

主論文の要旨

**Synergistic activity of *Card11* mutant and *Bcl6*
in the development of diffuse large B-cell
lymphoma in a mouse model**

〔 び慢性大細胞型 B 細胞性リンパ腫マウスモデルにおける
変異型 *Card11* と *Bcl6* の協調 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
高次医用科学講座 臓器病態診断学分野

(指導：中村 栄男 教授)

高原 大志

【背景】

び慢性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (DLBCL) は悪性リンパ腫の一亜型であり、胚中心 B 細胞から発生するとされており、その多くは発現解析により、活性化型 B 細胞に類似した Activated B-cell like (ABC)-DLBCL、胚中心 B 細胞に類似した Germinal center B-cell like (GCB)-DLBCL の 2 群に分類される。DLBCL について多数の遺伝子異常がこれまでに報告されているものの、何れの遺伝子異常が発症に寄与しているのか、また複数の遺伝子異常の間に協調作用があるのかといった問題は十分に解明されていない。この問題を検証するため、以前我々が確立した、*in vitro* で成熟 B 細胞から胚中心 B 細胞を誘導し (induced Germinal center B-cell: iGCB cell)、レトロウイルスにより腫瘍関連遺伝子を導入して免疫不全マウスに移植する系を用いた。今回我々は DLBCL のリンパ腫関連遺伝子として知られている *Card11*、*Bcl2*、*Bcl6* について評価した。*Bcl2*、*Bcl6* はそれぞれアポトーシス抑制、胚中心 B 細胞の分化に関与する。これらの遺伝子についてのリンパ腫発症遺伝子改変 (Knock-in) マウスモデルは既に存在するが、発症までに時間がかかることと、発症したリンパ腫には他の遺伝子異常が加わっていることから、これらの単独の遺伝子異常ではリンパ腫発症に至らないと考えられている。*Card11* はその変異によって NF- κ B 経路を恒常的に活性化させることが知られている。近年変異型 *Card11* の遺伝子改変 (トランスジェニックマウス) のリンパ腫マウスモデルが報告されたが、その一方で、ヒトの胚細胞型 *Card11* 変異は必ずしもリンパ腫を発症させないとする報告もあり、*Card11* 変異に関しても、単独でリンパ腫を発症させることができるかどうかに関してはいまだ明らかではない。また、*Card11* 変異、*Bcl2* および *Bcl6* の発現上昇をもたらすような遺伝子異常はヒトの B 細胞性リンパ腫においてしばしば合併することが知られているため (図 1)、これらの遺伝子異常のリンパ腫発症における協調の有無を検証した。

【方法】

BL6 マウスの脾臓から分離した B220 陽性 B 細胞を、サイトカイン存在下で CD40L、BAFF を発現した 3T3 細胞と共培養し、これにより胚中心 B 細胞を誘導した。この B 細胞に、レトロウイルスベクターを用いて、*Card11*^{L232LI}、*Bcl2*、*Bcl6* の 3 種の遺伝子を導入し、NOD-SCID マウスに腹腔内接種した。いずれの遺伝子が導入されたか、フローサイトメトリーで解析可能とするために、ベクターにはそれぞれマーカーとして GFP、hCD8、hCD4 を組み込んだ。

【結果】

3 種のレトロウイルスベクターすべてを導入した細胞を移植した群 (n=6) および *Card11*^{L232LI} および *Bcl6* の 2 種を導入した細胞を移植した群 (n=11) はいずれも 2 か月以内にリンパ腫を発症するか死亡した (図 2)。3 種のレトロウイルスベクターすべてを導入した細胞を移植した群において発症したリンパ腫をフローサイトメトリーで解析すると、いずれの腫瘍も *Card11*^{L232LI}、*Bcl6* のサロゲートマーカーである GFP、hCD4

をほぼすべての腫瘍細胞が発現していたが、*Bcl2* のサロゲートマーカーである hCD8 を発現する腫瘍細胞はごく少数にとどまっており、これらの腫瘍形成における外因性の *Bcl2* の寄与は限定的であった (図 3)。その一方で、*Card11^{L232LI}* および *Bcl6* の 2 種を導入した群のリンパ腫の BCL2 タンパク発現は正常 B 細胞に比して上昇しており、内因性の *Bcl2* の関与が示唆された (図 4)。また、*Card11^{L232LI}* および *Bcl6* の 2 種を導入した細胞を移植した群 (n=11) のうち 7 体の腫瘍細胞をフローサイトメトリーで解析したところ、4 体において *Card11^{L232LI}*、*Bcl6* のサロゲートマーカーである GFP、hCD4 の両方の発現が認められたが、3 体においては hCD4 の発現は少数にとどまっていた (図 5)。しかし、これらの 3 体のうち、2 体の腫瘍細胞における BCL6 タンパクの発現は、hCD4 を発現している腫瘍細胞と同等であり (図 6)、内因性の BCL6 の発現上昇、または腫瘍発生の過程における BCL6 高発現クローンの選択が示唆された。1 体の腫瘍においては内因性の BCL6 の発現も低く (図 6)、*Card11^{L232LI}* 単独で腫瘍形成能を持つことが示唆された。*Card11^{L232LI}* 単独導入群 (n=5) では 2 体のマウスで腫瘍形成が認められたが (図 7)、イベント (リンパ腫発症又は死亡) 発生までの期間は *Bcl6* と共に導入した群に比して有意に延長しており、*Card11^{L232LI}* と *Bcl6* のリンパ腫発症における協調が示唆された。*Bcl6* 単独導入群では 3 体中 1 体が死亡したが、リンパ腫発症は認められなかった。

また、腫瘍細胞は形質細胞分化に重要な転写因子である PRDM1 および、ABC-DLBCL のマーカー分子である IRF4、FOXP1 を高発現しており、ABC-DLBCL に類似した形質を有することが示された (図 8)。また、ABC-DLBCL の特徴である NF- κ B 経路の活性化が認められた (図 9)。

【考察】

以下の結果より、我々のマウスモデルにおける変異型 *Card11* と *Bcl6* のリンパ腫発症における協調が示された。1) *Card11^{L232LI}/Bcl6/Bcl2*、または *Card11^{L232LI}/Bcl6* の導入を受けた B 細胞を移植されたマウスのうち (n=10)、7 体は導入された *Card11^{L232LI}* および *Bcl6* のサロゲートマーカーを発現していた。2) 残りの 3 体のうち 2 体では内因性の BCL6 の高発現が認められた。3) *Card11^{L232LI}* および *Bcl6* の両方を導入した B 細胞を移植したマウスは、どちらか片方のみを導入した B 細胞を移植したマウスより優位にイベント (リンパ腫発症又は死亡) 発生までの期間が有意に短縮していた。

今回の結果では *Bcl2* の腫瘍形成の寄与は認められなかった。これは *Bcl2* が NF- κ B 経路の標的遺伝子であり、変異型 *Card11* によって活性化された NF- κ B 経路によって BCL2 の発現が誘導されたためと考えられる。

【結論】

今回の結果により、NF- κ B 経路の恒常的な活性化をもたらす変異型 *Card11* と、分化の停止をもたらす *Bcl6* の協調が DLBCL の発症に重要な役割を果たしていることが示された。

DLBCL において報告されている多数の遺伝子異常についても今回の検討と同様の評価が可能と考えている。さらに DLBCL 治療薬の *in vivo* モデルとしての応用を期待される。