

令和元年5月29日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16188

研究課題名(和文) B細胞転写因子発現低下による原発性滲出性リンパ腫の発症・進展機構の解明

研究課題名(英文) Role of B-cell transcription factors for the development of primary effusion lymphoma

研究代表者

後藤 裕樹 (Goto, Hiroki)

熊本大学・エイズ学研究センター・厚労科研研究員

研究者番号：20734495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：原発性滲出性リンパ腫で抑制されていたPU.1、PAX5の発現を回復させたところ、試験管内およびマウスモデルの系で、リンパ腫細胞の増殖抑制作用を有することが明らかとなった。網羅的な遺伝子解析を行ったところ、PU.1は細胞死に関わる遺伝子を活性化し、PAX5は細胞周期に関わる遺伝子を抑制していた。以上より、B細胞転写因子のうち、PU.1、PAX5が、がん抑制遺伝子として機能しうるとともに、これらの遺伝子を活性化させることが原発性滲出性リンパ腫の新たな治療戦略として考えられることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

B細胞転写因子の低下が原発性滲出性リンパ腫の発がん及びウイルス潜伏につながることを明らかにできると考える。本研究によって明らかにされたB細胞転写因子の標的遺伝子は今後の薬物療法の標的となりうる。さらに、ウイルス潜伏による発がんメカニズムを解明することによって、血液内科学に留まらず、ウイルス学、薬理学、予防医学等、基礎医学から臨床医学へと様々な研究分野への学術水準の向上、疾患発症機構の理解につながる事が期待できる。

研究成果の概要(英文)：PU.1 and PAX5 are suppressed in primary effusion lymphoma (PEL). When we restored PU.1 or PAX5 expression in PEL, PU.1 or PAX5 had anti-growth effects against lymphoma cells in vitro and in vivo. PU.1 induced genes related with cell death and PAX5 inhibited genes related with cell cycles. In conclusion, among B-cell transcription factors, PU.1 and PAX5 act as tumor suppressor genes and targeting these genes could be a novel therapeutic strategy.

研究分野：血液内科学

キーワード：悪性リンパ腫 転写因子 ウイルス

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんのうち約15%はウイルスが原因とされ、なかでも、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (Kaposi sarcoma-associated herpes virus: KSHV) は B 細胞に感染し、原発性滲出性リンパ腫 (primary effusion lymphoma: PEL) を引き起こすことが知られている。KSHV は B 細胞に潜伏感染しており、リンパ腫細胞の増殖及び進展に深く関わっているとされる。PEL は細胞増殖速度が速く、胸水や腹水といった体液貯留を引き起こすことを特徴とする。さらに、通常の化学療法に抵抗性であり、その病態の全貌解明及び新たな分子標的療法の確立が急務となっている。これまでの報告では、KSHV ウイルスタンパクやサイトカインにより NF- κ B 経路、Jak-Stat 経路、PI3 キナーゼ経路等のシグナルが活性化され、腫瘍の増悪に関わること等が報告されてきた。PEL では上記の活性化シグナルが存在する一方で、B 細胞分化に重要な機能を有する転写因子の発現が低下しているとされるが、そのメカニズムや発現低下の意義については不明であった。

これまで申請者らは、高度免疫不全マウス (NOD/Rag-2/Jak3 欠損マウス: NRJ マウス) を用いた *in vivo* モデルマウスを解析し、PEL における治療抵抗性のメカニズムを研究してきた。NRJ マウスは B 細胞、T 細胞、NK 細胞といった免疫細胞が完全に欠損しており、PEL 細胞を同所移植することで、PEL の特徴である腹水形成を1ヶ月以内に認め、*in vivo* 解析に最適なモデルとなっている。PEL では、NF- κ B 経路、Jak-Stat 経路等の経路が活性化しているとされ、治療標的と考えられているが、その発症・進展機序の全貌はいまだに解明されていない。KSHV 陽性悪性リンパ腫である PEL の過去の網羅的解析から、いくつかの細胞分化に関わる転写因子の発現が低下していることが報告されている。PEL において、特に CD19 や CD20 といった B 細胞の表面マーカーの発現が低下していることから、我々はその中でも腫瘍化形成には B 細胞の分化に必須である転写因子の発現変化が重要であると仮説を立て、B 細胞転写因子の発現や機能の解析を行うこととした。

2. 研究の目的

KSHV を原因とする原発性滲出性リンパ腫 (PEL) では、従来の化学療法に抵抗性で予後が不良であり、治療開発のための病態解明が望まれている。我々はこれまで *in vitro* 及びモデルマウスの系を解析することにより、PEL における治療抵抗性シグナルの解析及び治療開発の基礎研究を行ってきた。これらの成果及び過去の報告から、種々の標的遺伝子を制御しうる転写因子の発現低下にその発がん原因がある可能性に着目した。

本研究では、*in vitro* 及び *in vivo* で B 細胞転写因子の発現を薬剤誘導性に回復させることで、(1) リンパ腫細胞の腫瘍制御機構、(2) ウイルス潜伏感染のメカニズム、(3) 治療応用を目指した基礎研究を行い、新たな治療薬開発の分子基盤につなげる。

3. 研究の方法

(1) B 細胞転写因子発現低下のメカニズム及び発現回復に伴う細胞増殖・ウイルス産生能の解析: KSHV 陽性 PEL 細胞株において、B 細胞転写因子の mRNA 及びタンパクの発現レベルを PCR、ウェスタンブロットでヒト末梢血由来の正常 (CD19 陽性) B 細胞と比較する。B 細胞転写因子のプロモーター・エンハンサー領域にはメチル化修飾を受ける CpG アイランドが存在する。これらプロモーター・エンハンサー領域のゲノム DNA に対してパイサルファイト処理した後にシークエンスを行い、メチル化領域の同定を行う。また、脱メチル化剤であるアザシチジンを PEL 細胞に *in vitro* で添加し、メチル化修飾の変化を解析する。ドキシサイクリン誘導により B 細胞転写因子の発現が回復する PEL 細胞株を樹立し、MTT 法により細胞増殖の変化を確認するとともに、Annexin V/Propidium iodide 染色を行い、フローサイトメトリーを用いて細胞死を解析する。KSHV ウイルスの潜伏感染から溶解感染に必須と報告される転写因子 RTA の発現変化について、B 細胞転写因子発現回復細胞で解析を行う。

(2) マウスモデルでの解析: B/T リンパ球・NK 細胞が欠損した高度免疫不全マウス (NOD/Rag-2/Jak3 欠損マウス等) にドキシサイクリン依存的に B 細胞転写因子を発現する PEL 細胞の移植を行う。ドキシサイクリン含有水を摂取させることで PEL 細胞において B 細胞転写因子の発現回復を行い、*in vivo* での機能解析を行う。腹水量を定量することで、腫瘍量の評価を行い、肺、肝臓、脾臓において、HE 染色やウイルスタンパクの LANA を免疫組織染色し、腫瘍細胞数をカウントすることで臓器浸潤の差を定量化する。

(3) B 細胞転写因子回復細胞における網羅的な標的遺伝子の解析: マイクロアレイで、B 細胞転写因子の発現回復によって変化する下流標的遺伝子の探索を行う。また、これらの遺伝子変化について定量 PCR 法等を用いて確認する。

4. 研究成果

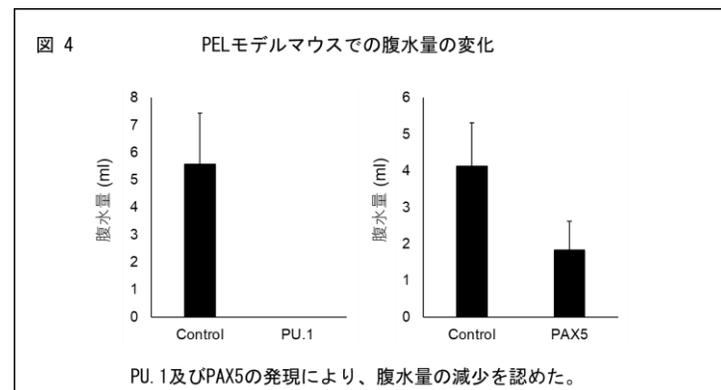
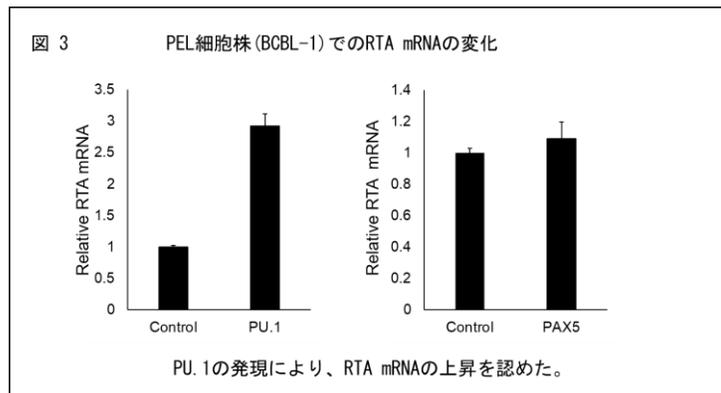
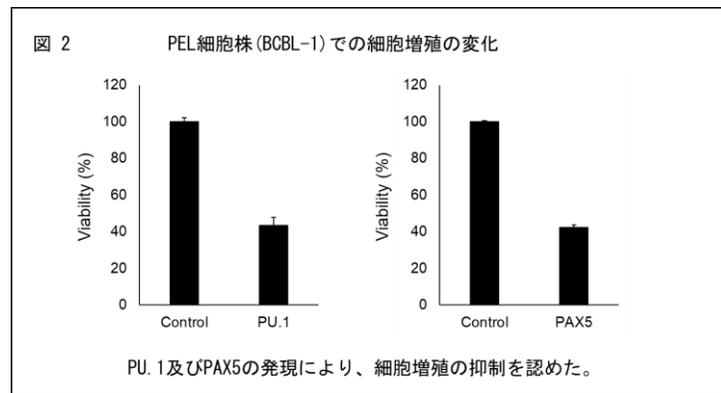
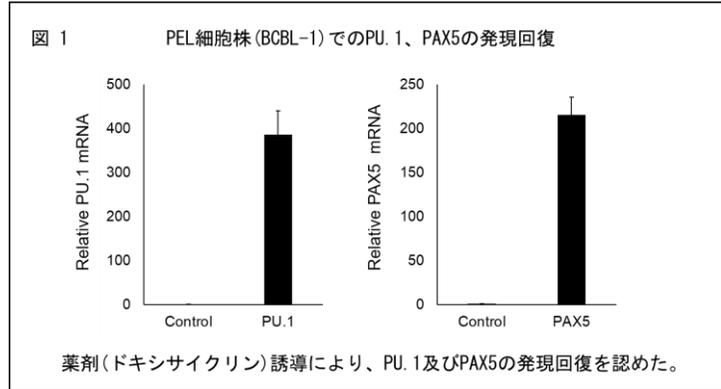
(1) PELにおいて、PU.1、PAX5のmRNA及びタンパク発現が、コントロールの正常B細胞に比べて有意に減少していた。バイサルファイトシークエンスを行ったところ、これらのプロモーター領域では、有意にCpGアイランドのメチル化を認めていた。脱メチル化剤であるアザシチジンをPEL細胞に添加すると、有意にメチル化の減少を認めるとともに、PEL細胞の増殖を抑制した。PELで抑制されていたPU.1、PAX5の発現を回復

させたところ、リンパ腫細胞の増殖抑制を*in vitro*で認めた(図1及び図2)。Annexin V/Propidium iodide染色を行い、フローサイトメトリーを用いて、解析を行ったところ、特にPU.1発現回復細胞では有意に細胞死を誘導していた。PU.1は、ウイルスの潜伏感染から溶解感染に関わる転写因子RTAのmRNAを上昇させていたが、PAX5によるRTA mRNAの変化は軽微であった(図3)。(2) PEL細胞を移植したマウスモデルの系において、PU.1、PAX5をそれぞれ発現回復させると、腹水量の減少を認めた(図4)。また、肺、肝臓、脾臓において、HE染色やウイルスタンパクのLANAを免疫組織染色し、腫瘍細胞数をカウントしたところ、有意な臓器浸潤の抑制を認めた。

(3) マイクロアレイ解析を行ったところ、PU.1はアポトーシスに関わる遺伝子を活性化することで細胞死を誘導し、PAX5は細胞周期に関わる遺伝子を抑制することで、それぞれ抗腫瘍作用を認めていた。これらの発現変化を定量PCR法でも確認した。

以上より、PELにおいて、B細胞転写因子のうち、PU.1、PAX5が、がん抑制遺伝子として機能するとともに、これらの遺伝子を活性化させることが新たな治療戦略として考えられることが明らかとなった。

今後は、PU.1及びPAX5の詳細な抗腫瘍メカニズムを明らかにするとともに、治療応用が可能か、低分子化合物や天然物等による新たな治療薬剤の探索を行っていく。また、KSHVウイルスタンパクであるLANA、vFLIP、vCyclinはウイルス潜伏感染維持において重要な役割を果たすと同時に、腫瘍化への関与が示唆されている。これらのウイルスタンパクをヒトB細胞の細胞株等に遺伝子導入し、B細胞転写因子及び標的遺伝子がどのように変化するかについて、解析を行い、ウイルスタンパクが腫瘍化を引き起こすメカニズムについて明らかにする。これらの解析を行うことにより、PELの発症機序が解明されるとともに、同定された候補薬剤が治療に応用されうると考えられる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計2件）

① Goto H, Nishio M, To Y, Oishi T, Miyachi Y, Maehama T, Nishina H, Akiyama H, Mak TW, Makii Y, Saito T, Yasoda A, Tsumaki N, Suzuki A. Loss of Mob1a/b in mice results in chondrodysplasia due to YAP1/TAZ-TEAD-dependent repression of SOX9.

DOI: 10.1242/dev.159244

Development. 16;145(6):2018. [査読有]

② Kudo E, Taura M, Suico MA, Goto H, Kai H, Okada S. Transcriptional regulation of HIV-1 host factor COMMD1 by the Sp family.

DOI: 10.3892/ijmm.2018.3386

Int J Mol Med. 41(4);2366-2374:2018. [査読有]

〔学会発表〕（計1件）

① 岡田 誠治、刈谷 龍昇、後藤 裕樹. 原発性滲出性リンパ腫におけるエピジェネティック制御の破綻

第22回造血器腫瘍研究会、横浜、2018年1月26日

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。