

## 内 容 要 旨 目 次

### 主 論 文

Frequent downregulation of BACH2 expression in Epstein–Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma

(EBV 陽性びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫における BACH2 の高率な発現低下)

能島(原田)舞、高田尚良、高田(宮田)友子、櫻井宏明、五十嵐和彦、伊藤悦朗、永喜多敬奈、谷口恒平、大西信彦、表 静馬、田端哲也、佐藤康晴、吉野 正

Cancer Science (掲載予定)

平成 27 年 4 月 第 104 回 日本病理学会総会に発表

## 主 論 文

### Frequent downregulation of BACH2 expression in Epstein–Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma

(EBV 陽性びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫における BACH2 の高率な発現低下)

#### 【緒言】

EB ウイルス (Epstein–Barr virus、EBV) 感染を有する EBV 陽性びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (diffuse large B-cell lymphoma、DLBCL) はアジア諸国において DLBCL の 8~10% を占め、免疫不全や先行リンパ腫のない 50 歳以上の高齢者に多く発症する。EBV 陰性 DLBCL と比較して予後不良で、2008 年 WHO 分類で 1 つのカテゴリーとして掲載された。

BTB and CNC Homology 2 (BACH2) は B 細胞の形質細胞分化に関わる転写調節因子である。最近では腫瘍抑制因子としての働きが注目されているが、EBV 陽性 DLBCL での BACH2 の役割は明らかにされていない。我々の検討では EBV 陽性 DLBCL で高率に BACH2 発現が低下していた。この結果をふまえて、BACH2 発現低下が EBV 陽性 DLBCL の悪性度の高さにどのように関与しているか解析した。

#### 【材料と方法】

##### 患者検体

EBV 陽性 DLBCL 23 例、EBV 陰性 DLBCL 43 例のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた。3 人の病理医が 2008 年 WHO 分類に基づいて診断した。

##### 免疫組織化学、*in situ* hybridization

自動免疫染色装置 (Bond-max) を使用して CD20、CD3、CD10、CD5、Ki-67、LMP1、MUM-1、NFκB p65、BCL-6、GCET1、NFκB p105/p50、NFκB2 p100/p52、FOXP-1、BACH2 を染色した。EBV の同定には Epstein–Barr virus encoded small RNA (EBER) プローブ (Leica Microsystems) を用いて *in situ* hybridization を行った。

##### Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

赤色標識 *BACH2* プローブと緑色標識 *CEP6* プローブを用い、37°C で 48 時間ハイブリダイズした。*BACH2* の同定には約 500kb を認識する 3 つのプローブを混合して用いた。*CEP6* シグナルを 2 つ有する細胞について *CEP6* シグナルに対する *BACH2* シグナルの割合を計算し、20~60% を両アレル欠失、60~80% を単一アレル欠失とした。

### 細胞株、RT-PCR

ヒト非ホジキンリンパ腫細胞株 (FL-18、FL-218、FL-318) と EBV 感染を有する娘細胞株 (FL-18-EB) から RNA 抽出、cDNA 作成を行い、*BACH2* を増幅した。

### トランスフェクション

Neon™ transfection system (Life Technologies) を用いて、FL-18-EB に *BACH2* 遺伝子を含む pIRES2-EGFP プラスミドを導入した。適切な導入条件 (pulse voltage; 1100 V, pulse width; 30 ms, 1 time) はコントロールプラスミド pmaxGFP™ (Amara Bioscience) を用いて設定された。

### ウェスタンブロットイング

細胞株から作成したサンプルを SDS-PAGE で分離したのち、Trans-Blot Turbo™ Blotting System (Bio-Rad) を用いてニトロセルロース膜に転写した。nuclear/cytosol fractionation kit (BioVision) を用いて核内成分サンプル、細胞質内成分サンプルに分けた。

### 統計解析

$\chi^2$  検定、*t* 検定は Statcel3 software (OMS Ltd.) を用いて行った。Kaplan–Meier 曲線は Statistical Package for Social Sciences (SPSS; Version 14.0; IBM) を用いて作成した。 $P < 0.05$  である場合に統計学的有意差ありと判定した。

### **【結果】**

#### BACH2 は EBV 陽性 DLBCL で有意に発現が低下している

EBV 陽性例は EBV 陰性例と比較して有意に予後不良で、有意差をもって activated B-cell like phenotype (ABC phenotype) を示した。免疫組織化学にて EBV 陰性 43 例中 38 例 (88.4%)、EBV 陽性 23 例中 5 例 (21.7%) が *BACH2* 陽性で、EBV 陽性例で *BACH2* の発現が有意に低下していた。ABC type に限定しても EBV 陽性例で *BACH2* 発現が有意に低下しており、*BACH2* 発現低下が EBV 感染の有無に起因することが示された。EBV 感染の有無と *BACH2* の発現強度 (発現低下、弱陽性、強陽性) で検討したところ有意差はなく、*BACH2* の発現強度ではなく、*BACH2* の発現の有無に意味があることが分かった。

#### EBV 陽性 DLBCL、FL-18-EB において、*BACH2* 両アレル欠失は同定されない

EBV 陽性 23 例のうち免疫組織化学で *BACH2* 陰性であった 18 例の FISH を行ったところ、15 例 (83.3%) で *BACH2* 遺伝子の欠損はなく、3 例 (16.7%) で単一アレル欠失を認めた。両アレル欠失を示す症例はなかった。EBV 陰性例では *BACH2* 遺伝子の欠損を認めなかった。細胞株 (FL-18、FL-218、FL-318、EB-18-EB) を用いた解析では、RT-PCR にて FL-18-EB でのみ *BACH2* 遺伝子の mRNA の発現低下を認めた。免疫組織化学で FL-18

は BACH2 陽性であったが、FL-18-EB は BACH2 陰性であり、RT-PCR の結果を支持した。FISH にて FL-18、FL-18-EB で *BACH2* 遺伝子の欠損はみられなかった。以上より、細胞株を用いた解析は患者組織検体を用いた解析結果を反映するものであった。

#### FL-18-EB への *BACH2* 遺伝子導入により、TAK1 を介する NFκB 経路が抑制される

FL-18-EB に *BACH2* 遺伝子を導入し、ウェスタンブロットィングで NFκB 経路の上流蛋白 transforming growth factor-β-activated kinase 1 (TAK1) の発現をみた。FL-18-EB では、FL-18 ではみられない TAK1 の active form、pTAK1 の発現を認めるが、*BACH2* 遺伝子導入により pTAK1 発現が低下した。total TAK1 の発現に差はなかった。更に *BACH2* 遺伝子導入 FL-18-EB で核内成分サンプルにおける p65 の発現が抑制された。以上より BACH2 が TAK1 を介する NFκB 経路を抑制することが示唆された。

#### BACH2 陰性 DLBCL では pTAK1 が発現し、p65、p50、p52 が核に局在する

免疫組織化学にて BACH2 陽性 36 例中 2 例 (5.6%) で p65 が核に陽性であったが、BACH2 陰性 14 例中 10 例 (71.4%) で p65 が核に陽性であり、BACH2 陰性例で p65 が有意に核に陽性を示した。また BACH2 陽性例で p-TAK1 陰性であったが、BACH2 陰性例では p-TAK1 陽性であった。加えて、BACH2 陰性例では p50、p52 が有意に核に陽性を示した。以上より、BACH2 陰性例における NFκB 経路活性化状態が示唆された。

#### 【考察】

我々は EBV 陽性 DLBCL における BACH2 の有意な発現低下を示したが、BACH2 発現低下と EBV の関係は今まで十分に検討されていない。我々の検討では EBV 陽性 DLBCL 患者検体、細胞株 FL-18-EB、いずれにおいても *BACH2* 遺伝子の欠損はなく、EBV インテグレーションやエピジェネティックな機序による発現抑制の可能性が考えられた。また BACH2 と同様に CNC 転写因子群に属する Nrf2 において、Keap1 によるユビキチン・プロテアソーム系の誘導と腫瘍化との関連が報告されており、BACH2 でも蛋白分解と腫瘍化との関連について検討が必要だ。

我々は EBV 陽性細胞において BACH2 発現低下がどのように NFκB 経路活性化に関与するか解明しようと試みた。EBV 感染細胞では EBV の産生する LMP1 が細胞膜上に発現し、LMP1 がリガンド非依存的に NFκB 経路を初めとする細胞増殖に関わるシグナル伝達経路を活性化するとされる。NFκB 経路での BACH2 の標的蛋白は不明だが、*BACH2* 遺伝子の導入により NFκB 経路の上流に位置する pTAK1 の発現低下と、p65 の核局在の抑制がみられ、BACH2 は NFκB 経路の TAK1 リン酸化より上流で抑制的に作用すると推測される。免疫組織化学では BACH2 陽性例は pTAK1 陰性、p65 が細胞質に陽性、BACH2 陰性例は pTAK1 陽性、p65 が核に陽性であり、この仮説を裏付けた。

以上より EBV 感染 B 細胞では、BACH2 発現低下が TAK1 活性化を介して NFκB 経路

活性化に寄与すると考えられる。最近では EBV 感染 B 細胞性細胞株において NFκB 経路サブユニットの 1 つである C-Rel が BACH2 発現を調節するとの報告があり、TAK1、BACH2、C-Rel の関連について更なる解析が必要だ。

**【結論】**

EBV 陽性 DLBCL で BACH2 の発現は高率に低下しており、EBV 陽性 B 細胞性リンパ腫細胞株、EBV 陽性 DLBCL 患者検体において BACH2 発現低下が NFκB 経路活性化に寄与している可能性がある。