

## 論文の内容の要旨

論文題目

悪性リンパ腫における TGF- $\beta$ シグナルの機能解析

指導教員 宮園 浩平教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 19 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 川畑 公人

Transforming growth factor (TGF)- $\beta$ は Bone morphogenetic protein (BMP)、Activin などと並ぶ TGF- $\beta$ ファミリーのサイトカインである。TGF- $\beta$ は、細胞増殖やアポトーシスの制御などの多彩な作用を示し、悪性腫瘍の発症や進展にかかわっている。初期の腫瘍細胞に対しては、TGF- $\beta$ は p15<sup>Ink4</sup> や p21<sup>Cip1</sup> などの発現誘導、もしくは Myelocytomatosis oncogene (c-MYC)の発現抑制を介して細胞周期を停止させる。あるいは TGF- $\beta$ は B-cell leukemia/lymphoma (Bcl)-2 や Bcl-2 like 1 (Bcl2l1, Bcl-X<sub>L</sub>)などの発現抑制し、アポトーシスを誘導するなど、腫瘍抑制因子のひとつと想定されている。ところが、腫瘍の進行期では、TGF- $\beta$ は腫瘍細胞に上皮間葉移行 (Epithelial-mesenchymal transition; EMT)を起こし、運動・浸潤能を亢進させるなど、TGF- $\beta$ が悪性腫瘍の進展に促進的に作用することも知られて

いる。

他方で B 細胞性悪性腫瘍の進展における TGF- $\beta$  の役割に関しては未だ十分な解析がなされていない。そこで本研究では B 細胞性腫瘍、とくに Burkitt リンパ腫の進展において、TGF- $\beta$ /BMP シグナルがどのような作用をもたらすか、解析した。

まず、半定量的 RT-PCR を用い、Burkitt リンパ腫細胞株 Ramos における II 型受容体、I 型受容体、および Smad の発現を評価した。その結果、TGF- $\beta$  および BMP により Smad 依存的なシグナルを伝達するのに十分なシグナル伝達因子の発現が確認された。そこで Ramos 細胞を TGF- $\beta$ 3 および BMP-4 で刺激したところ、R-Smad のリン酸化、標的遺伝子の発現誘導を確認され、Ramos 細胞での TGF- $\beta$  および BMP による Smad 依存的なシグナルの伝達を確認された。

次にそれらのシグナルが Ramos 細胞の *in vitro* での細胞増殖にどのような影響をもたらすかを調べた。BMP-4 は Ramos 細胞の増殖に影響しなかったが、TGF- $\beta$ 3 は Ramos 細胞の増殖を抑制することが分かった。また、flow cytometry を使用して細胞周期の解析したが、TGF- $\beta$ 3 は Sub-G1 分画の細胞の割合を増加させることがわかった。これに一致して、TUNEL 染色では TGF- $\beta$ 3 により Ramos 細胞の DNA の断片化が増強することが分かり、TGF- $\beta$  が Ramos 細胞のアポトーシスを誘導することが判明した。

次に、TGF- $\beta$ が Ramos 細胞の *in vivo* での腫瘍形成にどのように影響するかを検討した。細胞内ドメインを欠失した II 型受容体変異体 dominant negative dnT $\beta$ RII (dnT $\beta$ RII)は、TGF- $\beta$ シグナルを優性阻害的に作用するため、今回は dnT $\beta$ RII を安定発現した細胞 (Ramos-dnT $\beta$ RII)を樹立し、移植することを試みた。Ramos-dnT $\beta$ RII 細胞は、コントロールと比較して Smad2 のリン酸化が抑制され、また TGF- $\beta$ シグナルの標的遺伝子の発現が抑制されており、TGF- $\beta$ シグナルの伝達が抑制されていると判断した。ヌードマウスの皮下にこれらの細胞を移植し、腫瘍の形成を観察したところ、Ramos-dnT $\beta$ RII 細胞では腫瘍形成能が亢進していた。Ramos-dnT $\beta$ RII 細胞から形成された腫瘍の凍結切片では TUNEL 陽性細胞が減少しており、dnT $\beta$ RII の発現は Ramos 細胞のアポトーシスの減少させることで腫瘍形成能を亢進させていると示唆された。

多くの癌細胞では、この場合、TGF- $\beta$ により c-MYC の発現が抑制され、TGF- $\beta$ によりアポトーシスが誘導されることが知られている。また、Burkitt リンパ腫では、c-MYC が免疫グロブリン重鎖 (Immunoglobulin heavy chain; IGH)との間で組み換えが起こっていることがわかっている。これらの事実から、TGF- $\beta$ によって Ramos 細胞のアポトーシスが誘導される際には、c-MYC の発現が抑制されていると予想した。、しかしながら、定量的 Real-time RT-PCR、もしくは Western blot の結果では、TGF- $\beta$ は Ramos 細胞の c-MYC の発現調節にほとんど寄

与しないことが分かり、TGF- $\beta$ によるアポトーシスの誘導には、他の遺伝子の発現変動が重要であると予想された。

そこで、TGF- $\beta$ によって Ramos 細胞のアポトーシスが誘導される場合、どのような遺伝子発現の変動が起こっているかを把握するために、Microarray を用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、Ramos 細胞における TGF- $\beta$ の標的遺伝子を検索した。その結果、TGF- $\beta$ で発現が抑制される遺伝子のなかに、Ramos 細胞の生存に関係しうる候補遺伝子が二つ含まれていた。一つは *Bcl-X<sub>L</sub>* である。

*Bcl-X<sub>L</sub>* は細胞内ではミトコンドリアに局在し、抗アポトーシス作用をもたらすが、この *Bcl-X<sub>L</sub>* が TGF- $\beta$ による発現制御を受けることは既知の事実である。もう一つの候補遺伝子は Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1 (*MS4A1*) である。*MS4A1* の翻訳産物は CD20 ともよばれ、多くの B 細胞性腫瘍の腫瘍細胞表面にも発現している。この CD20 の下流では腫瘍細胞の生存にかかわるシグナルが伝達すると考えられており、以降は、TGF- $\beta$ による *MS4A1* の発現制御に着目し、研究をすすめた。

TGF- $\beta$ が Ramos 細胞の *MS4A1* の発現を抑制する事を確認するために、定量的 Real-time RT-PCR と flow cytometry を行った。それぞれの実験から、Ramos 細胞における細胞内 *MS4A1* mRNA 量、また細胞表面 *MS4A1* タンパク量が TGF- $\beta$  刺激により低下していることが確認され、Microarray の結果が再現されたと考え

られた。また Ramos 細胞の MS4A1 の発現が BMP によって抑制することはなく、この発現制御機構は TGF- $\beta$  に特異的なものと予想されたが、このことは TGF- $\beta$  のみが Ramos 細胞のアポトーシスを誘導した事実とも符合していると考えられた。さらに、タンパク合成阻害剤 cycloheximide (CHX) の存在下での発現制御を確認したが、CHX 存在下では TGF- $\beta$  による MS4A1 の転写抑制は消失していた。よって、TGF- $\beta$  が Ramos 細胞の MS4A1 の発現が抑制する際には、まだ同定されてはいないが、TGF- $\beta$  の標的である未知のタンパクが MS4A1 の転写を制御していると想定された。

これまでの解析結果から、TGF- $\beta$  が Ramos 細胞のアポトーシスを誘導するには、TGF- $\beta$  の下流で MS4A1 が抑制されることが重要である、と仮説をたてた。このことを確認するため、MS4A1 を強制発現させた Ramos 細胞 (Ramos-MS4A1) を樹立し、Ramos 細胞の増殖に対する影響を観察した。予想の通りに、Ramos-GFP 細胞では TGF- $\beta$  刺激により細胞増殖が減弱されるのに対し、Ramos-MS4A1 細胞では TGF- $\beta$  刺激を行っても細胞増殖の抑制が減弱していた。この結果は、TGF- $\beta$  により発現が低下する MS4A1 を、外因的に発現させておくことで、TGF- $\beta$  による増殖抑制から回復していることによる、と考えられた。なお、前述の Microarray からは、Ramos 細胞の生存に関係する遺伝子として、MS4A1 と並んで *Bcl-X<sub>L</sub>* が注目された。Ramos 細胞において、MS4A1 の下流で

Bcl-X<sub>L</sub>の発現が制御されている可能性があるか検討するために、MS4A1 強制発現時の Bcl-X<sub>L</sub>の発現量についても調べた。しかしながら、Ramos-GFP 細胞と Ramos-MS4A1 細胞の間に、Bcl-X<sub>L</sub>の発現量に差を見出すことはできなかった。よって、MS4A1 は Bcl-X<sub>L</sub>とは独立したシグナル経路で、Ramos 細胞のアポトーシスを制御しているものと考えられた。

MS4A1 に対するモノクローナル抗体である rituximab は、現在 MS4A1 陽性成熟 B 細胞リンパ腫の治療において、中心的な薬剤のひとつとして使用されているが、約 30%の患者においては治療抵抗性や治療無効例が認められる。そこで、B 細胞リンパ腫の rituximab 不応性の獲得に、TGF-βシグナルの亢進による分子標的 MS4A1 の発現抑制が関与している可能性について言及した。Ramos 細胞に rituximab を添加した場合、Ramos 細胞は凝集し、さらにその後細胞死が誘導される。これに対し、TGF-β3で刺激された Ramos 細胞では、rituximab により誘導される細胞凝集が低下していることが確認された。今回我々が新たに見出した TGF-βによる MS4A1 の発現低下が Ramos 細胞の rituximab への感受性を低下させていると考えられた。

これらの結果から B 細胞性腫瘍の進展に対して TGF-βは抑制的に作用している可能性、また B 細胞性腫瘍の rituximab 耐性の獲得にも関わっている可能性が示唆された。