

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05972

研究課題名(和文)代謝プロファイル解析によるリンパ腫新規治療戦略の展開

研究課題名(英文)New approach for canine lymphoma studies by a metabolic profile analysis

研究代表者

奥田 優 (OKUDA, MASARU)

山口大学・共同獣医学部・教授

研究者番号：10325243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：犬のリンパ腫は発生頻度の高い悪性腫瘍である。本研究では、犬のリンパ腫細胞における代謝産物を解析することで、新規治療の標的を同定することを目的として研究を行った。その結果、犬のリンパ腫細胞において2-HGが何らかの役割を果たしている可能性が明らかとなったものの、ヒトの腫瘍で認められるような遺伝子変異は認められなかった。しかしながら、犬のリンパ腫症例におけるバイオマーカーとして、2-HG濃度の測定が応用できる可能性が示唆された。今後は2-HG濃度増加のメカニズムやその機能を解析し、症例数を増やしたさらなる検討を行うことによって、2-HGをターゲットとした治療や診断への応用が進むことが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンパ腫は犬の造血器系悪性腫瘍の中で最も発生頻度の高い疾患であり、臨床的にも大きな問題となっている。この疾患への治療は化学療法が第一選択とされ、高い寛解率をもたらすものの、最終的には薬剤耐性の獲得によって治療抵抗性を生じ、死に至る。そのため、今後の治療成績の向上の為に新規の治療法の開発や新たなバイオマーカーが必要とされている。本研究では新たな研究アプローチとして犬リンパ腫細胞を用いた代謝プロファイル解析を行い、その特徴的な代謝産物の同定に成功した。この成果は将来的な診断、治療成績の向上に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Canine lymphoma is a frequently occurring malignant tumor. In this study, to identify the target of new treatments, analyzing metabolic analysis was employed using canine lymphoma cells. As a result, although 2-HG has played some role in canine lymphoma cells, no genetic mutation recognized in human tumors was identified. However, it was suggested that the measurement of 2-HG concentration could be applied as a biomarker in canine lymphoma cases. In the future, treatments and diagnosis targeting 2-HG will be advanced by analyzing the mechanism and the functions of the increased 2-HG concentration, and further examining the number of cases.

研究分野：獣医内科学

キーワード：リンパ腫 犬 代謝 メタボローム解析

1. 研究開始当初の背景

犬においてリンパ腫は発生頻度の高い悪性腫瘍の一つであるが、その治療成績は十分ではない。複数の抗癌剤を組み合わせた多剤併用療法を行った際、治療への反応が良好と言われる B 細胞性リンパ腫であっても、平均生存期間は約 1 年程度と、決して満足の行くものではない。さらに、T 細胞性リンパ腫においては治療への反応が乏しく、平均生存期間は 3 ヶ月程度である。犬のリンパ腫のほぼ全症例において抗癌剤への抵抗性を生じることが、この短い生存期間の原因となっている。その改善のための戦略として、抗癌剤の抵抗性回避と新規治療法の開発が挙げられる。抵抗性回避のための努力は続けられているものの、その実現は難航している。腫瘍細胞において、ミトコンドリアによる好氣的リン酸化よりもむしろ解糖系の亢進によってグルコースからの ATP 産生が増加する現象は、ワールブルグ効果として 1920 年代から研究されている。近年ではグルコース利用だけではなく、グルタミン、メチオニン、酢酸等の代謝も変化していることが報告されており、腫瘍細胞が特異な代謝環境にあることは疑いようがない。この腫瘍細胞におけるエネルギー代謝変化の主要な制御因子として、c-MYC、p53、ピルビン酸キナーゼ M2、低酸素誘導因子-1 (HIF-1)などが挙げられている。以前の我々の研究で、正常な酸素濃度で培養した犬のリンパ腫細胞株およびリンパ腫症例サンプルにおいて、HIF-1 が安定的に発現していることが明らかとなった。正常な細胞において、HIF-1 は十分な酸素濃度環境では常に分解されているため、恒常的に発現しているリンパ腫細胞では HIF-1 が何らかの役割を果たしていることが示唆された。実際に、犬リンパ腫細胞株に対して HIF-1 阻害剤である Echinomycin を添加すると、その増殖が著しく阻害される (Kambayashi S et al., 2015)。以上の結果から我々は犬リンパ腫細胞が独自の代謝経路を有しているという仮説に辿り着いた。本研究は、このような自身の研究成果を端緒として、生物学的探究心と将来的な臨床応用を目指して企画された (図 1)。

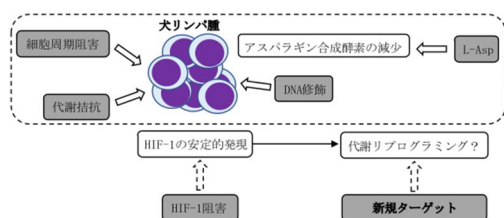


図 1. 本研究の着想

犬リンパ腫の既存の治療法 (点線内)と、本研究の着想を示す。HIF-1 の安定的な発現が代謝を変化させており、その阻害が治療ターゲットとなると仮説を立てた。

2. 研究の目的

ヒトや犬のリンパ腫細胞はアスパラギン合成酵素を有しないため、L-Asparaginase を用いたアスパラギン枯渇による治療が奏効するなど、独特の代謝経路を持つと予想される悪性腫瘍である。本研究では、犬のリンパ腫における代謝リプログラミングを解析することで、新規のバイオマーカーや既存の治療のブレイクスルーとなる経路を発見することを目的とした。

ヒトのリンパ腫においては 2001 年に抗体薬であるリツキシマブが認可されて以降、いくつかの分子標的薬が新規治療法として認められている。しかしながら犬のリンパ腫では、そのような新規治療法の開発は成功しておらず、古くからの抗がん剤治療に頼らざるを得ない現状である。本研究では犬のリンパ腫における代謝産物を測定することで、全く異なる角度からのアプローチを行い、新たな治療ターゲットを同定することに主眼を置く。タンパクや遺伝子レベルの解析では、ヒトとの種差が原因で研究の進行が遅れがちである。一方で、細胞の代謝産物は、多くの生物種で共通したものを測定することができるうえ、代謝経路も哺乳類において共通であるため、同様の手法で解析が可能である。さらに、犬の腫瘍における代謝経路の研究はほとんど行われておらず、本分野の開拓的研究となると期待された。

3. 研究の方法

(1) メタボローム解析

健康犬より分離した末梢血単核球 (PBMC) および犬リンパ腫細胞株 (T 細胞性リンパ腫由来細胞株 Ema および CLC, B 細胞性リンパ腫由来細胞株 CLBL-1 および 17-71) を、培養液中で 72 時間インキュベートした。その後、細胞を回収し、10 ml の 5% マンニトールによりペレットを再懸濁した。トリパンブルーと 1:1 で混和して細胞数を計数し、チューブ 1 本あたり 5×10^6 細胞となるように、それぞれ計 3 本のチューブに分注した。800 × g で 5 分間遠心し、上清を吸引して 800 μl のメタノールおよび 550 μl のメタボローム解析用 Internal Standard (Human Metabolome Technologies, 山形) を加え、混和したものを新しい 1.5 ml チューブに 1,000 μl 移し、2,300 × g で 5 分間、4 で遠心し、得られた上清をメタボローム解析用カラム (Human Metabolome Technologies) に 350 μl ずつ移した。これを 9,100 × g で 3 時間、4 で遠心し、沈渣を解析用のサンプルとして -80 に保存した。サンプルは Human Metabolome Technologies

に送付し,CE-QqQMSにより代謝物の網羅的な解析を行った。測定値を元に解析されたデータは,Excel形式のデータとしてHuman Metabolome Technologiesより提供された。

(2) 腫瘍細胞株,リンパ腫症例および健常犬血漿における2-HGの測定

比色分析法を基にしたD-2-Hydroxyglutarate Assay Kit(BioVision,Milpitas,CA)を用いて, 1.0×10^7 個の細胞または血漿 45 μ l を材料として,キットの使用法のとおり2-HGの測定を行った。測定にはMultiskan FC(Thermo Fischer Scientific,Waltham,MA)を用いて450 nmの吸光度を測定した。症例検体は,2018年12月5日から2020年10月5日までの間に山口大学動物医療センターを受診し,リンパ腫と診断された犬11頭を対象とし,一般的な血液検査のために静脈血液から遠心し分離した血漿を,包括同意に基づき-80℃で保存した物を使用した。

(3) DNAシーケンス解析

BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Thermo Fischer Scientific)を用いてラベル反応を実施した。Premix 1.0 μ l, 3.2 μ Mに希釈したプライマー1.0 μ l, 5 \times sequence buffer 3.5 μ l, プラスミドDNA 4.0 μ l, 滅菌蒸留水 10.5 μ lを混合した。反応は96℃ 1分間のプレヒーティング後,熱変性を96℃ 10秒,アニーリングを50℃ 5秒,伸長反応を60℃ 4分間,これを1サイクルとし計25サイクル行った。反応後,125 mM EDTA(pH 8.0) 2.0 μ l, 3M 酢酸ナトリウム 2.0 μ l, 100%エタノール 50 μ lを加えて室温で15分間インキュベートした。次に15,000 rpmで15分間遠心後,上清を除去し,さらに70%エタノール 250 μ lを加え15,000 rpmで5分間遠心した。上清を除去し,チューブの蓋を開けて室温で一晩乾燥させた。その後DNAを山口大学遺伝子実験施設へ送付し,3130 Genetic Analyzer(Thermo Fischer Scientific)による塩基配列の解析を委託した。

(4) 統計解析

2-HG濃度の比較についてはマン=ホイットニーのU検定を行い, $p < 0.05$ を有意差ありとした。統計解析はExcel統計(株式会社社会情報サービス,東京)を使用した。

4. 研究成果

(1) メタボローム解析

CLC, CLBL-1, Emaおよび17-71の4種類のリンパ腫細胞株を材料に,健常犬由来PBMCを対照としてメタボローム解析を実施した。測定対象として,解糖系,ペントースリン酸経路,クエン酸回路,尿素回路,ポリアミン・クレアチン代謝経路,プリン代謝経路,グルタチオン代謝経路,ニコチンアミド代謝経路,コリン代謝経路及び各種アミノ酸代謝経路にて主要な役割を占める116種(カチオン52種,アニオン64種)の代謝物質を選出し,解析を行った。これらの代謝物質の絶対定量値を算出し,それぞれの物質を代謝経路に描画した。その結果,階層的クラスタ解析(HCA)において,各リンパ腫細胞株ではPBMCとは異なる代謝物質の変動がある事が確認された。HCAによる2-HG関連代謝物質のクラスタリング解析で17-71での2-HG関連代謝物質の正の変動が顕著であり,続いてCLBL-1において増加が見られた。各代謝物質の差異に着目すると,最も2-HGレベルの高かった17-71を他の細胞株と比較した場合,2-HGの蓄積と共に,-KGの増加に伴うイソクエン酸の低下が見られた。また,二番目に2-HGレベルが高かったCLBL-1では,NADHレベルがNAD⁺を上回っていた。2-HGレベルが対照群とほぼ同じであったCLCにおいては,2-HG関連代謝物質についてPBMCの代謝変動と有意な差は見られなかった。本試験にて検出された代謝物質を用いて主成分分析を行った結果,2-HGと-KGに関連する代謝産物においては17-71, CLBL-1, EmaでPBMCと比較して相違が見られ,解糖系に関連する代謝産物においては全ての腫瘍細胞株とPBMCの間に代謝の変動が見られた。メタボローム解析における細胞内2-HG濃度の絶対定量値を元に群間比較を行った結果,CLBL-1と17-71(ともにB細胞型)でPBMCと比較して有意に高レベルであることが確認された。一方でT細胞型であるEmaにおいては有意差は認められたものの比較的低濃度であった。

(2) 細胞株の2-HG濃度測定

比色分析を基にしたD2HG Assay Kitを用いて測定した各リンパ腫細胞株の2-HG濃度は,CLBL-1, Ema, 17-71において上昇が見られ,メタボローム解析における2-HG測定値と類似した結果となった。

(3) IDH1/2 遺伝子変異の解析

上述の犬リンパ腫細胞株における2-HG濃度の増加がIDH1/2遺伝子変異によるものかを調べる為に,各犬リンパ腫細胞株より抽出したRNAを材料としてIDH1/2遺伝子の全長に対する塩基配列の解析を行った。その結果,CLC, CLBL-1, 17-71において,IDH1の81番目の塩基がアデニンからグアニンに変異する一塩基置換が見られた。しかし,この変異はアミノ酸の変異を生じていなかった。IDH2における遺伝子変異は確認されなかった。

(4) リンパ腫症例血漿における 2-HG 濃度

リンパ腫症例および健常犬より採取した血漿の 2-HG 濃度の測定において、症例群では中央値 13.7 mM (3.31-118), 健常犬群では中央値 3.12 mM (0-7.94) であり、症例群は健常犬群に比較して有意に血漿中 2-HG 濃度が増加していることが示された。

本研究では、一部の犬のリンパ腫細胞株において 2-HG が蓄積し、それが IDH1/2 の変異によるものではないことを示した。また、リンパ腫症例の血漿においても 2-HG が高濃度に存在する傾向が示された。今後、犬リンパ腫細胞株における完全な D2HGDH 遺伝子の塩基配列の解析、リンパ腫細胞株およびリンパ腫症例における D-2-HG と L-2-HG の解析を行い、IDH1/2 の変異や D2HGDH の変異や酵素活性、HIF 等の PHD により分解が促進されるタンパクとの関連性や、DNA およびヒストン蛋白のメチル化の亢進の有無を調査することで、犬のリンパ腫細胞におけるオンコメタボライトの作用を解明していくことが期待される。また、リンパ腫症例の解析数を増やし、血漿中 2-HG と予後との関連等を調査することで、バイオマーカーとしての有用性を検討していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 KOBAYASHI Kosuke, BABA Kenji, IGASE Masaya, MIYAMA Takako Shimokawa, KAMBAYASHI Satoshi, OKUDA Masaru	4. 巻 82
2. 論文標題 Microparticle-associated tissue factor activity in dogs with disseminated intravascular coagulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 56～60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.19-0553	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 KOBAYASHI Kosuke, BABA Kenji, IGASE Masaya, PRIMARIZKY Hardany, NEMOTO Yuki, SHIMOKAWA MIYAMA Takako, KAMBAYASHI Satoshi, MIZUNO Takuya, OKUDA Masaru	4. 巻 81
2. 論文標題 Tissue factor procoagulant activity in the tumor cell lines and plasma of dogs with various malignant tumors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1713～1721
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.19-0400	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林宏祐, 馬場健司, 上林聡之, 奥田 優
2. 発表標題 イヌリンバ腫細胞におけるSimvastatinによるオートファジーの誘導と細胞傷害性に関する検討
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	上林 聡之 (KAMBAYASHI SATOSHI) (50796414)	山口大学・共同獣医学部・助教 (15501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
インドネシア	アイルランガ大学			