

学内グラント 終了時報告書

平成21年度 学内グラント報告書

Cold shock protein ファミリー dbpA の悪性リンパ腫の病態発生における役割

研究代表者 東 守洋 (埼玉医科大学 総合医療センター 病理部)

研究分担者 田丸 淳一¹⁾, 得平 道英²⁾, 川野 竜太郎³⁾

緒言

悪性リンパ腫は本邦において増加の一途をたどる悪性腫瘍のひとつである。われわれは以前より、悪性リンパ腫の診断ならびに研究・治療を行ってきた。

一方、ヒト Cold shock protein ファミリーは dbpA, YB-1, dbpC の3つが知られており、その中央に大腸菌で保存されている Cold shock domain とよばれる機能ドメインを有するのが特徴である (図1)。ヒトにおいて YB-1 が MDR 遺伝子の転写制御を行うことから、癌の薬剤耐性の観点から主に解析が進んでいる。しかしながら dbpA の機能はほとんどわかっていないのが実情である。そこで dbpA の機能を探る上でも、悪性リンパ腫の発生機序および病態の理解において、きわめて有用であると考えられる。

材料と方法

症例: 正常リンパ組織はヒト扁桃を用い、悪性リンパ腫症例は埼玉医科大学総合医療センター病理部に提出された検体を用いた。本解析に際し、当院倫理委員

会に承認されている (埼玉医科大学総合医療センター倫理委員会 No.246)。

免疫組織染色: dbpA に対する免疫染色を行い、10% 以上の腫瘍細胞に陽性であった症例を陽性とした。

培養細胞: ヒト悪性リンパ腫由来培養株細胞株 (HDLM-2, L428, L540, KM-H2, SU-DHL-1, Karpas 299, Raji, HT, Jurkat) は 10% FBS (GIBCO 社) と 1% Penicillin-Streptomycin (GIBCO 社) を添加した RPMI 培地 (GIBCO 社) 中にて、37°C, 5% CO₂ 下において培養した (なお培養細胞に関する実験は東京大学大学院新領域創成科学研究科渡邊俊樹教授との共同研究である)。また遺伝子導入に際しては、BTX 社 ECM600 を用いて行った。

抗体: ヒト dbpA に対する抗体は、ヒト dbpA の C 末端 14 アミノ酸 (TENPAPPTQSSAE) をウサギに免疫し樹立した。

ベクター: pIRES-AcGFP (Clontech 社) を BamHI で切断し、平滑末端化したのち、pcDNA3.1-dbpA (順天堂大学医学部病理・腫瘍学 樋野興夫教授より供与) の dbpA のコート領域を挿入し、発現ベクターとした。配列はシークエンサーにて確認した。

結果

ヒト dbpA に対する抗体を用い、正常リンパ組織での組織発現を検討した。その結果、活性化リンパ球の指標とされる CD30 の発現パターンと dbpA の発現パターンが類似していることを見出した (図2)。次に当院の悪性リンパ腫症例、約 500 例を用いて dbpA の発現解析を行い、WHO 分類 (第3版) に則った亜型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い頻度で発現していることを見出した。Hodgkin リンパ腫: 44/69 (64%), 未分化大細胞リンパ腫: 5/12 (42%) であった。一方、もっとも

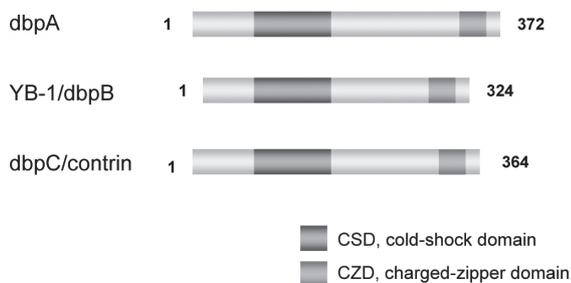


図1. Cold shock domain ファミリーの遺伝子の構造図。

1) 埼玉医科大学 総合医療センター 病理部
 2) 埼玉医科大学 総合医療センター 血液内科
 3) 埼玉医科大学 総合医療センター 歯科口腔外科

多いリンパ腫の疾患単位であるびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫DLBCLでは36/225 (16%)で、CD30陽性のリンパ腫に比べて低率であった。

DLBCLにおいてdbpAの発現と予後との検索から、その発現が予後不良因子となることを新たに見出した。現時点でdbpAの発現におけるDLBCLの亜型別(GCB:(Germinal center B-cell)型やnon-GCB型など)、EBV感染やBCL6, p53, BCL2などとのマーカーの相関は見出されていない。

dbpAの発現を種々の悪性リンパ腫細胞株でスクリーニングした結果、多くのリンパ腫細胞に発現がみられるが、HDLM-2, L428細胞株においてdbpAの発現がみられないことを見出した(図3)。次にこれらの細胞に安定的にdbpAを発現する細胞株を樹立した(図4)。

考察

本研究では主に、ヒトリンパ系組織、悪性リンパ腫症例ならびにヒトリンパ腫細胞株を用いてdbpAの機

能解析を行った。その結果、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の関与が示唆された。こうしたことからHodgkinリンパ腫を中心としたCD30陽性におけるdbpAの関わりを介してリンパ腫発生機構に重要な役割を有していることを見いだせたことは意義深い。今後はさらに遺伝子発現の網羅的解析を通じて、dbpAの発現に伴う遺伝子発現のプロファイリングを行う。

一方で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、DLBCLにおいてdbpAの発現がその予後との相関することを見出した。DLBCLにおけるdbpAの発現の意義を今後は疾患モデルの作製などを通じて行う予定である。

本研究の推進はリンパ腫、とりわけHodgkinリンパ腫を含めたCD30陽性のリンパ系腫瘍の病態の解明ならびに分子標的を用いた治療戦略の新しい道を切り開くものと期待される。

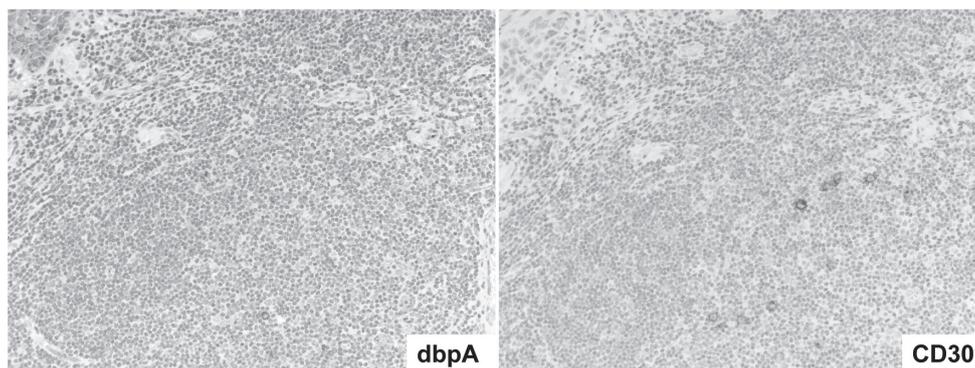


図2. ヒト扁桃組織におけるdbpAとCD30の免疫染色の結果。濾胞内および濾胞間領域、一部濾胞内に散在性に陽性細胞が観察され、両者の分布の類似が認められた。またdbpAは血管の一部にも陽性像を認めた。

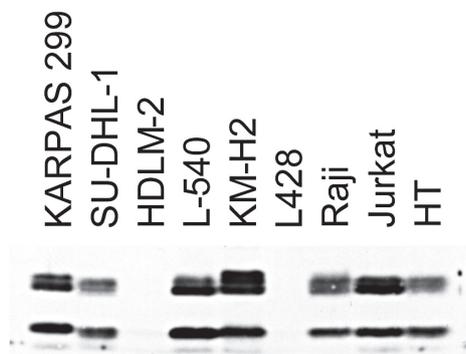


図3. 悪性リンパ腫細胞株におけるdbpAのタンパク発現の結果。HDLM-2ならびにL428ではdbpAの発現が認められなかった。

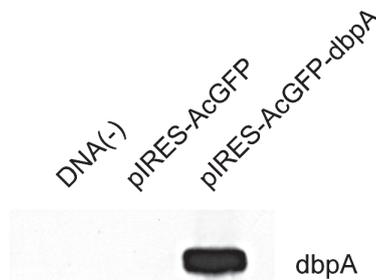


図4. dbpA発現安定細胞株の図。① DNAなし、② pIRES-AcGFP、③ pIRES-AcGFP-dbpA。

参考文献

- The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. Kohno K, Izumi H, Uchiumi T, Ashizuka M, Kuwano M. *Bioessays*. 2003 Jul;25(7):691-8.
- The up-regulation of Y-box binding proteins (DNA binding protein A and Y-box binding protein-1) as prognostic markers of hepatocellular carcinoma. Yasen M, Kajino K, Kano S, et al. *Clin Cancer Res*. 2005 · Oct 15;11(20):7354-61.
- Clinicopathologic characteristics and treatment outcome of the addition of rituximab to chemotherapy for CD5-positive in comparison with CD5-negative diffuse large B-cell lymphoma. Niitsu N, Okamoto M, Tamaru II, et al. *Ann Oncol*. 2010 Mar 26.
- Co-existence of acute myeloid leukemia with multilineage dysplasia and Epstein-Barr virus-associated T-cell lymphoproliferative disorder in a patient with rheumatoid arthritis: a case report. Tokuhira M, Hanzawa K, Watanabe R, et al. *J Hematol Oncol*. 2009 Jun 30;2:27.
- Age-related Epstein-Barr virus (EBV)-associated B-cell lymphoproliferative disorders: comparison with EBV-positive classic Hodgkin lymphoma in elderly patients. Asano N, Yamamoto K, Tamaru J, et al. *Blood*. 2009 Mar 19;113(12):2629-36.
- Pathology of malignant lymphoma Tamaru J, Kawano R, Momose S. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho*. 2009 Jun;112(6):465-73. Review. Japanese.

研究成果リスト

英語論文

- CD44 expression during tumor progression of follicular lymphoma. Higashi M, Sugaya Y, Soeta S, et al. *Oncol Rep*. 2009 Nov;22(5):1135-40.
- Human Mena associates with Rac1 small GTPase in glioblastoma cell lines. Higashi M, Ishikawa C, Yu J, et al. *PLoS One*. 2009;4(3)