

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

ATL 研究のための新しい実験系の創出

研究分担者 都築 忍

愛知県がんセンター研究所・遺伝子医療研究部・室長

研究要旨

本班では ATL の成立・進展に關与する遺伝子異常の抽出を課題としている。抽出した遺伝子異常の ATL 病態への寄与を実験的に解明するために、本分担課題研究では、昨年度、初代培養 T 細胞に任意の遺伝子を導入し、マウスに移植する系を確立した。本年度は本系の発癌研究への有用性を評価するために、既知のがん遺伝子 MYC、 BCL2、 CCND1 を組み合わせて T 細胞に導入し、マウスに移植した。その結果、高効率で T 細胞腫瘍を作出することが可能であった。腫瘍は CD4 陽性 CD8 陰性 T 細胞であったことから、本系は ATL の病態解明のための有用な実験系となりうる。

A. 研究目的

ATL で見られるゲノム異常がどのように病態に關与するのかを明らかにする目的で、昨年度、初代培養マウス T 細胞に簡便かつ高効率に遺伝子を導入する方法を確立した。本年度は、この方法によって、特定の遺伝子の腫瘍化への寄与をアッセイ可能かどうか検討した。

B. 研究方法

マウス胎児より未分化造血細胞を分離し、デルタリガンドを発現させた OP9 ストローマ細胞上で培養することにより、T 細胞を誘導する。その際に既知のがん遺伝子である Myc, Bcl2, Ccnd1 をレトロウイルスにより T 細胞に導入した。 Myc と

Bcl2 は一つのウイルスベクターで発現させ、マーカーとして GFP を共発現させた。 Ccnd1 は別ベクターで発現させ、ヒト CD4 細胞外ドメインをマーカーとして共発現させた。従って GFP 陽性細胞は Myc と Bcl2 を共に発現する細胞であり、ヒト CD4 を発現する細胞は Ccnd1 を発現する細胞である。遺伝子導入した細胞をマウスに移植し、造腫瘍性や生体内での細胞動態を解析した。

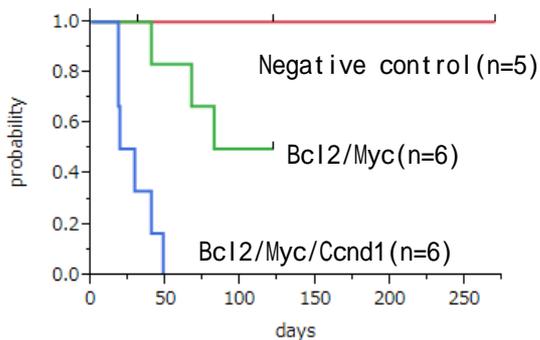
（倫理面への配慮）

本研究は愛知県がんセンター動物実験委員会および組み換え DNA 委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1. Bcl2+Myc を発現させた T 細胞を移植したマウスの半数は 120 日以内に死亡し、Bcl2・Myc・Ccnd1 を共に発現させた T 細胞を移植したマウスは全例が 50 日以内に死亡した。コントロールとして GFP 単独またはヒト CD4 単独で発現させた T 細胞を移植したマウスは無病であった(図 1)。

図 1



2. マウスは、リンパ節・脾臓・胸腺などの肥大をきたし(図 2)、病理組織学的にもリンパ性白血病/リンパ腫の所見であった(図 3)。

図 2

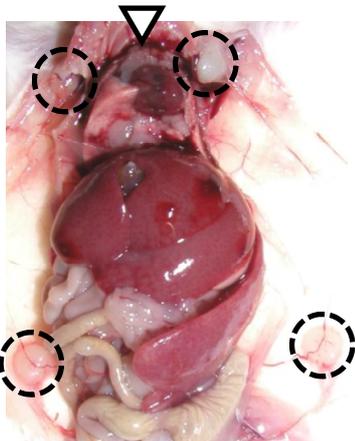
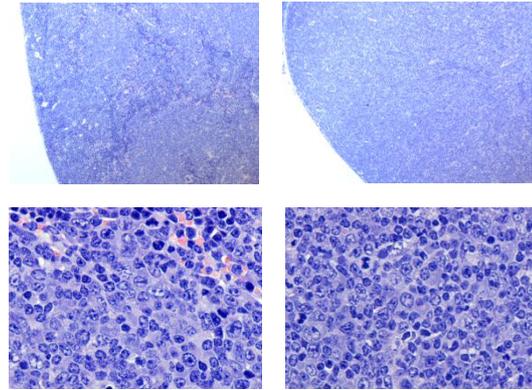


図 3



3. Bcl2・Myc・Ccnd1 を共に発現させた T 細胞を移植したマウスに発生した腫瘍は GFP 陽性かつヒト CD4 陽性であったことから、Bcl2・Myc・Ccnd1 の 3 者が協調して腫瘍化に至ったと考えられた。
4. 発生した腫瘍は Bcl2+Myc の場合も、Bcl2+Myc+Ccnd1 の場合も、ともに CD4 陽性 CD8 陰性であり、ATL に類似した表現型であった。

D. 考察

本研究により、初代培養マウス T 細胞に既知がん遺伝子を導入することにより再現性よく高効率に T 細胞性腫瘍が発生した。発生した腫瘍は CD4 陽性 CD8 陰性細胞であることから、本システムは ATL 研究に有用であることが期待される。導入遺伝子と同時に GFP やヒト CD4 をマーカーとして発現させているためマウス生体内での細胞追跡が可能である。現在、Kusabira オレンジやヒト CD8 などのマーカーも使用できるように改良しており、T 細胞に種々の遺伝子を同時に導入して、

その協調作用を解析することも可能である。今後は、HTLV1 ウイルスの主要ながん遺伝子である Tax や HBZ を T 細胞に導入し、さらにゲノム解析などで見出した付加的遺伝子異常を同細胞に再現することで ATL の成立・進展機構を解析していくことが重要であると考えられる。

E. 結論

1. 初代培養未分化造血細胞から誘導した T 細胞に Myc, Bcl2, Ccnd1 を組み合わせて遺伝子導入することにより効率よく T 細胞性腫瘍を誘導できた。
2. 発生した腫瘍は CD4 陽性 CD8 陰性であり、ATL 類似の表現型を示した。
3. 遺伝子導入した細胞には GFP や ヒト CD4 を共発現させることでマウス体内での追跡が可能であった。
4. ATL 関連遺伝子を T 細胞に導入することによって ATL の成立・進展機構を明らかにし、治療戦略の開発に役立てたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Liu F, Karube K, Kato H, Arita K, Yoshida N, Yamamoto K, Tsuzuki S, Kim W, Ko YH, 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.

2. 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, 2012.
3. 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 Med*, 1: 289-294, 2012.
4. 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.
5. Tsuzuki S, Seto M.: TEL (ETV6)-AML1 (RUNX1) Initiates Self-Renewing Fetal Pro-B Cells in Association with a Transcriptional Program Shared with Embryonic Stem Cells in Mice. *Stem Cells*, 31: 236-247, 2013.
6. Karube K, Tsuzuki S, Yoshida N, Arita K, Kato H, Katayama M, Ko YH, 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, (in press)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

2. 学会発表

1. 岸本 涉, 錦織桃子, 田嶋政治, 山本 玲, 坂井智美, 都築 忍, 瀬戸加大, 高折晃史.: Establishment of a mouse model for mantle cell lymphoma. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012, 札幌、ポスター (示説)
2. 加留部謙之輔, 都築 忍, 中村栄男, 瀬戸加大.: FOXO3 is a lineage-specific tumor suppressor gene to NK cell neoplasms. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012, 札幌、ポスター (示説)
3. 都築 忍、瀬戸加大.: Cooperation of altered AML1/RUNX1 with BCR-ABL in inducing blast crisis-like disease of chronic myelogenous leukemia. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012, 札幌、ポスター (示説)
4. 吉田稚明, 海野 啓, 劉 芳, 在田幸太郎, 加留部謙之輔, 都築 忍, 大島孝一, 瀬戸加大.: Identification of multiple subclones in Peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified with genomic aberrations. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012, 札幌、口演