

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07442

研究課題名(和文) EBウイルス感染細胞でのCD30による遺伝子異常の腫瘍化への関与とマーカーの解明

研究課題名(英文) Genomic abnormalities by CD30 and their roles in the tumorigenic process of Epstein-Barr virus-infected cells

研究代表者

渡邊 真理子 (WATANABE, Mariko)

北里大学・医療衛生学部・助教

研究者番号：90270701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)： Epstein-Barr virus (EBV) 感染と悪性リンパ腫発症には密接な関連があることが知られている。CD30 刺激によるゲノム異常の誘発およびそれに関連した変化はリンパ芽球様細胞株(LCL)では明らかではなかったが、病態が進展した状態と考えられる古典的ホジキンリンパ腫(classical Hodgkin lymphoma、cHL)細胞株では認められた。さらにこのゲノム異常はCD30 刺激により誘導される活性酸素種(ROS)によることが示唆された。これらの結果は、LCL と cHL では ROS に対する反応性が異なることを示唆しており、そのメカニズムの解明が今後の課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Epstein-Barr virus (EBV) 感染が悪性リンパ腫の発症原因であることはよく知られている。本研究の結果はEBV感染初期の細胞にさらに付加的な異常が加わった状態ではCD30 刺激がゲノム異常の誘発を起こす可能性があることを示唆している。EBV感染細胞は病態が進むとリンパ増殖性疾患(LPD)から悪性リンパ腫へと進展する。さらなる検討は必要であるが、進行性のLPDは悪性リンパ腫発症予防の見地からもアウリスタチン E 付加抗CD30 抗体(プレントキシマブベドチン)による CD30 を分子標的とした治療の対象となりうると思われる。

研究成果の概要(英文)： Epstein-Barr virus (EBV) infection is closely related to the occurrence of malignant lymphomas. CD30 stimulation did not induce apparent changes related to genomic abnormalities in lymphoblastoid cell lines (LCLs). On the other hand, classical Hodgkin lymphoma (cHL) cell lines, which represent transformed statuses of LCLs revealed genomic abnormalities by CD30 stimulation. CD30 mediated generation of reactive oxygen species (ROS) was thought to play causative roles in the generation of genomic abnormalities. The results suggest that LCL and cHL cells appear to show different responses to ROS. The results in this study suggest that additional changes in cellular statuses are required to trigger CD30 mediated induction of genomic abnormalities in early stage of EBV-infected cells.

研究分野：血液病理学

キーワード： Epstein Barr virus (EBV) リンパ芽球様細胞株(LCL) CD30

1. 研究開始当初の背景

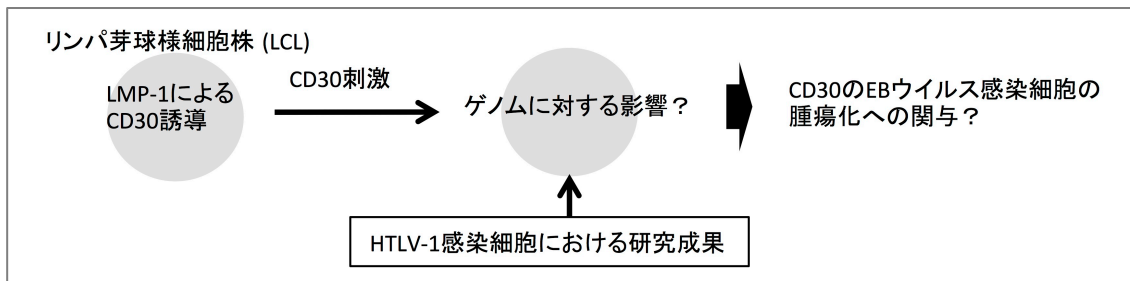
Epstein-Barr virus (EBV) は初感染後に少数のウイルスが B 細胞に潜伏感染し、排除されずに生体内で維持される。免疫抑制剤の投与やヒト免疫不全ウイルスの感染、加齢などにより免疫機能が抑制されると感染細胞は増殖し、リンパ増殖性疾患を経て一部は悪性リンパ腫を発症する。しかしながら悪性リンパ腫発症のメカニズムは明らかではない。

申請者は、EBV 由来の latent membrane protein-1 (LMP-1) と classical Hodgkin lymphoma (cHL) に強発現して増殖を誘導すると考えられている腫瘍壊死因子 (TNF) レセプターファミリーの CD30 の関係に注目し研究を進めてきた。その後の検討で、ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) 感染細胞の一部が CD30 を発現していて、CD30 が感染細胞の増殖のみならず細胞の分裂異常やゲノム異常を誘発することを示した (Clin Cancer Res. 2018 Nov 1;24(21):5445-5457)。この結果は、EB ウイルス感染細胞における CD30 の未知の役割、すなわち腫瘍化への関与を示唆する。

2. 研究の目的

本研究ではリンパ芽球様細胞株 (LCL) に発現している CD30 をリガンド CD30L で刺激 (以下 CD30 刺激) して、その影響を形態、分子およびゲノムのレベルで解析し、病態進展の遺伝子マーカーの特定および腫瘍化メカニズムの解明を行い、悪性リンパ腫の発症予防と治療に寄与することを目的とする。

背景および目的のまとめ



3. 研究方法

(1) リンパ芽球様細胞株 (LCL) の樹立

EB ウイルス感染により正常末梢血リンパ球を不死化させ LCL を得る。Cellular Technology Limited (C. T. L.) 社より購入した正常末梢血単核球を用いて、DynaL B cell Negative Isolation Kit (DYNAL) により B 細胞を単離する。EB ウイルス産生細胞株 B95.8 の培養上清を用いて B 細胞に EB ウイルスを感染させ、シクロスポリンによる免疫抑制下で LCL を樹立する。樹立した LCL での CD30 の発現をフローサイトメトリーで確認し、CD30 高発現細胞をソーティングにより分離、回収して実験に用いる。

(2) CD30 をリガンド CD30L で刺激 (以下 CD30 刺激) して比較染色体解析 (CGH) 及び RNA シークエンス解析に必要な検体を得る。

CD30 刺激の系は、すでに我々が独自で確立している (Clin Cancer Res. 2018 Nov 1;24(21):5445-5457)。この系を用いて、樹立した LCL を各々 CD30 刺激の有無で 2 群 (各

群 N=3, triplicate) に分けて 1 ヶ月間培養し細胞を回収して以下の実験を進める。

① 形態学的変化

スライドグラスにサイトスピン後 Giemsa 染色を行い CD30 刺激による形態の変化を検討する。

② ゲノム異常の誘発

(i) DNA を抽出してアレイ CGH 法により CD30 刺激による染色体の過剰、欠失、増幅などのコピー数異常を網羅的に検出する。

(ii) DNA の 2 本鎖断裂 (DSB) を検出する抗体 γ -H2AX を用いて蛍光免疫染色を行う。この実験のみ CD30 刺激期間は 2 週間とした。

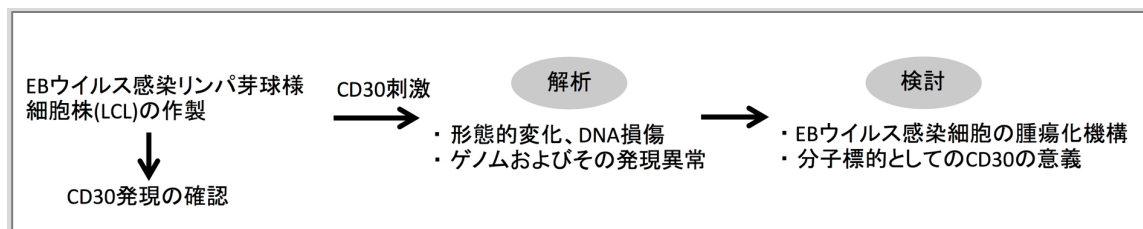
③ 遺伝子発現の変化

RNA を抽出し、RNA シークエンスにより CD30 刺激による遺伝子発現を調べ、形態学的変化やゲノム異常をもたらすメカニズムの解析を行う。

(3) CD30 刺激による形態学的変化、ゲノム異常および遺伝子発現の変化と腫瘍化との関係について、関係する遺伝子やもたらされるシグナル伝達異常の視点から解析を進める。

(4) 得られた結果をもとに EB ウイルス感染細胞に発現している CD30 を標的とした治療の意義について考察を行う。

研究方法の概略



4. 研究成果

(1) LCL の樹立と CD30 の発現の確認

正常末梢血単核球 (N=3) から分離した B 細胞に EB ウイルスを感染、シクロスポリンによる免疫抑制下で培養することで 2 種類の LCL を樹立することができた。CD30 の発現を確認の上、高発現の細胞をソーティングにより分離して回収した。

(2) LCL をリガンド CD30L で継続的に刺激、以下の各項目についての検討

① 形態的な変化

樹立した 2 種類の LCL を CD30 刺激の有無で 2 群に分けて 1 ヶ月間培養し、Giemsa 染色を行い形態の変化を観察した。形態的には大きさに明らかな変化は認めず、多核の細胞の増加も認めなかった。

② ゲノム異常の誘発

(i) CGH 法

CD30 刺激の有無で増加と変化なしという結果となった。このことは LCL では他の遺伝子異常を誘導する分子、例えば LMP-1 の発現を認めるため CD30L による刺激が見えにくくなっ

ている、あるいは明らかゲノム異常は誘導していない可能性を示唆した。CD30 刺激により 2 種類の LCL で共通に増加 (gain) を認めたゲノムとして ZCCHC11 (zinc finger CCHC domain-containing 11) と EFNB2 (ephrin-B2) が抽出された。

(ii) DSB の検出

CD30 刺激の有無で γ -H2AX 抗体を用いた蛍光免疫染色で差は認めなかった。

③ 遺伝子発現の変化

2 種類の LCL で有意な変化を示した遺伝子の中で共通のものは 157 遺伝子あった。CGH 法で抽出された ZCCHC11 と EFNB2 はこの中には含まれていなかった。Gene Ontology (GO) 解析では *P* 値の低いものでは GO term がないもの 1 つを除き integral component of plasma membrane、ameboidal cell migration、external side of plasma membrane、chemokine mediated signaling pathway、response to hypoxia が抽出された。

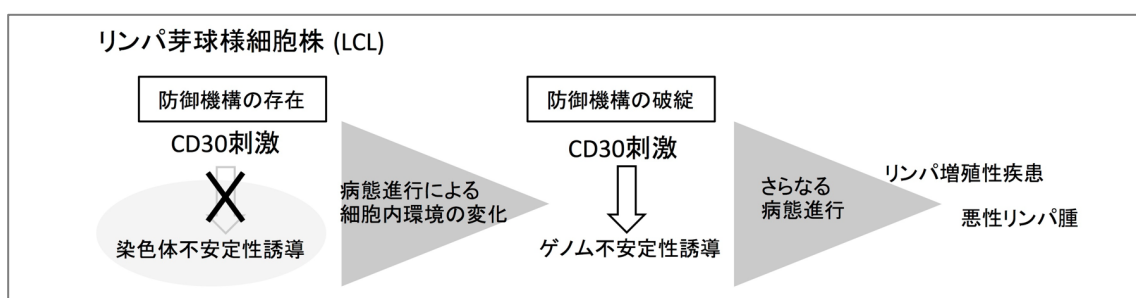
(3) EB ウイルス感染細胞における CD30 の役割

本研究と並行して、CD30 刺激が cHL 細胞にどのような影響を与えるかについても細胞株を用いて同様に実験を行った。その結果、多核細胞の増加、DSB、ゲノム異常の誘導を認めた。また、これらは CD30 により誘導される活性酸素種 (ROS) によることも示唆された。これらの結果は LCL と cHL では ROS に対する反応性が異なることを示唆しており、そのメカニズムの解明が今後の課題となる。

(4) EB ウイルス感染細胞に発現している CD30 を標的とした治療の意義

CD30 刺激の LCL に対する影響は明らかではなかったが、EB ウイルス感染が悪性リンパ腫の発症原因であることはよく知られている。LCL に付加的な異常が加わると CD30 刺激が腫瘍化に重要な役割を果たす可能性があり、リンパ増殖性疾患で進行性のものはアウリスタチン E 付加抗 CD30 抗体 (ブレンツキシマブベドチン) による CD30 を標的とした治療の対象となると考えられる。

以下の図にまとめを示す。



LCL での CD30 刺激に対しては、DNA 損傷及びそれに引き続き生じるゲノム不安定性を抑制する何らかの機構が存在していると考えられる。病態が進行すると細胞内環境の変化とともにこの抑制機構が機能なくなると想定された。今後この抑制機構についての解明が重要と考えられた。EBV 感染細胞そのものが即 CD30 を標的とした治療の対象となるとは考えにくい、病態の進行が疑われるリンパ腫との境界病変については治療の対象となる可能性があると考えられた。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakashima M, Watanabe M, Nakano K, Uchimaru K, Horie R.	4. 巻 112(6)
2. 論文標題 Differentiation of Hodgkin lymphoma cells by reactive oxygen species and regulation by heme oxygenase-1 through HIF-1 .	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 2542-2555
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14890	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 Watanabe M, Sugawara A, Noguchi Y, Hirose T, Omura S, Sunazuka T, Horie R	4. 巻 178
2. 論文標題 Jietacins, azoxy natural products, as novel NF- B inhibitors: Discovery, synthesis, biological activity, and mode of action	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur J Med Chem.	6. 最初と最後の頁 636-647
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejmech.2019.05.079.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀江 良一、中島 誠、渡邊 真理子、中野 和民、内丸 薫.
2. 発表標題 ホジキンリンパ腫細胞の活性酸素による分化とHIF-1 を介したヘムオキシダーゼ1による分化制御
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中島 誠、渡邊 真理子、中野 和民、内丸 薫、堀江 良一
2. 発表標題 ホジキンリンパ腫細胞のROSによる分化とHIF-1 を介したヘムオキシダーゼ1による分化制御
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中島 誠、渡邊 真理子、中野 和民、内丸 薫、堀江 良一
2. 発表標題 活性酸素種によるホジキンリンパ腫細胞の分化とHIF-1 を介したHeme Oxygenase 1による分化制御機構
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
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	堀江 良一 (HORIE RYOUICHI) (80229228)	北里大学・医療衛生学部・教授 (32607)	

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
---------	---------