

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390249

研究課題名(和文)リンパ腫形成パスウェイにおける新規協調遺伝子の機能的探索と分子標的としての意義

研究課題名(英文)Lymphomagenesis pathway consisting of various cooperative genes and their relevance as molecular target therapy

研究代表者

瀬戸 加大 (SETO, Masao)

久留米大学・医学部・客員教授

研究者番号：80154665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：リンパ造血器腫瘍ではゲノム異常、遺伝子変異が多数報告されてきたが、各病型について、染色体転座以外のゲノム異常の頻度は低く多様である。本研究は、支持細胞、サイトカインの存在下にて、マウス正常成熟B細胞に複数の遺伝子を導入し、腫瘍化に関する遺伝子群について機能的に評価する系を確立した。今後は、本実験系を用いて分子標的を見いだすためのスクリーニングに利用したい。

研究成果の概要(英文)：Various genetic alterations have been reported in lymphoid malignancies. Frequencies of such alterations in each disease entity are low except for translocation-juncture genes. It is not an easy task to provide evidences that such genes are directly involved in lymphomagenesis. Transgenic and knock-out mouse technology is limited in analyzing several genes within a relatively short period of time. In this research project, we have established the cell culture system, using feeder cells and cytokines, which can analyze several genes by retroviral vector transduction. Indeed, we could transform normal mouse B-cells to lethally malignant lymphoma by three translocation junction genes, MYC, BCL2 and CCND1. This system could be extended to examine oncogenic ability for several other genes reported by genomic or exome sequencing. This system will further provide a good system to screen molecular targets.

研究分野：血液腫瘍学4

キーワード：リンパ腫 染色体転座 転座関連遺伝子 シグナルトランスダクション MYC、BCL2、CCND1 腫瘍化機構 リンパ腫モデル 分子標的

1. 研究開始当初の背景

成熟 B 細胞性腫瘍は、各々の疾患に特徴的な染色体転座を持つ。たとえば、マントル細胞リンパ腫であれば t(11;14) 転座があり、CCND1 により細胞周期が亢進している。濾胞性リンパ腫であれば t(11;18) 転座があり、BCL2 の恒常的発現によりアポトーシスが抑制されている。びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫であれば t(3;14) 転座があり、BCL6 によって形質細胞への分化が抑制されている。以上の例示のように、古典的には、疾患単位と染色体転座およびその機能が 1 対 1 対応であると考えられてきた。しかし、転座関連遺伝子による遺伝子改変マウスモデルは、必ずしも全例で腫瘍を形成するわけではなく、他の付加的な遺伝子異常の存在が考えられていた。このような染色体転座の発見を契機に始まった悪性リンパ腫の分子病態の解明にむけた研究は、分子生物学的な技術革新により、今や全ゲノム領域の異常を評価できるまでに至った。我々の研究室では独自に開発したアレイ CGH 法を用いて、各種悪性リンパ腫の全ゲノム領域に及ぶコピー数異常の詳細な解析を行い、特徴的な染色体転座をもつ単一疾患単位においても、患者毎に異なるゲノム異常をもつことを見出してきた (総説: Seto M, Int J Hematol, 2010)。また、他の研究グループは、ハイスループットシーケンス法を用いた遺伝子変異解析を行い、同一疾患の患者でも個々の持つ遺伝子変異は異なっていることを報告している。これらの事実から、染色体転座関連遺伝子のみならず、複数の遺伝子が協調して腫瘍形成に至ると考えられるようになった。しかし、*in vivo* の系で複数遺伝子による協調的な腫瘍化能を証明する場合、各々の遺伝子改変マウスを作出し、交配させることで可能となるが、多数の候補遺伝子およびその組み合わせを評価するには煩雑であり、また年余に渡る時間が必要である。そこで、複数の遺伝子による腫瘍化能を簡便かつ包括的に評価する手法の確立を試みた。これが可能となれば、リンパ腫の発生にかかる分子学的基盤が解明できるだけでなく、将来に有効な分子標的治療薬の併用を考えるうえでの基礎的実験事実を提供できる。

上記の着想のもと、我々は研究開始時点までに、マウス正常 pre-B 細胞に遺伝子導入し、複数の遺伝子異常による形質転換能を評価する系を確立し報告していた (Nakagawa M, et al. Haematologica, 2011)。この系ではレトロウイルスベクターを用いてマウス正常 pre-B 細胞に複数の候補遺伝子を同時に導入し、自律的増殖能の獲得を *in vitro* で、腫瘍形成能を *in vivo* で評価した。Myc, Bcl2, Ccnd1 というヒトの triple hit リンパ腫を模した組み合わせで自律的増殖能・腫瘍形成能の獲得を認めたことから、遺伝子異常の組み合わせを評価できる有用な系が確立できたと考え、今後、腫瘍化に寄与する遺伝子をさ

らに探索・評価していくことが必要であり、同時にヒトのリンパ腫により近い条件での検討ができるようになった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、

- (1) リンパ腫を形成する上での複数遺伝子による協調的な腫瘍化パスウェイを評価できる堅強な系を確立すること、
- (2) 染色体転座関連遺伝子を軸とした、腫瘍化に寄与する新たな遺伝子異常の組み合わせを探索・評価することである。

3. 研究の方法

(1) マウス正常成熟 B 細胞を用いた遺伝子導入系および *in vivo* で腫瘍形成能を評価する系の作出

系の作出: C57BL/6 マウスの脾臓から B220 陽性細胞を磁気細胞分離法により採取し、NIH3T3/Cd401/Baff 細胞をフィーダー細胞として IL4 存在下に 4 日間、さらに IL21 存在下に 2 日間培養し、成熟胚中心 B (iGCB) 細胞を誘導した。その間にレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入した。培養後の細胞を NSG マウスに移植し、腫瘍化能を評価した。腫瘍が形成されたら、さらに C57BL/6 マウスに二次移植した。

作成した系の解析: 遺伝子導入効率、腫瘍中の遺伝子導入効率を評価する目的で、各々のレトロウイルスベクターに異なる蛍光色素あるいは細胞表面抗原 (GFP, hK0, hCD4, hCD8 等) を導入し、フローサイトメトリー法により検出した。導入遺伝子の発現はウエスタンブロット法により評価した。得られた腫瘍のクローナリティーは免疫グロブリン遺伝子可変領域の遺伝子再構成をシーケンス法により評価した。得られた腫瘍についての組織学的な検討を行った。

(2) 染色体転座関連遺伝子 Myc と協調的に腫瘍化に寄与する遺伝子異常の同定

候補遺伝子の抽出: 染色体転座関連遺伝子である Myc と協調する遺伝子異常を検索するために、NCBI に公開されている網羅的発現解析データの解析を行った。統計学的処理には R および JMP を使用した。

腫瘍形成能の評価: 上記にて抽出した候補遺伝子を iGCB 細胞に導入し、移植マウスモデルの系を用いて腫瘍化能を評価した。

4. 研究成果

(1) 成熟 B 細胞への遺伝子導入系の作出

研究の方法(1)に従い誘導した iGCB 細胞は成熟 B 細胞の表現型を示した。次に、この細胞にレトロウイルスベクターを用いて非常に高効率に遺伝子導入できることを確認した。さらに、複数のベクターを用いて遺伝子導入した際にも同様に高い効率を示すことを確認した。具体的には、4 つのベクターを用い

て9つの遺伝子(5つの候補遺伝子および4つの標識遺伝子)を導入した場合、個々のベクターの導入割合は15-60%程度であり、すべてのベクターが導入された細胞は1-7%程度得られた(図1)。以上より、ヒトの悪性リンパ腫と同等の分化段階の細胞を用いて複数の候補遺伝子の導入が可能な実験系を作ってきた。

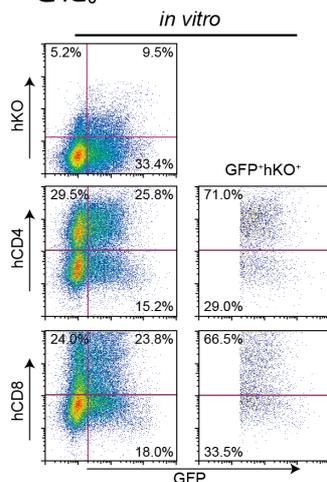
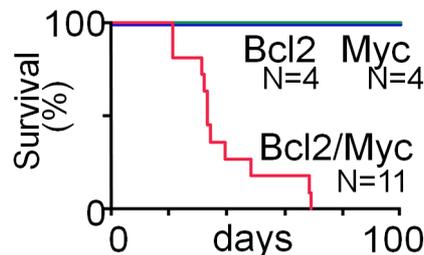


図1. 4ベクターによるiGCB細胞への感染効率 (Arita K, et al. Leukemia, 2014)

(2) Myc, Bcl2 による協調的腫瘍化マウスモデルの作出

転座関連遺伝子異常を2つ持つ double hit リンパ腫を模し、Myc および Bcl2 を導入した iGCB 細胞を NSG マウスに移植したところ、1ヶ月で Myc/Bcl2 共陽性細胞のみが選択的に増殖した。一次移植マウスの脾臓細胞を C57BL/6 マウスに移植したところ、すべてのマウスが腫瘍死した。解剖したマウスでは、リンパ節腫脹、脾腫、胸腺腫大、骨髄内への腫瘍浸潤といった表現型を示していた。同系の C57BL/6 マウスに一次移植した場合にも同様の結果が得られた。腫瘍の表現型は成熟 B 細胞であった。免疫グロブリン鎖の遺伝子再構成の検討では、可変領域に体細胞突然変異を認めなかったことから、完全にヒトのリンパ腫の系を模倣できたわけではなかった。しかし、体細胞突然変異による遺伝子異常が加わる頻度が低いことは、かえって導入遺伝子のみによる腫瘍化能を検討する上では利点であると考えられた。この系で付加的な遺伝子異常がどの程度加わるのかは十分に検討できておらず、今後の課題である。

Myc, Bcl2 を単独導入した iGCB 細胞を C57BL/6 マウスに移植したところ、100日を超えてもマウスが1匹も腫瘍死しなかった。一方、Myc/Bcl2 を同時に導入した iGCB 細胞を移植したマウスは、100日以内に全例が腫瘍死した(図2)。これら実験事実から、Myc, Bcl2 といった染色体転座関連遺伝子が単独では腫瘍化に十分ではないことが再確認されたと同時に、Myc と Bcl2 が協調して正常細胞



細胞を腫瘍細胞に形質転換することが示された。

図2. Bcl2、Myc 導入 iGCB 細胞移植マウスの生存解析

in vitro で遺伝子導入した iGCB 細胞および移植後に形成した腫瘍細胞を *in vitro* で長期継代しようと試みたが、発育しなかった。これは、腫瘍形成能を評価する上で *in vivo* の環境が好ましいことを示している。簡便性の面では *in vitro* での検討も行えることが望ましく、今後引き続き努力が必要である。

(3) 5 遺伝子 (Myc, CCND3T283A, E47V557E, Akt, TCL1A) による協調的腫瘍化の解明

染色体転座関連遺伝子 Myc を軸に協調する遺伝子異常の探索を行った。当初は Myc 転座をもつバーキットリンパ腫で高頻度に報告された E47 V557E 変異、CCND3 T283A 変異を用いて3因子での腫瘍化能を検討したが、一次移植マウスでの腫瘍化を確認できなかった。そこで、網羅的発現解析で高発現遺伝子として抽出された Akt、TCL1A を加えた5遺伝子での腫瘍化能を検討した。5遺伝子導入 iGCB 細胞をマウスに移植したところ、一次移植した NSG マウス、二次移植した C57BL/6 マウスが1か月未満という非常に短期間で腫瘍死することが判明した(図3、4)。得られた腫瘍は成熟 B 細胞の形質を示し、少なくともオリゴクローナルであったことから、導入した5遺伝子は腫瘍化を誘導するのに十分な異常であると考えられた。

5 遺伝子未満の組み合わせで腫瘍化能を獲得するかどうかを検討するために、4 遺伝子以下の組み合わせを iGCB 細胞に導入し、NSG マウスに一次移植した。しかし、4 因子以下の遺伝子導入細胞を移植したマウスでは100日を超えても大部分が生存しており、衰弱・死亡したマウスの中でも腫瘍化が確認できたのは1例のみであった(図4)。このことから、マウスの正常細胞を腫瘍細胞に形質転換するためには、この5遺伝子すべてが必要であることが明らかとなった。この結果は、この5遺伝子が直接協調して腫瘍化に寄与することを示した初めてのものである。また、実際に正常細胞が腫瘍になるために、どれだけの遺伝子異常の蓄積が必要かを考える上で、示唆に富むものである。

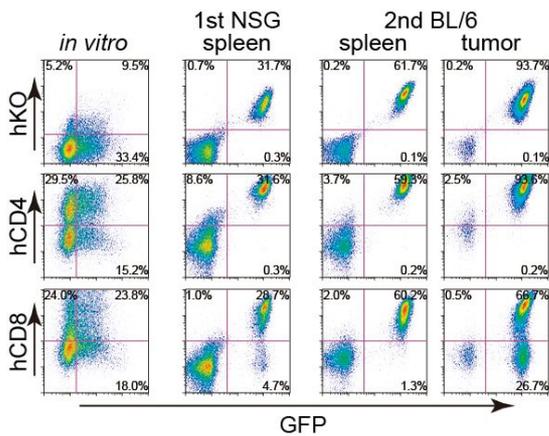


図 3. 5 遺伝子導入細胞移植マウスにおける腫瘍細胞の選択的増殖。GFP は Myc/CCND3T283A、hKO は TCL1A、hCD4 は myr-Akt、hCD8 は E47V557E の代替マーカーとして発現ベクターに組み込んである。各遺伝子導入分画(右上)が優位に増えていることがわかる。(Arita K, et al. Leukemia, 2014)

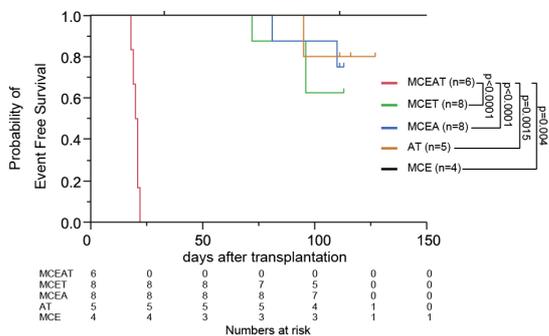


図 4. 遺伝子導入 iGCB 細胞移植マウスの生存解析。M: Myc、C: CCND3T283A、E: E47V557E、A: myr-Akt、T: TCL1A。(Arita K, et al. Leukemia, 2014)

転座関連遺伝子 Myc を含まない組み合わせでの腫瘍化能も検討しており、すでいくつかの組み合わせの候補を見出している。今後とも詳細な検討を続けていく。

(4) 成熟 T 細胞への遺伝子導入系の作出および腫瘍化マウスモデルの作出

B 細胞と同様の着想で、T 前駆細胞をフィーダー細胞と共培養し、その間に複数の遺伝子を導入することで成熟 T 細胞性腫瘍を形成できるマウスモデルを作出し、報告した。この系では Myc、Bcl2、Ccnd1 の 3 遺伝子の組み合わせがマウスを腫瘍死させるのに必要であった。我々はこれまでに末梢性 T 細胞リンパ腫と、九州以南で高頻度に認められる成人 T 細胞白血病/リンパ腫におけるゲノム異常の類似性を見出している (Nakagawa et al., Clin Cancer Res. 2009)。作出したマウスモデルの系を用いて、ヒト検体から見出した候補遺伝子の機能を検討していくことが必要であり、現在、検討を進めつつある。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 12 件)

Utsunomiya A, Choi I, Chihara D, Seto M. Recent advances in the treatment of adult t-cell leukemia- lymphomas. Cancer Sci. 106: 344-351, 2015.

DOI: 10.1111/cas.12617.

Kato H, Karube K, Yamamoto K, Takizawa J, Tsuzuki S, Yatabe Y, Kanda T, Katayama M, Ozawa Y, Ishitsuka K, Okamoto M, Kinoshita T, Ohshima K, Nakamura S, Morishima Y, Seto M.: Gene expression profiling of Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly reveals alterations of characteristic oncogenetic pathways. Cancer Sci. 105: 537-544, 2014.

DOI: 10.1111/cas.12389

Suguro M, Yoshida N, Umino A, Kato H, Tagawa H, Nakagawa M, Fukuhara N, Karnan S, Takeuchi I, Hocking TD, Arita K, Karube K, Tsuzuki S, Nakamura S, Kinoshita T, Seto M.: Clonal heterogeneity of lymphoid malignancies correlates with poor prognosis. Cancer Sci. 105: 897-904, 2014.

DOI: 10.1111/cas.12442.

Guo Y, Takeuchi I, Karnan S, Miyata T, Ohshima K, Seto M.: Array-comparative genomic hybridization profiling of immunohistochemical subgroups of diffuse large B-cell lymphoma shows distinct genomic alterations. Cancer Sci. 105:481-489. 2014.

DOI: 10.1111/cas.12378.

Arita K, Tsuzuki S, Ohshima K, Sugiyama T, Seto M.: Synergy of Myc, cell cycle regulators and the Akt pathway in the development of aggressive B-cell lymphoma in a mouse model. Leukemia. 28:2270-2272. 2014.

DOI: 10.1038/leu.2014.224.

Yoshida N, Karube K, Utsunomiya A, Tsukasaki K, Imaizumi Y, Taira N, Uike N, Umino A, Arita K, Suguro M, Tsuzuki S, Kinoshita T, Ohshima K, Seto M.: Molecular Characterization of Chronic-type Adult T-cell Leukemia/Lymphoma. Cancer Res. 74: 6129-6138, 2014.

DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0643.

Arita K, Maeda-Kasugai Y, Ohshima K, Tsuzuki S, Suguro-Katayama M, Karube K, Yoshida N, Sugiyama T, Seto M.: Generation of mouse models of lymphoid neoplasm using retroviral gene transduction of in vitro-induced germinal center B and T cells. Exp Hematol. 41:731-741, 2013. e9.

DOI: 10.1016/j.exphem.2013.04.001.

Karube K, Tsuzuki S, Yoshida N, Arita K, Kato H, Katayama M, Ko Y-H, Ohshima K, Nakamura S, Kinoshita T, Seto M.: Comprehensive gene expression profiles of NK cell neoplasms identify vorinostat as an effective drug candidate. *Cancer Lett*, 333:47-55, 2013. DOI: 10.1016/j.canlet.2012.12.022.

Liu F, Yoshida N, Suguro M, Kato H, Karube K, Arita K, Yamamoto K, Tsuzuki S, Ohshima K, Seto M.: Clonal heterogeneity of mantle cell lymphoma revealed by array comparative genomic hybridization. *Eur J Haematol*, 90: 51-58, 2013. DOI: 10.1111/ejh.12030.

Karube K, Tsuzuki S, Yoshida N, Arita K, Liu F, Kondo E, Ko YH, Ohshima K, Nakamura S, Kinoshita T, Seto M.: Lineage-specific growth inhibition of NK cell lines by FOXO3 in association with Akt activation status. *Exp Hematol*, 40: 1005-1015.e6, 2012. DOI: 10.1016/j.exphem.2012.08.005.

Yoshida N, Umino A, Liu F, Arita K, Karube K, Tsuzuki S, Ohshima K, Seto M.: Identification of multiple subclones in peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified with genomic aberrations. *Cancer Medicine*, 1: 289-294, 2012. DOI: 10.1002/cam4.34

Liu F, Karube K, Kato H, Arita K, Yoshida N, Yamamoto K, Tsuzuki S, Kim W, Ko Y-H, Seto M.: Mutation analysis of NF- κ B signal pathway-related genes in ocular MALT lymphoma. *Int J Clin Exp Pathol.*, 5: 436-441, 2012. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3396059/>

〔学会発表〕(計 8 件)

在田幸太郎, 都築忍, 大島孝一, 杉山敏郎, 瀬戸加大. Synergy of Myc, cell cycle regulators and the Akt pathway in a mouse model of B-cell lymphoma. 第 76 回日本血液学会総会. 2014. 11. 2. 大阪国際会議場(大阪市).

都築忍, 在田幸太郎, 大島孝一, 杉山敏郎, 瀬戸加大. Myc, 細胞周期関連遺伝子, Akt パスウェイの協調によるマウスリンパ腫モデル. 第 73 回日本癌学会学術総会. 2014. 9. 27. パシフィコ横浜(横浜市).

Arita K, Tsuzuki S, Ohshima K, Sugiyama T, Seto M. Synergy of Myc, cell cycle regulators and the Akt pathway in a mouse model of B-cell lymphoma. 2014 年米国血液学会リンパ腫生物学会議. 2014. 8. 12. コロラドスプリングス(米

国).

在田幸太郎, 都築忍, 大島孝一, 杉山敏郎, 瀬戸加大. レトロウイルスによる正常 B 細胞への遺伝子導入を用いた成熟 B 細胞腫瘍マウスモデル. 第 24 回日本サイトメトリー学会学術総会. 2014. 6. 28. 関西医科大学(枚方市).[招聘講演]

在田幸太郎, 都築忍, 大島孝一, 杉山敏郎, 瀬戸加大. New mouse B-cell lymphoma model originated from germinal center. 第 75 回日本血液学会学術集会. 2013. 10. 11. ロイトン札幌(札幌市).

都築忍, 片山幸, 吉田稚明, 在田幸太郎, 大島孝一, 瀬戸加大. インビトロで誘導した T 細胞への遺伝子導入によるマウスリンパ腫モデル. 第 72 回日本癌学会学術総会. 2013. 10. 5. パシフィコ横浜(横浜市).

在田幸太郎, 都築忍, 大島孝一, 杉山敏郎, 瀬戸加大. レトロウイルスによる正常 B 細胞への遺伝子導入を用いた B 細胞リンパ腫マウスモデル. 第 72 回日本癌学会学術総会. 2013. 10. 4. パシフィコ横浜(横浜市).

Arita K, Tsuzuki S, Seto M. New mouse models of B-cell lymphoma using an in vitro retroviral transduction system. 第 9 回日本癌学会・AACR 合同会議 2013. 2. 22. ラハイナ(米国).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬戸 加大 (SETO Masao)

久留米大学・医学部・客員教授

研究者番号: 80154665