

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 年度～2011 年度

課題番号：21591225

研究課題名（和文） マルトリンパ腫における抗アポトーシス作用の分子機構の  
解明と臨床応用研究課題名（英文） Molecular mechanism of anti-apoptotic action in MALT lymphoma and  
clinical application

研究代表者

細川 好孝 (Yoshitaka Hosokawa)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：60229193

研究成果の概要（和文）：

我々は、まずマルトリンパ腫の転座点 18q21 の領域から新規遺伝子 MALT1 を単離し、引き続き、このリンパ腫に高頻度に認められる t(11;18) 転座の実態が API2-MALT1 キメラ分子の形成にあることを実証した。その後一環して API2-MALT1 キメラ分子に関する分子生物学的ならびに臨床病理学的研究を展開してきた。本研究は、API2-MALT1 キメラ分子の下流シグナル伝達系、特に申請者自身が実証した細胞死抑制の分子機構を解析し、最終的には、その基礎的研究成果に立脚した分子標的療法を目指した臨床応用を図ることを目的としている。次いで、API2-MALT1 は、生理的な BCL10/MALT1 抗原受容体シグナル経路をバイパスすることによって、抗原非依存性に NF- $\kappa$ B を活性化することを明らかにした。さらに、申請者は API2-MALT1 が細胞死抑制を発揮する分子メカニズムとして、抗原受容体シグナル伝達経路をバイパスすることで NF- $\kappa$ B を活性化する経路と Smac 等のアポトーシス制御分子に直接会合することで会合分子の機能を阻害する経路の二つの独立した経路が働いていることを明らかにした。今後は、API2-MALT1 の下流シグナル伝達系ならびに NF- $\kappa$ B を介した標的遺伝子のさらなる探索を行い、分子標的治療開発へ向けて研究を継続したい。

研究成果の概要（英文）：

Four recurrent chromosomal translocations, t(11;18)(q21;q21), t(1;14)(p22;q32), t(14;18)(q32;q21), and t(3;14)(p14.1;q32) have been implicated in the pathogenesis of mucosa associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. We have identified an API2-MALT1 chimeric oncoprotein in the t(11;18)(q21;q21) translocation. The API2-MALT1 can bypass this usual BCL10/MALT1 cellular signaling pathway linked to NF- $\kappa$ B activation, thereby inducing antigen receptor-independent proliferation of lymphocytes. Moreover, API2-MALT1-induced NF- $\kappa$ B activation may contribute to anti-apoptotic effect through NF- $\kappa$ B-mediated upregulation of apoptotic inhibitor genes. In fact, we recently demonstrated that API2-MALT1 can induce transactivation of the API2 gene through NF- $\kappa$ B activation, thus highlighting a novel positive feedback-loop mechanism of self-activation by up-regulating its own expression in t(11;18) MALT lymphomas. We also demonstrated that API2-MALT1 possesses anti-apoptotic effect, in part, through its direct interaction with apoptotic regulators. We therefore hypothesize that anti-apoptotic effect by API2-MALT1 may be mediated by in one way its interaction with apoptotic regulators as well as by in another way its self-activation resulting in unremitting NF- $\kappa$ B activation. Finally, further studies can be expected to stimulate research into the development of therapeutic drugs

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：内科学

科研費の分科・細目：血液内科

キーワード：マルトリリンパ腫/アポトーシス/プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

本研究は、悪性リンパ腫の転座関連がん遺伝子 API2-MALT1 融合遺伝子の機能を明らかにすることにより、悪性リンパ腫の診断、治療の実現へ向けての臨床応用を図ることを目的としたものである。我々は、MALT リンパ腫の染色体転座 t(11;18)(q21;q21)の本態が API2-MALT1 遺伝子融合であることを世界に先がけて明らかにし、次いで API2 ならびに MALT1 に対するモノクローナル抗体を作製すると共にキメラ遺伝子を検出するための高感度 RT-PCR 法を樹立した。また、免疫沈降法と LC-MS/MS (液クロと質量分析計を繋げた蛋白解析装置) を組み合わせて、API2-MALT1 に結合する蛋白質として、アポトーシスに深く関わる Smac, Htra2, Hsp71 を同定してきた。さらに、API2-MALT1 に抗アポトーシス作用があることを世界に先駆けて実証した。この抗アポトーシス作用の分子的基盤には、Smac を介したミトコンドリア経路と NF-κB 活性化経路の二つの経路が関与しているとの仮説を提唱した。API2-MALT1 融合遺伝子ならびに BCL6 遺伝子の研究は、悪性リンパ腫の新しい診断法の開発に結びつくだけでなく、BCL1, BCL2 の研究が細胞周期やアポトーシス研究を先導したように、生命科学における新しいパラダイムを生み出す可能性を大いに秘めている。

2. 研究の目的

本研究は、我々自身が単離した API2-MALT1 融合遺伝子の機能を明らかにすることにより、悪性リンパ腫の診断、治療へ向けての臨床応用を実現することを目的としている。

粘膜関連リンパ組織 (MALT) に発生する低悪性度 B 細胞リンパ腫である MAL リンパ腫は、節外性臓器に発生する悪性リンパ腫の主要な部分を占め、臨床的にも非常に注目を集めているリンパ腫である。我々は、MALT リンパ腫に高頻度に認められる染色体転座 t(11;18)(q21;q21) を詳細に解析し、t(11;18)(q21;q21) によって生ずる遺伝子変

化の本態が API2-MALT1 遺伝子融合であることを世界に先がけて明らかにした。API2 ならびに MALT1 に対するモノクローナル抗体を作製すると共にキメラ遺伝子を検出する高感度 RT-PCR 法を樹立した。さらに、MALT1 はユビキチン化されてプロテアソームで急速に分解されるが、一度 API2-MALT1 キメラが形成されると安定化され、その半減期が著しく延長することを見出した。また、免疫沈降法と LC-MS/MS (液クロと質量分析計を繋げた蛋白解析装置) を組み合わせて、API2-MALT1 に結合する蛋白質として、アポトーシスに深く関わる Smac, Htra2, Hsp71 を同定してきたので、そのシグナル伝達系の解明も行っていく。国際的には、ドイツのグループが MALT リンパ腫の染色体転座 t(11;18)(q21;q21) から API2-MLT 融合遺伝子 (MALT1 と MLT は同一遺伝子) を単離している (Blood, 1999)。しかし、世界的にもその機能にまで及んだ研究は皆無である。今後、API2-MALT1 融合遺伝子による MALT リンパ腫発生の分子的機構を明らかにしていくと同時に、新しい診断、治療へ向けての臨床応用を図っていくことを目的とする。

3. 研究の方法

- 1) API2-MALT1 会合分子の解析  
免疫沈降法と LC-MS/MS を組み合わせたプロテオミクスの手法を用いて、API2-MALT1 に結合する蛋白質として、アポトーシスに深く関わる Smac, HtrA2, TRAF2, Hsp70, KIAA1892 を同定してきた。それぞれの分子の機能を強制発現系や SiRNA による発現抑制系を用いて検討する。
- 2) API2-MALT1 下流シグナル伝達系の解析:  
NEMO のユビキチン化 API2-MALT1 分子から NEMO のユビキチン化に至るシグナル分子を同定していく。
- 3) API2-MALT1 下流標的遺伝子の解析  
申請者は、HeLa 細胞に API2-MALT1 安定発現株を樹立し、この細胞株を用いた cDNA マイ

クローレイ法を実施し、その結果 API2-MALT1 下流標的の候補遺伝子を多数同定した。これらの標的遺伝子は、MALT リンパ腫における診断や分子標的療法のための新たなターゲットとなる可能性が高い。

4) Smac 経路ならびに NF- $\kappa$ B 活性化経路による抗アポトーシス作用の検討 申請者は API2-MALT1 の細胞死抑制を発揮する分子メカニズムとして、抗原受容体シグナル伝達経路をバイパスすることによって NF- $\kappa$ B を活性化する経路と Smac などのアポトーシス制御分子に直接会合することで会合分子の機能を阻害する経路の二つの独立した経路があることを提唱した。そこで、実際にこの二つの経路がどの程度細胞死抑制作用に寄与しているかを検討する。

#### 4. 研究成果

染色体転座関連がん遺伝子 BCL6 ならびに我々自身が単離した API2-MALT1 融合遺伝子の機能を解明することにより、悪性リンパ腫の診断、治療への臨床応用を実現することを目的として以下の諸点を明らかにした。

1) MALT リンパ腫に高頻度に認められる染色体転座 t(11;18)(q21;q21) の本体が API2-MALT1 遺伝子融合であることを明らかにした。API2-MALT1, API2, MALT1 それぞれを tag を付加した発現ベクターを用いて各種細胞株にトランスフェクトし蛋白質の安定性を検討したところ、API2, MALT1 は proteasome 阻害剤の添加により半減期の延長が観察された。一方、API2-MALT1 キメラは proteasome 阻害剤を添加しなくても半減期の延長がみられた。また、細胞内局在を検討したところ、API2 は核と細胞質に局在したが、API2-MALT1 キメラの形成によって局在は細胞質へ移動した。

2) 我々は、これまでに免疫沈降法と LC-MS/MS を組み合わせたプロテオミクスの手法により、API2-MALT1 に会合する蛋白質の同定に成功し、すでに報告した。これらは、アポトーシスに深く関わる Smac, HtrA2, TRAF2, Hsp70 であった。同様な手法を駆使することによって、CARMA1, BCL10, MALT1, NEMO に会合する新しい分子を同定する準備は十分に整っており、そのような新規分子はすべて分子標的療法にとって理想的な標的分子となり得る。

3) API2-MALT1 下流シグナル伝達系の解析：NEMO のユビキチン化の解析 抗原受容体シグナル BCL10/MALT1 の下流において、MALT1 自身あるいは TRAF6 による NEMO (IKK 複合体の調節サブユニット) のユビキチン化が NF- $\kappa$ B 活性化に不可欠であることが相次いで報告された (Nature2003, Mol. Cell 2004)。

また、NEMO のユビキチン化部位として、399

番目のリジン残基が候補部位であることが同時に報告された。申請者らも、399 番目リジン残基に変異をもつ NEMO 発現ベクターを構築して同様な検討を行ったが、意外にも Nature の報告とは反する結果を得た。そこで、新たにリジン残基に変異をもつ NEMO 発現ベクターを総計 15 ヶ構築して検討した結果、NEMO のユビキチン化部位と思われる新しい標的候補部位を同定することに成功した。

#### 4) API2-MALT1 抗アポトーシス作用

我々は API2-MALT1 安定発現株を樹立し、この細胞株を用いて API2-MALT1 が抗アポトーシス作用を有することを世界に先駆けて実証した。次に、この安定発現株を用いて cDNA マイクロアレイ法を行い、API2-MALT1 下流標的候補遺伝子を同定することに成功した。引き続き、遺伝子上流の各種欠失ならびに NF- $\kappa$ B 部位に変異を導入したコンストラクトを用いたレポーターアッセイを行い、現在までに少なくとも 4 つの API2-MALT1 下流標的遺伝子を同定している (投稿準備中)。これらの標的分子も MALT リンパ腫の診断治療に役立つマーカーや分子標的療法のターゲットとなる可能性がある。

#### 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 5 件)

1. Murakami K, Tsubouchi R, Fukayama M, Qiao S, Yoshino M. Iron-dependent oxidative inactivation with affinity cleavage of pyruvate kinase. Biol Trace Elem Res 130, 31-38, 2009 査読有
2. Yoshino M, Murakami K. A graphical Method for determining inhibition constants. Journal of Enzyme Inhibition and Medical Chemistry 24(7), 1288-90, 2009 査読有
3. Murakami K:Haneda M: Iwata S:Yoshino M Effect of hydroxy substituent on the prooxidant action of naphthoquinone compounds Toxicology in Vitro 24, 905-9, 2010 査読有
4. Karnan S, Mohseni M, Konishi Y, Tamaki A, Hosokawa Y, H. Park B, Konishi H. Controversial BRCA1 allelotypes in commonly used breast cancer cell lines. Breast Cancer Res Treat 119, 249-51, 2010 査読有
5. Hiroyuki Konishi; Morassa Mohseni; Akina Tamaki; Joseph P, Garay; Sarah Croessmann; Sivasundaram Karnan; Akinobu Ota; Hong Yuen Wong; Yuko Konishi; Berdy Karakas; Khola Tahir; Abde M. Abukhdeir; JohnP. Gustin; Justin Cidado; Grace M.

Wang; David Cosgrove; Rory Cochran; Danijela Jelovac; Michaela J. Higgins; Sabrina Arena; Laeren Hawkins; Josh Lauring; Amy L. Gross; Christopher M. Heaphy; Yoshitaka Hosokawa; Edward Gabrielson; Alan K. Meeker; Kala Visvanathan; Pedram Argani; Kurtis E. Bachman; Ben Ho Park. Mutation of a single allele of the cancer susceptibility gene *BRCA1* leads to genomic instability in human breast epithelial cells, PNAS, 10. 1073, 2011 査読有

〔学会発表〕(計 18 件)

1. 村上恵子、坪内凉子、細川好孝、吉野昌孝; アロエ成分のアントラキノン化合物による活性酸素種の生成 日本微量栄養学会第 26 回学術集会 2009. 6. 5, 京都
2. 小西裕之;細川好孝; 遺伝子改変ヒト細胞株単離の新技术とその癌研究における利用 第 68 回日本癌学会学術総会 2009. 10 横浜
3. 村上恵子;坪内凉子;深山 実;喬 善楼;細川好孝;吉野昌孝; 還元型銅イオンを介したパン酵母 Glutathione reductase の酸化失活と部位特異的切断 第 82 回日本生化学会大会 2009. 10 神戸
4. 喬 善楼;小田倫江;笠原愛加;江口泰子;村上恵子;吉野昌孝; ミモシンによるミトコンドリア経路を介したグリオーマ細胞のアポトーシス誘導 第 82 回日本生化学会大会 2009. 10 神戸
5. Karnan Sivasundaram;小西裕之;瀬戸加大;細川好孝; 急性前骨髄球性白血病におけるゲノムワイドアレイ CGH 解析 第 82 回日本生化学会大会 2009. 10 神戸
6. 小西裕之、細川好孝; ヒト培養細胞遺伝子改変の新しい技術とその医学研究における応用 第 82 回日本生化学会大会 2009. 10 神戸
7. 村上恵子;細川好孝;吉野昌孝; ポリアミンの細胞毒性 日本微量栄養学会 2010. 6. 5 京都
8. 小西裕之;シバサンダラン カルナン;細川好孝; ヒト培養細胞遺伝子改変の新技术を用いた癌関連遺伝子の機能解析 第 69 回日本癌学会学術集会, 2010. 9. 22, 大阪
9. Hiroyuki Konishi, Sivasundaram Karnan, Miyuki Takahashi, Damdindorj Lkhagvasuren, Yuko Konishi, Yoshitaka Hosokawa, Functional analyses of cancer genes using a new procedure of somatic cell gene targeting in human cell lines 第 83 回日本生化学会大会, 2010. 12. 7 神戸
10. 村上恵子;細川好孝;吉野昌孝 ポリアミンと一価カチオンによるグルタチオンレ

ダクターゼの活性調節 第 83 回日本生化学会大会, 2010. 12. 7, 神戸

11. Hiroyuki Konishi and Yoshitaka Hosokawa A new protocol of somatic cell gene targeting in human cell lines and its application to breast cancer research The 15th Japan-Korea Cancer Research Workshop, 2010. 12. 21, 仁川 (大韓民国)
12. 村上恵子, 細川好孝, 吉野昌孝 ヒドロキソケトン化合物による活性酸素生成 日本微量栄養学会第 28 回学術集会 2011. 6. 11 京都
13. 小西裕之;Sivasundaram Karnan;細川好孝;Park Ben H. BRCA1 ヘテロ変異によってヒト乳癌上皮細胞にゲノム不安定性が発生する 第 84 回日本生化学会大会, 2011. 9. 22 京都
14. 村上恵子;細川好孝;吉野昌孝; ピリジン還化合物による活性酸素生成と阻害 第 84 回日本生化学会大会, 2011. 9. 22 京都
15. 喬善楼;村上恵子;山下均;妹尾久雄;吉野昌孝; Mimosine-induced apoptosis in C6 glioma cells requires the release of mitochondria-derived reactive oxygen species and the activation of p38, JNK activation. 第 84 回日本生化学会大会, 2011. 9. 22 京都
16. Sivasundaram Karnan; 小西裕子;高橋美裕希;Damdindorj Lkhagvasuren;細川好孝;小西裕之; ヒト体細胞株における PIGA 遺伝子を利用した遺伝子ターゲティング効率定量系の作成 第 84 回日本生化学会大会, 2011. 9. 24 京都
17. 小西裕之;Sivasundaram Karnan;細川好孝; BRCA1 ヘテロ変異はヒト乳腺上皮細胞のゲノム不安定性を誘導する 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011. 10. 4 名古屋
18. 太田明伸;山本雅樹;今井伸一;小西裕之;細川好孝;小海康夫; CCL8 濃度と CCL8 陽性細胞の増加はマウス肺の GVHD 病態と密接に関与する. 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011. 10. 4 名古屋

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細川 好孝 (Yoshitaka Hoosokawa)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号: 60229193

(2) 研究分担者

村上恵子 (Keiko Murakami)  
愛知医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：10139652  
(3)連携研究者 なし