raji (B-cell lymphoma), Jukat (T-cell lymphoma), HT (diffuse large B-cell lymphoma), Normal lymphocyte を用い、Mastermind-like (MamL) 1, MamL-3, Jagged1, Jagged2, DLL, Hes-1, LR11 の発現を Western blot, セルブロックを用いた免疫組織化学で検討した。また上記分子に関して real time PCR で mRNA の発現についても検討した。

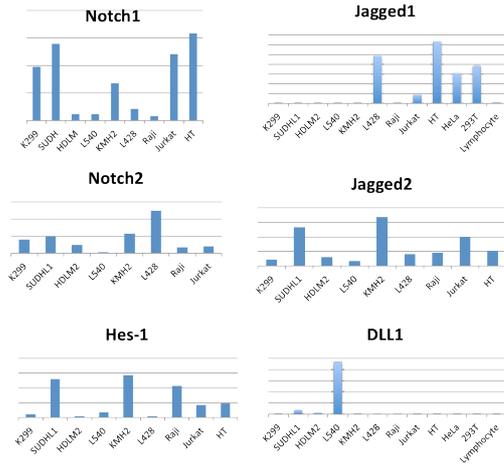
2) 悪性リンパ腫症例での MamL 発現

ホジキンリンパ腫 14 例、濾胞性リンパ腫 2 例、辺縁帯 B 細胞リンパ腫 3 例、正常対照群として扁桃、反応性リンパ節について MamL-1, MamL-3, LR-11 について免疫組織化学で検討した。

4. 研究成果

1) 細胞株における Notch 関連分子の発現 mRNA 発現について Real time PCR の結果を図 1 に示す。図 1 のごとく細胞株での発現はそれぞれの分子に一定の傾向は見られなかったが、B 細胞由来の HL 株 (KM-H2, L-428) では

図1

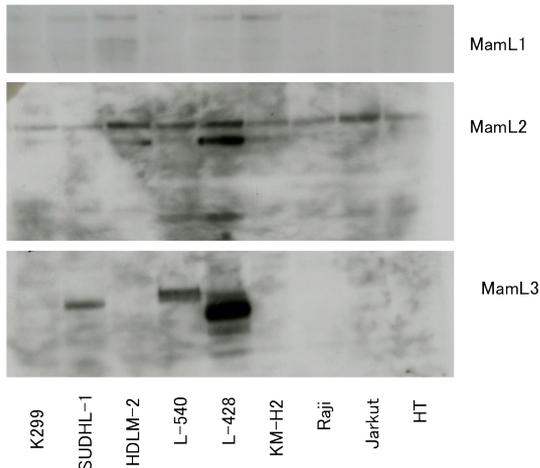


リガンドのいずれか、そして Notch1, 2 のいずれかの発現が高く、Notch シグナルが活性化している可能性が考えられた。さらにターゲットである Hes-1 についてもこの2種の細胞株で高かった。これらのことからホジキンリンパ腫では細胞自律的に Notch が活性化している可能性が考えられた。

2) 細胞株における Mastermind の発現

図2に Mastermind のタンパク発現について Western blot を示す。MamL-3 について検索したところ ALCL 細胞株2種のうち1種、ホジキンリンパ腫細胞株4種のうち2種で発現がみられた (図2)。2種のGC由来のB細胞

図2



リンパ腫細胞株では発現が見られなかった。発現がみられたホジキンリンパ腫細胞株2種のうち、1種はT細胞由来であり、B細胞性であるもう1種でも野生型 MamL-3 に比べてその分子量が小さい部位に発現がみられた。検索に用いた抗体はそのC末を認識するため

N 末の欠失もしくは転座が起きている可能性も考えられる。

3) Hes-1 との相関

Notch レセプター、リガンドの mRNA 発現についてターゲット遺伝子である Hes-1 との発現との相関を調べた (表1)。この中で Notch1 と Hes-1 が弱い相関が、Jagged2 とは比較的強い相関がみられた。このことは悪性リンパ腫細胞株では Notch1 と Jagged2 がシグナル活性化に重要である可能性を示している。さらに LR11 と Hes1 とも弱い相関を示していた。LR11 は濾胞性リンパ腫の一部、びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫のうち GCB type で発現がみられ、Notch 同様 γ セクレターゼで切断されることが知られており、Notch 活性化とパラレルに発現している可能性が考えられた。

表1

	vs Hes-1	coefficient*
Notch1		0.256
Notch2		-0.031
Jagged1		-0.0295
Jagged2		0.82
DLL		-0.23
LR11		0.374

* Pearson product-moment correlation coefficient

4) Mastermind の悪性リンパ腫における発現。

Mastermind-like 1, Mastermind-like 2 いずれも正常リンパ節では胚中心およびリンパ濾胞辺縁帯に発現していた。濾胞性リンパ腫では MamL1、MamL2 両方あるいは一方が細胞質内に顆粒状の発現がみられた。辺縁帯 B 細胞リンパ腫ではその発現は減弱していた。ホジキンリンパ腫では細胞質内に顆粒状に発現するパターンと細胞質内に弱い染色性を有するパターンにわかれた。前者は混合細

胞型亜型でみられたが、結節硬化型亜型には認められなかった。

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 6 件)

- ① Kawaguchi T, Ohwada C, Takeuchi M, Shimizu N, Sakaida E, Takeda Y, Sakai S, Tsukamoto S, Yamazaki A, Sugita Y, Higashi M, Fujikawa K, Matsue K, Yokote K, Tamaru JI, Bujo H, Nakaseko C. Potential utility of serum soluble LR11 as a diagnostic biomarker for intravascular large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 印刷中. 2014. PMID: 24401112. doi: 10.3109/10428194.2014.880430. 査読あり.
- ② Shimizu N, Nakaseko C, Jiang M, Nishii K, Yokote K, Iseki T, Higashi M, Tamaru J, Schneider WJ, Bujo H. G-CSF induces the release of the soluble form of LR11, a regulator of myeloid cell mobilization in bone marrow. *Ann Hematol*. 印刷中. 2014. DOI 10.1007/s00277-014-2033-0. 査読あり.
- ③ Kawaguchi T, Ohwada C, Takeuchi M, Shimizu N, Sakaida E, Takeda Y, Sakai S, Tsukamoto S, Yamazaki A, Sugita Y, Meizi Jiang M, Higashi M, Yokote K, Tamaru JI, Bujo H, Nakaseko C. LR11: a novel biomarker identified in follicular lymphoma. *British Journal of Haematology*. 印刷中. 2013. DOI: 10.1111/bjh.12467. 査読あり.
- ④ Kanemitsu N, Isobe Y, Masuda A, Momose S, Higashi M, Tamaru J, Sugimoto K, Komatsu N: "Expression of Epstein-Barr Virus-Encoded Proteins in Extranodal NK/T-cell Lymphoma, Nasal Type (ENKL): Differences in Biologic and Clinical Behaviors of LMP1-Positive and -Negative ENKL." *Clin Cancer Res*. 18(8). 2164-72 (2012), 査読有

⑤ Yamaguchi H, Kuboki Y, Hatori T, Yamamoto M, Shiratori K, Kawamura S, Kobayashi M, Shimizu M, Ban S, Koyama I, Higashi M, et. al.: "Somatic mutations in PIK3CA and activation of AKT in intraductal tubulopapillary neoplasms of the pancreas" *Am J Surg Pathol*. 35(12). 1812-7 (2011), 査読有

⑥ 東 守洋, 田丸淳一: "【分子病態からみた血液疾患診療の進歩】 ホジキンリンパ腫の病態解析の新展開" *血液内科* 62 巻 4 号. 448-454 (2011), 査読無

[学会発表] (計 3 件)

① Morihiro Higashi, Michihide Tokuhira, Takeharu Kawaguchi, Masahiro Takeuchi, Chikako Ohwada, Chiaki Nakaseko, Toshiki Watanabe, Hideaki Bujo, Masahiro Kizaki, Jun-ichi Tmaru. LR11: implications for molecular targeting therapy in lymphoma. 2nd Joint Scientific Meeting Medical University of Vienna and Chiba University (2013年02月15日). ウィーン, オーストリア.

② 東 守洋, 得平道英, 川口岳晴, 竹内正博, 大和田千佳子, 中世古知明, 武成英明, 木崎昌弘, 田丸淳一: "悪性リンパ腫における LR11 発現と意義" 悪性リンパ腫治療研究会. (2012年3月3日). 京都

③ 東 守洋, 得平道英, 川口岳晴, 竹内正博, 大和田千佳子, 中世古知明, 武成英明, 木崎昌弘, 田丸淳一: "Expression of LR11 in malignant lymphoma" 第 73 回日本血液学会学術集会. (2011年10月15日). 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東 守洋 (HIGASHI, Morihiro)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号: 00323395

(2) 研究分担者

田丸 淳一 (TAMARU, Jun-ichi)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号： 30188429