

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 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590338

研究課題名（和文） DNA 組換え因子 dbpA の Hodgkin リンパ腫における役割

研究課題名（英文） A role of dbpA, DNA binding protein in Hodgkin lymphoma

研究代表者

百瀬 修二（MOMOSE SHUJI）

順天堂大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：70360344

研究成果の概要（和文）：大腸菌で DNA の組換えに関わると考えられている dbpA (DNA-binding protein A) の発現が、ヒトにおいて活性化リンパ球の指標となる CD30 陽性細胞の染色態度とリンパ組織において類似していることを見出し、さらに CD30 陽性の悪性リンパ腫（Hodgkin リンパ腫;HL など）においても高頻度に発現していた。HL では NFκB シグナル伝達系の恒常的活性化が知られているが、dbpA が NFκB シグナル伝達系の下流で発現・機能すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：dbpA, DNA-binding protein A is believed to be involved in DNA recombination in *E. Coli*. We found dbpA is highly expressed in CD30 positive lymphocytes, which is restricted to activated lymphocyte in normal tissue. Also dbpA is highly expressed in CD30+lymphoma, classical Hodgkin lymphoma and anaplastic lymphoma. As it is well known that constitutive activation of NFκB signaling is a characteristic feature of Hodgkin lymphoma, dbpA seemed to act in a downstream molecule of NFκB signaling pathway.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：病理学

科研費の分科・細目：人体病理学

キーワード：CD30、dbpA、リンパ腫、病理学

1. 研究開始当初の背景

われわれは以前に慢性肝炎からの肝発癌のメカニズムとして、慢性肝炎におけるゲノム不安定性のメカニズムの解析を行い、その際にゲノム不安定性を誘発する因子の候補として dbpA を初めとする複数の因子を同定した (Intervirolgy. 2001, 44:311-6, BBRC. 2004 322:297-302. Clin Cancer Res. 2005 15:11:7354-61.)。さらに、ヒト dbpA に対す

る抗体を作成し、種々のヒト正常組織ならびに腫瘍での発現態度を検討した。dbpA がヒトリンパ系組織では活性化リンパ球の指標とされる CD30 の発現パターンと類似することを見出し、共焦点顕微鏡を用い、CD30 陽性リンパ球における dbpA の特異的発現を確認した。次にヒト悪性リンパ腫における dbpA の発現を、約 800 例のリンパ腫と診断された症例を用いて発現解析を行い、WHO 分類（第 4

版)に則った疾患単位別の発現頻度を検討した。その結果、CD30 陽性の悪性リンパ腫の代表格である Hodgkin リンパ腫ならびに未分化大細胞リンパ腫において高発現することを見出した。このことは CD30 陽性リンパ球における dbpA の特異的発現を支持する結果と考えられる。CD30 は Hodgkin リンパ腫の key molecule のひとつで、ほぼ全例においてその発現を認める。一方、Hodgkin リンパ腫の分子生物学的特徴の一つは NFκB シグナル伝達系の恒常的活性化である。前述のように dbpA が CD30 陽性の種々のリンパ腫において高率に発現することを見出し、CD30 を介したシグナル伝達経路への dbpA の関与が示唆される。こうしたことから Hodgkin リンパ腫を中心とした CD30 陽性のリンパ腫において、dbpA のリンパ腫発生におけるメカニズムへの関与を検討する。

一方、びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (DLBCL) は悪性リンパ腫の中で最も多い亜型であり、その病因ならびに病態においてヘテロな疾患群である。われわれは、リンパ腫の各疾患単位別の検索の過程で、低頻度ながら DLBCL においても dbpA が発現し、予後との相関を検討した結果、dbpA の発現が予後不良因子となることを新たに見出した。大腸菌において DNA の組換え因子として機能すること、慢性肝炎における遺伝子不安定性への寄与の可能性などを加味すると、リンパ球およびリンパ腫での dbpA の発現は、リンパ球の腫瘍化ならびにリンパ腫の悪性化への過程に関与していることが示唆される。

ヒト dbpA の機能は依然不明な点が多いが、以上の知見を踏まえ、①NFκB シグナル伝達系への関与および②dbpA のリンパ球の形質転換ならびに悪性化への寄与を主に検討する。

2. 研究の目的

大腸菌で DNA の組換えに関わると考えられている dbpA (DNA-binding protein A) が、ヒトにおいて活性化リンパ球の指標となる CD30 陽性のリンパ球に発現していることを見出し、さらに CD30 陽性の悪性リンパ腫に高頻度に発現していることを見出した。上記の結果を踏まえ、dbpA の機能を正常のリンパ球ならびに悪性リンパ腫において解析する。とりわけリンパ球における CD30 の役割は NFκB の活性化を介したシグナル伝達機構と密接につながっていることから、NFκB と dbpA の関係を中心に解析する。

3. 研究の方法

(1) HL 細胞株を用いてわれわれが樹立した抗ヒト dbpA 抗体を用いて dbpA の発現を Hodgkin リンパ腫を含めた悪性リンパ腫細胞株でウェスタンブロットにてスクリーニングする。

(2) dbpA の発現の見られなかった 2 種類の細胞株 (HDLM-2, L428) を用いて、dbpA 発現安定細胞株の樹立を以下のように行う。まず、我々が作製した pcDNA3.1-dbpA のベクターを改変し、pIRES-puro2 ならびに pIRES2-AcGFP に dbpA をつないだ発現ベクター

(pdbpA-IRES2-AcGFP) を構築し、安定細胞株を FACS にて GFP を指標にソーティングする。この際、得られた細胞株において、導入遺伝子種 (dbpA, MOCK) 間での増殖活性、ヌードマウスへの移植等における表現型の違いを調べる。

(3) dbpA の発現がみられる Hodgkin リンパ腫培養細胞株で dbpA に対する small interfering RNA (siRNA) で発現抑制した結果としての種々の遺伝子発現の変化について検討する。

(4) トランスジェニックマウス (Tg マウス) 作製のための導入遺伝子のコンストラクションを作成する。マウス B リンパ球特異的遺伝子である Eμ遺伝子のプロモーターの下流にヒト dbpA ならびにマウス dbpA の cDNA を接続し、導入遺伝子とする。遺伝子構築が出来次第、マウス受精卵へのインジェクションを行う。導入遺伝子のコンストラクションの作成後、それをマウス受精卵にインジェクションし、遺伝子型ならびにウェスタンブロットによるタンパク発現のスクリーニングを開始する。ファウンダーが得られ次第、表現型の観察をする。

(5) pIRES-puro2-dbpA を導入遺伝子にもつ安定細胞株において、この導入遺伝子は Flag タグを dbpA の C 末領域に付加した構造を有しているため、抗 Flag 抗体を用い、Flag のみの空ベクターを導入した細胞株をコントロールとして FLAG (-dbpA) に対する結合タンパクのスクリーニングを行う。銀染色にて有意なバンドが同定された場合は、そのバンドを切り出し、マススペクトロメトリーにてアミノ酸配列からタンパクの同定を行う。

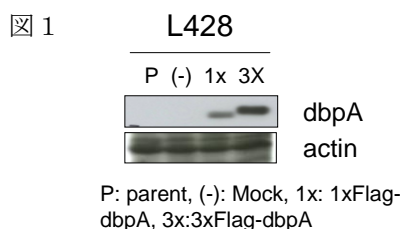
(6) 樹立した安定細胞株において、dbpA 発現細胞株およびコントロールベクター導入細胞株間における遺伝子発現の網羅的解析を Human Gene 1.0 ST Array を用いて行う。

4. 研究成果

(1) HL リンパ腫細胞株では 6 細胞株中、4 種類の細胞株で dbpA の発現が認められた。

(2) L428 細胞株において、dbpA が安定的に発現する細胞株およびコントロール細胞株を得た (図 1)。これらの細胞株を用いて dbpA 発現細胞株ならびに Mock 細胞株間で増殖活性を検討したが、明らかな差は認められなかった。また、ヌードマウスへの皮下投与を行った結果においても、種々の条件下でも生着

せず、詳細は今後の検討課題と考えられた。また CD30 が関与するシグナル伝達経路における種々の分子の発現についても検討したが、NFκB 関連分子 (cRel, RelA など) の発現誘導に対して有意な差は認められなかった。このことより、dbpA が NFκB シグナル伝達系を直接的に修飾する可能性は低いと考えられた。



(3) siRNA を用いた dbpA の発現抑制実験において、エレクトロポレーションを用いたが、導入効率の問題があり、有意に抑制することができなかった。また shRNA を用いて、dbpA を安定的に抑制させる細胞株の樹立を試みたが、現在のところそうした細胞株を得るところまではいたっていない。今後、レトロウイルスやレンチウイルス等を用いた方法での試みを行う予定である。

(4) Tg マウスの樹立を PCR ならびにサザンブロットでスクリーニングをし、脾臓を採取し、ウェスタンブロットでのタンパク発現のみられる 2 つのラインを得た。長期観察群では、現在最長齢 1 年ほどであるが、顕著な差はみられていない。今後引き続き、表現型の観察を続ける。

(5) dbpA の結合タンパクを同定するために、Flag でタグされた dbpA を抗 Flag 抗体を用いて、免疫沈降を行い、電気泳動後、銀染色を行い複数の有意なバンドを得た。それらを質量分析計にてアミノ酸配列の同定を行った。その候補の中から、さらに免疫沈降にて結合の確認されたタンパクを絞り込んだ。その結果、ATP 依存性 RNA ヘリカーゼ A である DHX9 が同定された。RNA helicase A は NFκB のひとつである p65 との結合が報告されており、RNA helicase A を介した NFκB シグナルへの関与が示唆された。

(6) dbpA 強制発現細胞株ならびに MOCK 細胞株間で Human Gene 1.0 ST Array を用いた遺伝子発現解析を行った。その結果、dbpA 発現細胞株において有意に発現の高い遺伝子として、IL13, CD320 などが同定され、CD320 は濾胞樹状細胞とともに、濾胞中心における B 細胞の増殖に関わるとの報告がなされており、Hodgkin リンパ腫が濾胞中心を起源とする B 細胞性の腫瘍であることを加味すると、dbpA が CD320 などを介して機能することが考えられた。

以上より、依然 dbpA の機能に関しては不明な点も多いが、今回作出された細胞株や遺伝子改変動物をツールとして dbpA の更なる機能の解明が期待される。今後、これらの研究結果からもたらされた成果を踏まえ、NFκB シグナル伝達経路を含めて、総括的に dbpA と Hodgkin リンパ腫を含めた B 細胞性腫瘍とのかかわりを解明する予定である。

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 4 件)

1. 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. 2012 Apr 15;18(8):2164-72. (査読有)

2. Abe H, Momose S, Takeuchi T. Microscopic polyangitis complicating double carcinoma of the stomach and duodenum: improvement after the resection of these carcinomas. Rheumatol Int. 2011 Jan;31(1):105-8 (査読有)

3. Hanzawa K, Momose S, Higashi M, Tokuhira M, Watanabe R, Kajino K, Hino O, Itoyama S, Kizaki M, Tamaru J. Y-box binding protein-1 expression in diffuse large B-cell lymphoma: an impact on prognosis in the rituximab era. Leuk Lymphoma. 2010 Nov;51(11):2054-62. (査読有)

4. Tan K, Kajino K, Momose S, Masaoka A, Sasahara K, Shiomi K, Izumi H, Abe M, Ohtsuji N, Wang T, Hino O, Fujii H. Mesothelin (MSLN) promoter is hypomethylated in malignant

mesothelioma, but its expression is not associated with methylation status of the promoter. Hum Pathol. 2010 Sep;41(9):1330-8. (査読有)

〔図書〕(計4件)

百瀬修二 田丸淳一：Ⅱ. 悪性リンパ腫 1. 改訂第4版 WHO 分類で悪性リンパ腫の分類が大きく変わった. 変更のポイントは? (2版) (押味 和夫 監修 造血器腫瘍治療これは困ったぞ, どうしよう!) p130-134、中外医学社、2010

百瀬修二、樋野興夫胸水・腹水の病理 胸腹水の生化学的マーカー —最近の知見— 病理と臨牀 (28 (11) :1125-1128, 2010)

百瀬修二 田丸淳一：第I章 治療の前に B. 骨髄腫細胞の形態学的特徴と細胞表面マーカー、p5-11、多発性骨髄腫治療マニュアル 木崎昌弘(編) 2012年04月

百瀬修二解説 Hodgkin リンパ腫における放射線誘発二次発がんの原因遺伝子の解明 血液内科 第64巻第4号(2012年4月発行) 科学評論社

6. 研究組織

(1) 研究代表者

百瀬 修二 (MOMOSE SHUJI)
順天堂大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：70360344

(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
梶野 一徳
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：80260066