

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591113

研究課題名 (和文) 6 番染色体長腕に位置する新たなリンパ腫関連遺伝子 TFL の機能解析

研究課題名 (英文) Functional analysis of the novel lymphoma-associated gene, TFL, on the long arm of chromosome 6

研究代表者

山本 克也 (KATSUYA YAMAMOTO)

神戸大学・大学院医学研究科・非常勤講師

研究者番号：60306199

研究成果の概要：

我々は形質転換した濾胞性リンパ腫におけるIgK遺伝子との染色体転座から、6q25に位置しリンパ球に発現する新規癌抑制遺伝子候補TFLを同定した。TFLには2つのスプライスバリエントP58<sup>TFL</sup>、P36<sup>TFL</sup>が存在し、いずれもBa/F3やJurkat細胞に過剰発現させると、Rbリン酸化の抑制を介してG1期からS期への移行が抑制された。またP58<sup>TFL</sup>は細胞質内に顆粒状に存在し、P-bodyマーカーとの共局在も認められた。CCCHタイプのジンクフィンガーを有しP-bodyと局在するP58<sup>TFL</sup>は、Rbの上流の分子の転写後調節を介して、細胞増殖の制御に重要な役割を果たすと考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：TFL 遺伝子、遺伝子導入、細胞周期、細胞内局在、癌抑制遺伝子、アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 研究の背景

造血器腫瘍では病型に特異的な染色体異常が認められ、転座に伴う新たな融合遺伝子の形成や転座部位近傍の遺伝子の異常発現が腫瘍の発症・進展に関与すると考えられている。近年の細胞遺伝学・分子生物学的技術の発展に伴い、頻度の高い染色体転座のほとんどにおいてその切断点がクローニングさ

れ、腫瘍の発症機序が明らかにされつつある。例えば最も高頻度に発生する悪性腫瘍である悪性リンパ腫においては、BCL2, BCL6, MYC等の腫瘍関連遺伝子が同定され、腫瘍化における役割が解明されている。しかし頻度の高くない染色体転座や腫瘍の進展にかかわる変異については、未だ十分には解析されず不明な点が多い。我々は造血器腫瘍を分子細胞遺伝学的に解析して多くの疾患特異的な染

染色体異常を見出し、その臨床的意義について検討を行ってきた。

非ホジキンリンパ腫(NHL)の一病型である濾胞性リンパ腫(FL)では、t(14;18)(q32;q21)が80-90%の症例で認められ、転座の結果IgH遺伝子近傍に移動したBCL2遺伝子の過剰発現がアポトーシスを抑制し腫瘍化に関与する。しかしBCL2の異常だけではFLは発症せず、他の遺伝子変異も必要と考えられている。またFLは最初に緩慢な経過を辿るが、多くは最終的にびまん性大細胞型リンパ腫(DLCL)へ移行し急速に病勢が進行する。この際+der(18)t(14;18), +7等の新たな染色体異常やp53, BCL2遺伝子等の変異が見られることが知られており、多段階発癌の一つのモデルともなっている。一方6番染色体長腕の欠失(del(6q))はNHLの15-20%に認められ、最も高頻度に認められる二次的な染色体異常の一つである。FLからDLCLへの移行時にも多く見出され、6q23-26に欠失を有するFLはDLCLへ移行するriskが有意に高く、予後も不良であることが報告されている。これらの結果から、6q23-26の欠失がFLの病勢の進展にかかわり、癌抑制遺伝子がこの領域に存在する可能性が長年示唆されてきたが、欠失領域は長大であるため解析は困難で、標的遺伝子は同定されていなかった。

我々はt(14;18)(q32;q21)の稀なvariantであるt(18;22)(q21;q11)を有するFLからDLCLへ移行した症例において、今まで報告のない新たな転座t(2;6)(p12;q23)を見出した。2p12には免疫グロブリンK鎖(IgK)が位置しており、6q23も上述のようにFLで高頻度に欠失等の異常が見られる領域である。またもう一方の6番染色体はi(6)(q10)となり6qは欠失していた。したがって6q23に存在する未知の遺伝子が①癌抑制遺伝子であり転座に伴い不活性化されたか、②他のリンパ系腫瘍で認められるのと同様に、IgK遺伝子の近傍に移動して異常発現を来したか、いずれかの機序でFLの進展にかかわったと考えられた。本症例の転座切断点を解析することによりNHLにおける6q異常の分子機構を解明する手がかりが得られると期待した。

## (2) これまでの研究成果

患者リンパ節よりDNAを抽出しサザンプロットにてIgK(Ck)の再構成を確認した。そこでCkプローブにて患者DNAから作成したゲノミックライブラリーをスクリーニングし、2p12と6q25の遺伝子断片からなるクローンを得た。即ちGバンドで6q23と予想された切断点は6q25であった。この切断点はヒトゲノムデータベースの検索により未知の遺

伝子のエクソンの間に存在することが判明し、この遺伝子をTFL(Transformed Follicular Lymphoma)と命名した。6q25の切断点はTFLの第2イントロンに存在し、IgKの切断点はVk1-33とVk3-34の間であり、der(6)t(2;6)上で両遺伝子がhead to headで融合していた[発表論文④]。さらにTFLは、肺癌における癌抑制遺伝子としてLOH解析により同定されたZC3H12Dのsplice variantであることが判明した(Cancer Res 2007; 67: 93)。また同じfamilyに属するZC3H12Aが心筋のapoptosisに関与することも報告され(Circ Res 2006; 98: 1177)、造血器腫瘍においてもTFLが癌抑制遺伝子として機能する可能性が示された。次いでTFLの発現を解析したところ、脾臓・胸腺・リンパ節などのリンパ組織に集中して強い発現を認め、また骨髓系とB細胞系細胞株にも発現を認めた。したがってTFLはリンパ球特異的に発現し、リンパ球分化に従ってその発現が増加すると予想された。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が初めてクローニングに成功した6q25に位置するTFL遺伝子の機能とリンパ腫発症において果たす役割を、これまでの研究成果を踏まえてさらに解析を進めることにある。そのため今後2年間の研究期間の間にTFL遺伝子がどの分子をターゲットにして細胞の分化や増殖にかかわっているのかを明らかにする。さらに当該遺伝子ノックアウトマウスの作成により、正常リンパ組織における生理機能を解析する。また臨床検体及び細胞株においてTFLの発現や欠失の有無等を検索し、その臨床的意義を明らかにすることでリンパ腫の診断へ応用したい。上記の様に6q23-26の欠失がFLの進展に重要な領域であることは判明しているが、欠失範囲は広大であるため存在が予想される癌抑制遺伝子の同定は極めて困難であり、共通欠失領域の中からも未だに見出されていない。我々が転座切断点の解析から6qのリンパ腫関連遺伝子にアプローチを試み、リンパ球に特異的に発現するTFL遺伝子のクローニングに至った点は非常にユニークといえる。当初TFL遺伝子は他の免疫グロブリン関連転座で見られるように過剰発現していると予想されたが、TFLの翻訳開始を妨げる形でIgKと転座していること、もう一方の6qが欠失していることからTFLが癌抑制遺伝子である可能性も示唆される。またFLでは抗アポトーシス作用を持つBCL2の高発現がみられるが、DLCLへ病期が進行する際に加わる

遺伝子変化の一つとして TFL の変異が考えられ、BCL2+TFL は多段階発癌のモデルともなりうる。したがって、本研究はリンパ腫の発症機序の解明と共に、新しい診断・治療法の開発に寄与すると考えられる。

### 3. 研究の方法

#### (1) TFL cDNA クローニングと発現

ヒトリンパ節から RNA を抽出し、TFL の primer を用いて RT-PCR を行い 2 種類の cDNA, TFL1 と TFL2 をクローニングした。さらにヒト末梢血から作成した cDNA ライブラリーのスクリーニングも行い cDNA の 3' UTR を確認した。ヒト TFL2 の cDNA とそのホモログであるマウス TFL cDNA をプローブとしてノーザンブロット解析を行い TFL mRNA の発現を検討した。

さらに GST と融合させた TFL 蛋白を用いてポリクローナル抗体を作成し精製した。この抗体を用いて各種細胞株における TFL 蛋白の発現も解析した。

#### (2) TFL の細胞周期に関する機能解析

TFL/GFP 融合遺伝子を発現するベクターを構築し、Ba/F3 細胞に導入して GFP 発現細胞の増殖を調べた。さらに細胞周期との関連を検討するため、BrdUrd アッセイを行った。即ち Ba/F3 細胞を IL-3 欠失により G0-G1 期に同調させた後で TFL/GFP ベクターを導入し、IL-3 を加え 16 時間培養した後に BrdUrd の取り込みを解析した。リン酸化 Rb はフローサイトメトリーにて解析した。

#### (3) TFL のアポトーシスに関する解析

TFL 導入細胞のアポトーシスを評価するため、アネキシン V、活性化カスパーゼ 3 を用いフローサイトメトリーにて解析した。

#### (4) TFL の細胞内局在

TFL/GFP ベクターを HeLa 細胞に導入し GFP の発現により細胞内局在を調べた。また HA タグをつけた EIF2C2, DCP1A, TIA ベクターを TFL と一緒に細胞へ導入し共局在の有無を検討した。

#### (5) TFL ノックアウトマウスの解析

ターゲットイングベクターの作成から ES 細胞のスクリーニングを終了し、インジェクションの結果 TFL ノックアウトマウスが得られた。

### 4. 研究成果

#### (1) TFL の splice variant とその発現

我々はヒト正常リンパ節の cDNA および末梢血リンパ球の cDNA ライブラリーをもちいて TFL cDNA のクローニングを行い、TFL には少なくとも 2 つのスプライズバリエーション TFL1,

TFL2 が存在することを見出し、それぞれ発現する蛋白の分子量に基づいて p58TFL、p36TFL と名付けた。ノーザンブロットの解析では TFL の発現は主にリンパ節・末梢血リンパ球やヒト白血病の骨髄系・B 細胞系細胞株において認められ、マウスでは胸腺、脾臓に強い発現を認めた。また、いくつかの細胞株では TFL 発現が欠失していた。

次に TFL に対するポリクローナル抗体の精製を行いウエスタンブロット・免疫沈降にて TFL 蛋白のバンドを検出した。細胞の種類による TFL 蛋白の発現パターンは、ノーザンブロットでの TFL mRNA での発現と同様な結果が得られたが、内在性に主に発現が認められたのは p58TFL であった。

#### (2) TFL の細胞周期に関する機能解析

ヒトの TFL と GFP の融合遺伝子を発現するベクターを構築し、TFL を発現していないマウス pro-B 細胞株である BaF3 に遺伝子導入し、p58TFL と p36TFL 両方の TFL を過剰発現させた。すると TFL を導入した細胞では GFP 発現細胞が著しく減少した。これらの細胞でチミジンの取り込みを調べたところ、TFL 遺伝子導入群で有意に取り込み低下が認められた。また BrdUrd の解析において、細胞同調後のアッセイでは TFL 導入群において G0/G1 期の細胞を多く認め、S 期の細胞は有意に減少していた。これらの結果から、TFL はリンパ球の細胞周期 G1 期から S 期への移行を抑制し、細胞を G1 期に留めておくことが明らかになった。

さらに Rb のリン酸化を調べると TFL は Rb のリン酸化を抑制することが分かり、その結果細胞増殖が抑制されることが示唆された。この現象は NIH3T3 細胞においてもみられ、Ba/F3 特異的でないことが明らかとなった。

#### (3) TFL のアポトーシスに関する解析

TFL を導入した Ba/F3 細胞はアネキシン V の増加とともに活性化カスパーゼ 3 の上昇も認め、TFL によりアポトーシスが誘導されることが明らかになり、正常リンパ球細胞株において TFL は細胞増殖に抑制的に働くことが示された。次に腫瘍化した細胞においての TFL の働きを明らかにするために TFL を発現していないヒト白血病細胞株の Jurkat を用いて、同様に上記二種類の TFL を過剰発現させたところ、いずれも細胞増殖を抑制しアポトーシスを誘導した。すなわち TFL は正常細胞のみならず腫瘍細胞においても細胞増殖を抑制しており、癌抑制遺伝子として機能する可能性が考えられた。

#### (4) p58TFL の細胞内局在

GFP との融合蛋白を用いて p58TFL の HeLa

細胞内での局在を調べると、TFL は細胞質内に顆粒状に局在しており、P-body マーカーとして知られる Argonaute 2 (AGO2) のヒトホモログである eukaryotic translation initiation factor 2C (EIF2C2) や decapping-enzyme homolog A (DCP1a) との共局在が認められた。しかしながら Stress granule のマーカーである T cell intracellular antigen-1 (TIA-1) とは近接しているものの、局在は一致しなかった。p36TFL については全く局在が異なり主に核内に発現が認められた。

P-body とは近年マイクロ RNA や siRNA の機能発現の場として知られるようになった細胞質内の顆粒で Stress granule と共役して mRNA の分解なども行っていることが知られている。TFL は CCCH タイプのユニークなジンクフィンガーを持つ蛋白であり同様のモチーフを持つ蛋白として Tristetraproline (TTP) が知られている。TTP は TNF- $\alpha$  の 3' -UTR に結合する RNA 結合蛋白であり RNA の分解を促進する機能が知られている。また、TTP は P-body や Stress granule に局在することが報告されている。

P-body への局在と RNA 結合型 CCCH タイプジンクフィンガーモチーフの存在により p58TFL は P-body に存在し細胞増殖の調節において転写後調節を行いながら Rb の上流の分子の機能を調節している可能性が示唆された。そのメカニズムは 3' -UTR への結合による mRNA の分解なのかマイクロ RNA による翻訳抑制なのかは現時点では明らかでないが今後 TFL の標的分子を同定することでさらに詳細な機能が判明するものと思われる。

#### (5) TFL ノックアウトマウスの解析

TFL ノックアウトマウスは正常に生まれ、現在正常に成長を続けている。

## 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 Minagawa K, Katayama Y, Nishikawa S, Yamamoto K, Sada A, Okamura A, Shimoyama M, Matsui T. Inhibition of G1 to S phase progression by a novel zinc finger protein, p58<sup>TFL</sup> at P-bodies. **Molecular Cancer Research**, in press, 査読有.
- ② Yamamoto K, Okamura Y, Katayama Y, Shimoyama M, Matsui T. Unbalanced whole-arm translocation der(5;19) (p10;q10) is a novel and recurrent

cytogenetic aberration in myelodysplastic syndrome. **Leukemia Research**; 33: 377-383, 2009, 査読有.

- ③ Yamamoto K, Yakushijin K, Nishikawa S, Minagawa K, Katayama Y, Shimoyama M, Matsui T. Imatinib resistance in a novel translocation der(17)t(1;17)(q25;p13) with loss of *TP53* but without *BCR/ABL* kinase domain mutation in chronic myelogenous leukemia. **Cancer Genetics and Cytogenetics**; 183: 77-81, 2008, 査読有.
- ④ Minagawa K, Yamamoto K, Nishikawa S, Ito M, Sada A, Yakushijin K, Okamura A, Shimoyama M, Katayama Y, Matsui T. Deregulation of a possible tumor suppressor gene, *ZC3H12D*, by translocation of *IGK@* in transformed follicular lymphoma with t(2;6)(p12;q25). **British Journal of Haematology**; 139: 161-163, 2007, 査読有.
- ⑤ Yamamoto K, Okamura A, Kawano H, Katayama Y, Shimoyama M, Matsui T. A novel t(8;18)(q13;q21) in acute monocytic leukemia evolving from constitutional trisomy 8 mosaicism. **Cancer Genetics and Cytogenetics**; 176: 144-149, 2007, 査読有.
- ⑥ Yamamoto K, Ono K, Katayama Y, Shimoyama M, Matsui T. Derivative (3)t(3;18)(q27;q21)t(18;16)(q21;?) involving the *BCL2* and *BCL6* genes in follicular lymphoma with t(3;14;18)(q27;q32;q21). **Cancer Genetics and Cytogenetics**; 179: 69-75, 2007, 査読有.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 山本克也、「不均衡転座 der(5;19)(p10;q10) は MDS における新たな再発性の染色体異常である」、第 70 回日本血液学会総会、平成 20 年 10 月 12 日、国立京都国際会館。
- ② 山本克也、「先天性トリソミー 8 モザイクより発症し、新たな転座 t(8;18)(q13;q21) の出現を認めた急性単球性白血病」、第 69 回日本血液学会総会、平成 19 年 10 月 11 日、パシフィコ横浜。

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 克也 (YAMAMOTO KATSUYA)  
神戸大学・医学部・非常勤講師  
研究者番号：60306199

(2) 研究分担者

松井 利充 (MATSUI TOSHIMITSU)  
神戸大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：10219371

(3) 連携研究者

なし