

氏 名	ありた こうたろう <b>在田 幸太郎</b>
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	富医薬博甲第 119 号
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 21 日
学位授与の要件	富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当
教 育 部 名	富山大学大学院医学薬学教育部 医学領域 博士課程 生命・臨床医学専攻
学位論文題目	<b>Generation of mouse models of lymphoid neoplasm using retroviral gene transduction of <i>in vitro</i>-induced germinal center B and T cells (マウス正常BおよびT細胞へのレトロウイルス遺伝子導入法を 用いたリンパ系悪性腫瘍マウスモデルの作製)</b>
論文審査委員	
(主査)	教 授 北島 勲
(副査)	教 授 二階堂敏雄
(副査)	教 授 笹原 正清
(副査)	教 授 戸邊 一之
(指導教員)	教 授 杉山 敏郎

## 論文内容の要旨

### 〔目的〕

成熟 B 細胞性腫瘍は日本での全悪性リンパ腫の約 3/4 を占める疾患であり、形態・分化段階・遺伝子異常などにより複数の疾患単位に分類される。リンパ腫の分子生物学的研究は転座関連遺伝子を軸として展開されてきたが、近年の検査技術の進歩により、単一疾患単位の中でも多彩なゲノムコピー数異常・遺伝子発現異常・遺伝子変異をとることが明らかとなった。それら複数観察されるゲノム異常のうち、どの組み合わせが真に腫瘍化に寄与するかを検討することで、適切な治療標的を絞り込んでいくことができると考える。しかし、臨床検体での検討から報告される個々の遺伝子異常について遺伝子改変マウスを作出し、それらを掛け合わせていく現行の方法では、多数の遺伝子異常を評価することが困難であり、簡便な系の確立が求められていた。

そこで今回、我々は *in vitro* でのマウス正常成熟 B 細胞への遺伝子導入系を確立し、腫瘍化能を *in vivo* で検討できる系を作出した。また、B 細胞リンパ腫より一般的に難治である T 細胞リンパ腫においても同様の評価系を確立するため、正常 T 細胞における遺伝子導入法およびマウスモデルを作出した。さらに確立した B 細胞の系を用いて、バーキットリンパ腫の網羅的解析から推定される遺伝子異常のうち、真に腫瘍化に寄与する新規の組み合わせを同定した。

### 〔方法〕

1. 成体 C57BL/6 マウスの脾臓から B220 陽性 B 細胞を分離し、マウス Cd40l と Baff を発現させたフィーダー細胞上で IL-4 および IL-21 存在下に共培養することで、胚中心様細胞 (GCB 細胞) を誘導した。そこにレトロウイルスベクターを用いて Myc、Bcl2 といった遺伝

子を導入し、NSG マウスあるいは放射線照射 BL/6 マウスに移植した。得られた腫瘍は BL/6 マウスに二次移植した。腫瘍の表現型はフローサイトメトリー、免疫組織化学によって評価した。腫瘍のクローナリティーは IgHV 鎖の再構成をターゲットに PCR 法で評価した。新規組み合わせの検討の際には、Myc-CCND3<sup>T283A</sup>、E47<sup>V557E</sup>、Akt、TCL1A の各発現ベクターを作成して使用した。

2. 妊娠 14.5 日目の BALB/c マウス胎仔肝から Ter-119 陰性細胞を分離し、マウス D11 発現 OP9 細胞上で Flt-3L および IL-7 存在下に共培養することで、成熟 T 細胞を誘導した。そこにレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入し、放射線照射 Balb/c マウスに移植した。得られた腫瘍は二次移植した。表現型はフローサイトメトリーで評価した。クローナリティーは TCRβ 鎖の再構成をターゲットに PCR 法で確認した。ヒト末梢性 T 細胞リンパ腫検体の網羅的発現解析の RAW データ (GSE19069) を NCBI GEO より入手し、R および Cluster 3.0 software を用いて解析した。

#### 〔成績〕

1. Myc/Bcl2 を導入した GCB 細胞を移植すると、NSG、BL/6 マウスともに腫瘍形成を認めた。得られた腫瘍は大部分が Myc<sup>+</sup>/Bcl2<sup>+</sup> の double positive 分画であり、single positive 分画はほとんど観察されなかった。Myc あるいは Bcl2 を単独で導入した GCB 細胞ではマウスに腫瘍形成しなかったことから、2 遺伝子が協調して腫瘍化に至ると考えられた。次に BL/6 マウスに形成された Myc<sup>+</sup>/Bcl2<sup>+</sup> の腫瘍を詳細に評価したところ、組織学的には脾臓で centroblast および centrocyte が増殖しており、確かに胚中心細胞由来の腫瘍であることが確かめられた。FACS と免疫組織化学では、post-germinal center B-cell に相当すると考えられた。1 例での検討では体細胞突然変異を認めなかったが、IgHV 鎖はクローナルであることが示唆され、なんらかの生体内修飾を受けているものと考えられた。

転座関連遺伝子 *Myc* を軸として協調遺伝子を探索したところ、高頻度変異遺伝子を加えた *Myc*<sup>+</sup>/*CCND3*<sup>T283A+</sup>/*E47*<sup>V557E+</sup>だけでは腫瘍化しなかった。そこに高発現遺伝子として同定された *TCL1A*、*Akt* を加えた 5 因子とすることで、腫瘍化が得られた。

2. pre-B 細胞での知見 (Nakagawa M, *et al. Haematologica* 2011) から *Myc/Bcl2/Ccnd1* を T 細胞に導入してマウスに移植すると、速やかな末梢性 T 細胞由来の腫瘍形成が得られた。*Myc/Bcl2* の 2 因子でも腫瘍化は得られたが、観察期間中にすべてのマウスに腫瘍化が得られるわけではなく、他の因子の協調が必要なものと考えられた。PCR 法により *Myc/Bcl2/Ccnd1* による腫瘍はポリクローナルであったことから、これら 3 因子は T 細胞腫瘍形成に必要十分であると考えられた。また、これら 3 因子が実際にヒト検体でも協調しうることを、網羅的発現解析の再解析により確認した。

#### 〔総括〕

今回の研究により、遺伝子異常の組み合わせによる腫瘍化能を *in vivo* で評価できる系を作出できた。正常細胞を直接腫瘍化する因子を同定できる点に大きな意義がある。また我々の系の特徴は *in vitro* で複数の遺伝子を同時に導入することが容易なことであり、実際に B 細胞の系を用いて、網羅的解析から予想された 5 つの遺伝子異常の組み合わせでの腫瘍化能を評価できた。この手法を用いることで、病態の解明を進めることができるだけでなく、近い将来に行われるだろう分子標的治療薬の併用に対して基礎的な裏付けを提供することができると考えている。

# 学 位 論 文 審 査 の 要 旨

## 【目的】

リンパ腫は、形態、分化段階、遺伝子異常等により多くの疾患単位が分類されている。また、近年の遺伝子解析検査の進歩によりこれまで単一単位と考えられていた疾患が、多彩な遺伝子変異や遺伝子発現異常を呈することが明らかになってきた。複雑な遺伝子異常のどの組み合わせが腫瘍化に重要であるかを決定することは、効果的な分子標的治療法の確立に重要である。しかし、臨床検体から得られる個々の遺伝子異常について個別に遺伝子改変マウスを作出し、それらを交配する現行の解析方法では、多数の遺伝子機能を評価するには限界がある。そこで在田幸太郎氏は、*in vitro* でまずマウス正常成熟 B 細胞へ遺伝子導入し、次に *in vivo* における腫瘍化能を評価できる簡便な B 細胞リンパ腫解析法を確立し、その有用性を評価することを目的に研究を行った。また、T 細胞リンパ腫においても同様の評価系を確立するため、正常 T 細胞の遺伝子導入法と腫瘍能評価のマウスモデル作出も試みた。さらに、確立した B 細胞系がバーキットリンパ腫の網羅的解析から推定された遺伝子異常のうち、腫瘍化に寄与する新規組み合わせの同定に寄与できるか検討した。

## 【方法】

1) C57BL/6 マウス脾臓から B220 陽性細胞を分離し、IL-4 と IL-21 存在下で Cd40l と Baff 発現フィーダー細胞と共培養して胚中心様細胞(GCB 細胞)を誘導した。レトロウイルスベクターを用いて Myc, Bcl2 遺伝子を GCB 細胞に導入し、NGS マウスと放射線照射 BL/6 マウスに移植して得られた腫瘍細胞を BL/6 マウスに二次移植した。腫瘍はフローサイトメトリーと免疫組織化学で表現型、PCR で IgH V 鎖再構成を評価した。新規組み合わせ検討には、Myc-CCND<sup>3T283A</sup>、E47<sup>V557E</sup>、Akt、TCL1A の各発現ベクターを作成して使用した。

2) BALB/c マウス胎仔肝から Ter-119 陰性細胞を分離し、Dl1 遺伝子発現 OP9 細胞上で Flt-3L と IL-7 存在下で共培養して成熟 T 細胞を誘導した。レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入後に得られた腫瘍を二次移植した。表現型をフローサイトメトリー、TCR $\beta$  再構成を PCR で確認した。ヒト末梢血 T 細胞リンパ腫検体の網羅的発現解析の RAW データを NCBI GEO より入手し解析した。

### 【結果】

1) Myc/Bcl2 導入 GCB 細胞は腫瘍を形成したが、Myc あるいは Bcl2 単独導入 GCB 細胞では腫瘍が形成されなかった。Myc+/Bcl2+腫瘍は、脾臓で centroblast と centrocyte が増殖していたことより胚中心細胞由来腫瘍であることが確認でき、post-germinal center B-cell に相当すると考えられた。また、IgH V 鎖はクローナルであることが明らかになった。転座関連遺伝子 Myc を軸に網羅的遺伝子探索結果に基づいた高頻度変異遺伝子 Myc+/CCND3<sup>T238A</sup>+/E47<sup>V557E</sup>+導入だけでは腫瘍化しなかった。さらに高発現遺伝子として同定されていた TCL1A、Akt を加えた 5 因子導入で腫瘍化が確認された。

2)Myc/Bcl2/Ccnd1 を T 細胞に導入しマウスに移植すると末梢血 T 細胞由来腫瘍の形成が確認された。Myc/Bcl2 遺伝子導入の腫瘍化は限定的であり、Myc/Bcl2/Ccnd1 による腫瘍はポリクローナルであった。この 3 因子はヒト検体で協調して発現していることを網羅的発現解析により確認した。

### 【総括】

本研究により、レトロウイルスベクターを利用してマウス正常 B 細胞へ複数の遺伝子導入後に腫瘍化能を *in vivo* で簡便に評価できる系が確立をされた。実際に成熟 B 細胞の系を用いて、網羅的解析から予想された Myc、CCND3<sup>T238A</sup>、E47<sup>V557E</sup>、TCL1A、Akt の 5 因

子の遺伝子異常の組み合わせ導入で腫瘍化能を評価できることを明らかにした。本委員会は、今まで報告がない正常 B 細胞を標的にした直接腫瘍化する因子を同定できる実験系を確立した点に学術的価値を認める。また、バーキットリンパ腫の網羅的遺伝子解析データから推定される遺伝子異常のうち実際に腫瘍化に寄与する新しい組み合わせを明らかにした点に新規性が認められる。本研究はマウス実験系モデルであるため、遺伝子導入により得られた腫瘍表現型がヒトの疾患と相違が生じる可能性があるものの、一般に難治性である T 細胞リンパ腫の評価系の確立や病態解明のみならず分子標的薬に対する基礎的な裏付けを提供できる臨床的発展性が期待される。よって、本審査委員会は、本研究が本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。