

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 4 月 20 日現在

機関番号：83901

研究種目：若手(B)

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22790368

研究課題名（和文） 節外性 NK/T 細胞リンパ腫、鼻型の分子病態の解明および新規薬剤の探索

研究課題名（英文） The molecular analyses of extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type

研究代表者

加留部 謙之輔 (Karube Kennosuke)

愛知県がんセンター(研究所) 遺伝子医療研究部 主任研究員

研究者番号：20508577

研究成果の概要（和文）：NK/T 細胞性リンパ腫に対してアレイ CGH を行い、染色体 6q21 領域に高頻度のゲノム欠失を認めた。その領域に存在していた遺伝子の中から、発現においても減少が認められた 7 遺伝子について遺伝子導入による機能解析を行った。その結果、FOXO3 および PRDM1 のみが NK 細胞株の増殖を抑制した。さらに、臨床検体において、FOXO3 および PRDM1 の遺伝子変異も認められた。これらのことは、両遺伝子が 6q21 のゲノム欠失の責任遺伝子である可能性を示唆するものである。

研究成果の概要（英文）：Oligo-array CGH and gene expression profiling of NK cell neoplasms were employed in an effort to delineate the molecular pathogenesis involved. Oligo-array CGH identified two 6q21 regions that were most frequently deleted (36%; 14/39). One of these regions included POPDC3, PREP, PRDM1, ATG5 and AIM1, while the other included LACE1 and FOXO3. Re-expression of FOXO3 and PRDM1 suppressed NKL proliferation, unlike the case following re-expression of the other genes. Furthermore, genomic analyses detected nonsense mutations of PRDM1, leading to functional inactivation, in one cell line and one clinical sample. PRDM1 and FOXO3 are considered to play an important role in the pathogenesis of NK cell neoplasms.

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	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：人体病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：悪性リンパ腫，NK細胞リンパ腫，アレイCGH，発現解析

1. 研究開始当初の背景

悪性リンパ腫はホジキンリンパ腫、B細胞性リンパ腫およびT/NK細胞リンパ腫の大きく3つに大別されている。ホジキンリンパ腫およびB細胞性リンパ腫は比較的頻度が高く、臨床病理学的特徴についても比較的よく解析されており、また病因についても様々な遺伝子異常が発がん重要な働きをしていることが分かってきている。一方T/NK細胞リンパ腫は研究が比較的進んでいない分野であったが、近年注目が高まってきている分野である。節外性NK/T細胞リンパ腫、鼻型(以下ENKTL)はT/NK細胞リンパ腫の1亜型である。鼻周辺に好発し、高率なEBウイルスの感染を示す、臨床病理学的に非常に特徴的な疾患概念である。また、本邦を含めたアジア地域での発生率が、欧米の発生率に比べ有意に高いこともあり、臨床研究の面においては、本邦が世界をリードしている分野でもある(Yamaguchi M. J Clin Oncol 2009)。しかし、その病態に関しては依然として不明な点が多く、遺伝子異常や発がん機序はほとんどわかっていない。また、本疾患のほぼ100%に認められるEBウイルスと発がんの関係も詳細に検討された研究は少ない。

申請者が所属する研究室では、ゲノム異常を網羅的、かつ高精度に解析できるアレイCGH法に関して300例近くに及ぶ解析結果を論文発表してきた。(Tagawa H. et al. Cancer Res. 2004, Oncogene 2005, Blood 2005)。ENKTLに関しても、アレイCGHによる解析を行い、それまで報告されていなかった1qの増幅や7p15.1-p22.3および17p13の欠失などの特徴的な遺伝子異常を見出した。次のステップとして、それらの異常の本質

である病因遺伝子の同定が重要と考えられた。

2. 研究の目的

1) NK/T細胞性腫瘍に特徴的なゲノム異常および遺伝子発現異常を同定する。

NK/T細胞性腫瘍におけるゲノム異常、遺伝子発現異常を把握するために、マイクロアレイを用いた網羅的解析を行う。このステップを経て、NK/T細胞性腫瘍のがん化に関連していると思われるがん遺伝子あるいはがん抑制遺伝子候補を抽出する。

2) 候補遺伝子の同定と機能的解析

1) で抽出された候補遺伝子について、確定するために、RT-PCRならびにReal Time-PCR法で発現との相関を確認し、責任遺伝子を同定する。責任遺伝子が確定したら、レトロウイルスベクターを用いて、種々の細胞株に遺伝子導入し、細胞増殖能やコロニー形成能、サイトカイン依存性、アポトーシス抵抗性を調べ、腫瘍化への各遺伝子の役割を調べる。

3) 同定されたがん関連遺伝子の詳細な解析

以上のステップで見いだされた遺伝子は、実際の検体においてはゲノムの量的異常の他の異常が認められる可能性がある。遺伝子変異解析、FISH法を用いてさらに詳細に検討する。

3. 研究の方法

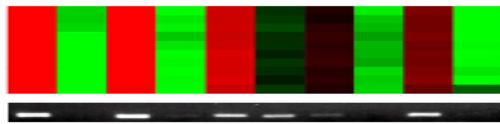
(1):NK/T細胞リンパ腫の網羅的な発現解析およびゲノム異常解析

A):症例の収集

NK/T 細胞リンパ腫の細胞株 7 個、臨床検体 35 例を収集した。細胞株は全例アレイ CGH および発現解析を施行し、臨床検体においては充分量の DNA が採取できた 32 例についてアレイ CGH、充分量の RNA が採取できた 11 例についてマイクロアレイを用いた網羅的発現解析を行った。対照の正常 NK 細胞については、健常人のボランティアから採集した。

B) : 網羅的発現解析

遺伝子発現解析は Agilent 社の 44K オリゴ DNA マイクロアレイを使用した。発現解析の結果の信頼性について、ランダムに選んだ数個の遺伝子で RT-PCR を行い、図 2 のように高度な相関を確認した。

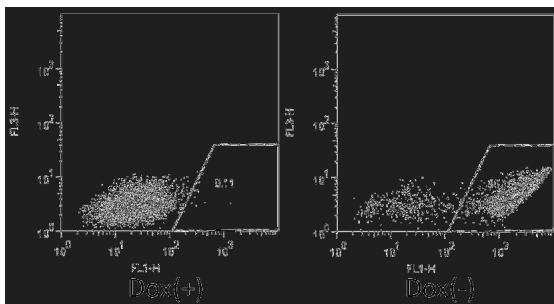


C) : オリゴアレイ CGH

同じく Agilent 社の 44kCGH アレイを用いて検討を行った。

(2) 候補遺伝子の機能解析

(1) で抽出した候補遺伝子について、細胞株への遺伝子導入法を用いて機能解析を行った。遺伝子導入は、クロンテック社の Retro-X Tet-Off Advanced Inducible Expression system を用いた。その結果、図 3 に示すように 95%以上の細胞で有効な遺伝子発現誘導が確認できた。



(3) その他の解析

A) : RT-PCR: マイクロアレイによる網羅的発現解析の結果を確認するために、RT-PCR を行った。

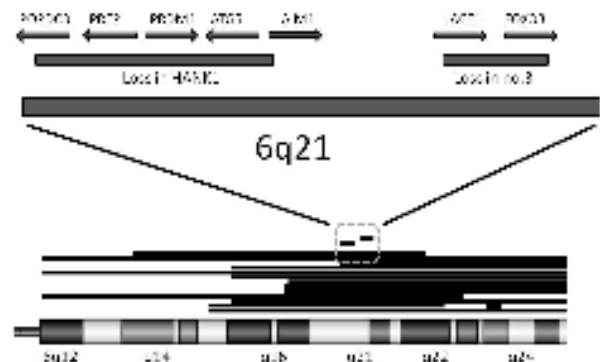
B) : FISH 法: アレイ CGH の結果を確認するために、6q21 に位置する BAC probe を用いて FISH (Fluorescence in situ hybridization) を行った。

C) : 遺伝子変異解析: 候補遺伝子のエクソン領域に関して、ゲノムシーケンス解析を行った。

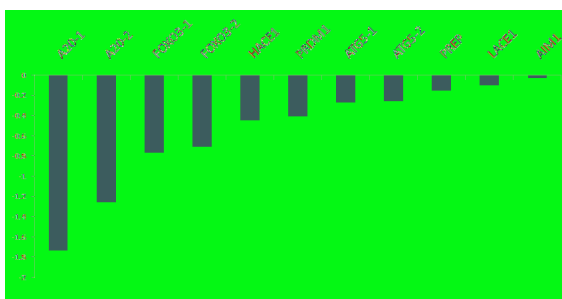
4. 研究の成果

(1) NK/T 細胞性腫瘍のゲノム解析: アレイ CGH を行った症例についての結果を下図に示す。全 39 例のうち 20%以上の症例で認められた異常として 1q31.2-44、

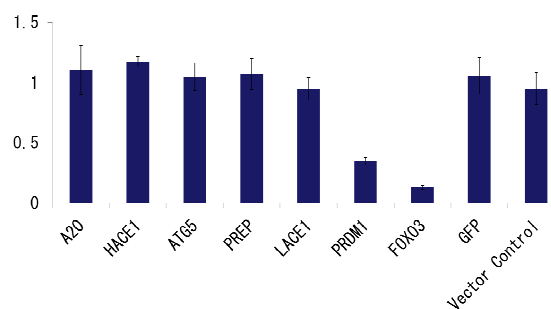
7q11.22-36.3、16p13.3、11p15.5 の増幅、および 6q16.1-27、7p15.3-22.2 の欠失が挙げられた。特に、6q21 上の、POPDC3、PREP、PRDM1、ATG5、AIM1、LACE1、FOXO3 を含む狭い領域は 36%の症例で欠失しており最もゲノム異常の頻度が高い領域であった。また、6q21 上に存在し、近年有力ながん抑制遺伝子として報告されている A20 および HACE1 もそれぞれ 28%、31%という高い頻度で欠失が認められた。これらの遺伝子は NK/T 細胞性腫瘍で重要な働きをしている可能性の高い候補遺伝子として、各遺伝子の発現について検討を加えた。



(2)各候補遺伝子の発現解析：(1)ゲノム解析の結果抽出された各候補遺伝子の発現の状況を調べるため、網羅的発現解析の結果を検討した。正常NK細胞に対する、腫瘍組織および細胞株の発現比についての結果を下5に示す。各候補遺伝子の腫瘍組織における発現は、正常NK細胞に比べすべて低下しており、同部位のゲノム異常を反映していると思われた。しかし各遺伝子の発現低下レベルは均一ではなく、A20、FOXO3の発現は高度に低下しているのに比べ、AIM1は発現の差はほとんど認められなかった。



(3)各候補遺伝子の機能解析：(1)ゲノム解析の結果抽出された候補遺伝子のうち、発現の低下を伴っていた A20、HACE1、FOXO3、ATG5、PREP、LACE1、PRDM1、ATG5 について機能解析を行った。NK/T細胞性腫瘍の代表的な細胞株、NKL を用いて Tet-OFF システムを構築し、各遺伝子の発現を誘導した。その結果、下図に示すように FOXO3 および PRDM1 の発現誘導は NKL の細胞増殖を抑制したが、A20 はじめ他の遺伝子の発現誘導は細胞増殖に影響しなかった。この結果から FOXO3 および PRDM1 は、6q21 上における、より重要ながん抑制遺伝子と考えられた。

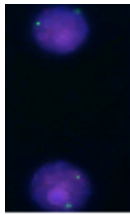


図：NKL において、各遺伝子の発現を誘導した際の細胞増殖。誘導 6 日目における、誘導していない株(Dox(+))に対する誘導した株(Dox(-))の細胞数の比を示す。*は、コントロール(GFP)に比べ有意差があることを示す。

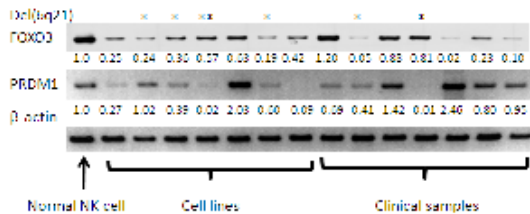
(4)PRDM1 および FOXO3 の解析：(1)-(3)の結果から PRDM1、FOXO3 に対し、より詳細な検討を加えた。アレイ CGH で認められたゲノム欠失は FISH 法にでも確認された(下図(a))。また、半定量的 RT-PCR にても、腫瘍組織および細胞株における発現は正常 NK細胞に比べ低下しており、マイクロアレイによる網羅的発現解析の結果を反映していた(下図(b))。

さらに、両遺伝子のエクソン領域における遺伝子変異を検索したところ、PRDM1 については臨床検体 1 例、細胞株 1 例において、FOXO3 は臨床検体 3 例において SNP データベースにはない 1 塩基置換が認められた(下図(c))。特に、PRDM1 の変異はともに non-sense 変異で(174STOP、239STOP)、機能的にも細胞増殖抑制効果を喪失しており、非活性型変異と考えられた。

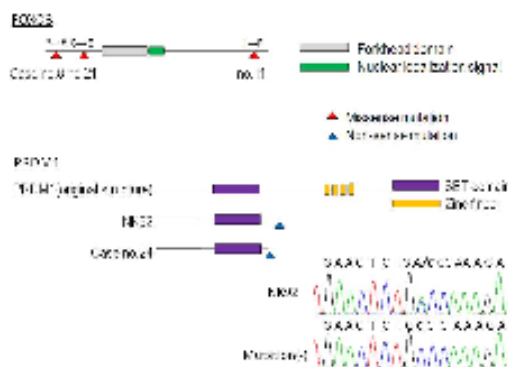
以上の結果から、NK/T細胞性腫瘍においては、高頻度に 6q21 の欠失が認められ、中でも特に FOXO3 および PRDM1 はがん抑制遺伝子として重要な機能を果たしている可能性が考えられた。



(a)



(b)



(c)

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 3 件) (すべて査読あり)

2011 年

1. Karube K, Nakagawa M, (他 10 名、1 番目). Identification of FOXO3 and PRDM1 as tumor suppressor gene candidates in NK cell neoplasms by genomic and functional analyses. *Blood*. 2011 Sep 2;118(12):3195-204.

2010 年

2. Sung CO, Kim SC, Karnan S, Karube K, (他 9 名、4 番目). Genomic profiling combined with gene expression

profiling in primary central nervous system lymphoma. *Blood* 2010 117(4):1291-300.

3. Takeshita M, Nakamura S, Karube K (他 10 名、11 番目) Pathological and immunohistological findings and genetic aberrations of intestinal enteropathy-associated T cell lymphoma in Japan. *Histopathology*. 2011 58(3):395-407.

[学会発表] (計 2 件)

2011 年

1. 第 11 回国際リンパ腫会議 口演
「Identification of FOXO3 and PRDM1 as tumor suppressor gene candidates in NK cell neoplasms by the combination of genomic and functional analyses」 Kennosuke Karube, Masao Nakagawa, Shinobu Tsuzuki, Young-Hyeh Ko, Shigeo Nakamura, Masao Seto 2011.6.16 ルガノ(スイス)
2. 第 70 回日本癌学会学術総会 ポスター
(示説)「NK 細胞性腫瘍における FOXO3 および PRDM1 のがん抑制遺伝子としての意義」加留部謙之輔, 中川雅夫, 都築忍, 清水則夫, 中村栄男, 高田尚良, 瀬戸加大 2011.10.5 名古屋 名古屋国際会議場

[図書] (計 2 件)

1. 加留部 謙之輔、瀬戸加大
リンパ腫幹細胞は存在するか？血液診療エキスパート 悪性リンパ腫 p258-260
監修：金倉讓 中外医学社 2010 年 6 月
2. 加留部 謙之輔
セミナー11 NK/T 細胞リンパ腫 若手医師のためのリンパ腫セミナー-エキスパート

ートによる講義録 p67-71 編集：日本リ
ンパ網内系学会 南光堂 2012年5月

〔その他〕

ホームページ等

http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/04idenshi_iryō/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加留部 謙之輔 (Karube Kennosuke)
愛知県がんセンター(研究所) 遺伝子医療
研究部 主任研究員

研究者番号：20508577