

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07379

研究課題名(和文) CD30によるゲノム不安定性の誘導と腫瘍化機構のHTLV-1感染細胞における解析

研究課題名(英文) Genomic instability and tumorigenesis by CD30 in HTLV-1-infected cells

研究代表者

堀江 良一 (Horie, Ryouichi)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号：80229228

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)：CD30刺激はHTLV-1感染細胞にDNA損傷を誘導、その結果クロマチンブリッジが形成されて細胞分裂異常が起こり、その繰り返しによりゲノム異常が蓄積していくと考えられた。さらにCD30刺激によるDNA損傷はホスファチジルイノシトール3-キナーゼ(P13K)活性化を介した活性酸素(ROS)の誘導が原因であることが示唆された。CD30刺激はPD-L1(CD274)の発現上昇を誘導してHTLV-1感染細胞の細胞性免疫による排除を阻害しうると考えられた。TaxはCD30の誘導には関与していないと考えられ、それぞれゲノム異常の誘発と病態の進展に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりCD30はゲノム異常の蓄積、遺伝子発現の変化、PD-L1の誘導によりHTLV-1感染細胞のクローン進化や免疫回避に関与してHTLV-1感染者の病態の進展に関与しうることが示唆された。CD30を分子標的とした新規治療法がATLの発症予防と治療に重要な役割を果たしうること、PD-L1誘導に関与しているNF- κ Bの阻害薬開発の重要性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：CD30 stimulation in HTLV-1-infected cells induced DNA damages, which triggered chromatin bridges and cytokinesis failure, resulting in the accumulation of genomic abnormalities. DNA damages by CD30 stimulation were caused by generation of reactive oxygen species (ROS) through activation of phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K). CD30 stimulation also induced PD-L1(CD274), which might attenuate exclusion of the HTLV-1-infected cells by immune cells from the body. Tax did not induce CD30 and these 2 molecules appeared to independently involve induction of genomic instability and progression of disease statuses.

研究分野：人体病理学

キーワード：CD30 HTLV-1 ATL genomic instability ROS PI3K PD-L1 Tax

1. 研究開始当初の背景

CD30 は主にリンパ系腫瘍に発現し増殖を誘導すると考えられているが機能には不明な点も多い。近年、微小管阻害薬を付加した抗 CD30 抗体が臨床応用され注目されている分子である。

成人 T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) の持続感染は、成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (ATL) を引き起こし、既存の治療では未だに多くが予後不良であるため対策が急務である。

申請者らはこれまで増殖シグナルを主として伝達すると考えられてきた CD30 が、ウイルス感染など特殊な細胞内環境では細胞分裂異常やゲノム異常を誘発しうることを報告した (Clin Cancer Res. 2018 Nov 1;24(21):5445-5457)。しかしながら HTLV-1 感染細胞での CD30 によるゲノム異常の誘発メカニズムと感染細胞への影響は明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では HTLV-1 感染細胞における CD30 によるゲノム異常誘発のメカニズムと感染細胞への影響を細胞、分子、ゲノムレベルで解析する。この過程で HTLV-1 感染者の病態進展のメカニズムの解明が期待される。さらに ATL のみならず、古典的ホジキンリンパ腫 (cHL) など CD30 を発現している他のリンパ系腫瘍の発症メカニズムの理解への貢献が期待できる。HTLV-1 感染細胞における CD30 によるゲノム異常誘発やその腫瘍化への関与の解明により、ATL の発症予防と治療にわたる新たな診療体制の構築に寄与することを目的とする。

3. 研究方法

HTLV-1 感染細胞株 ATN-1 と TL-0m1 での CD30 発現をフローサイトメトリーで確認後、これらの細胞を CD30 に対するリガンド (CD30L) あるいは空ベクターを導入した CHO 細胞と共培養、ATN-1 と TL-0m1 細胞を回収して解析に用いる。以下 HTLV-1 感染細胞を CD30L 導入 CHO 細胞と共培養して CD30 シグナルを入れることを CD30 刺激と記載する。

(1) 細胞分裂異常

サイトスピン後、回収した細胞をギムザ染色して CD30 刺激による形態の変化を検討する。さらにゲノムの状態を検討するために DNA と結合する色素 DAPI で回収した細胞を染色する。

(2) ゲノム異常

DNA 二重鎖断裂 (DSBs) の検出には γ -H2AX 抗体を用いた免疫染色を行う。ATN-1 を用いて DNA を抽出、アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション (CGH) 解析を行い、CD30 刺激によるゲノム異常を遺伝子レベルで検討する。回収した細胞の結果を CHO 細胞と共培養する前の細胞の結果と比較してゲノム遺伝子の増加 (gain)、減少 (loss) について解析する。さらにゲノム異常を誘発する CD30 シグナルについても検討を行う。

(3) 遺伝子発現の変化

RNA を抽出、RNA シークエンスを用いて遺伝子発現を解析して CD30 刺激により誘発される遺伝子発現の変化を明らかにする。ゲノム異常と遺伝子発現の変化、シグナル異常との関係についてコンピュータ解析を行い、CD30 刺激の HTLV-1 感染細胞腫瘍化への関与を明らかにする。

(4) HTLV-1 Tax と CD30 の関係の検討

Tax は HTLV-1 感染細胞のポリクローナルな増加、腫瘍化に重要な役割を果たしており、ゲノム異常を誘導する報告がある。Tax が CD30 の発現を誘導できるのかについて検討を行い、Tax と CD30 の関係について検討する。

4. 研究成果

(1) 細胞分裂異常

CD30 刺激により ATN-1、TL-0m1 で多核化した細胞の増加を認めた。CD30 刺激はこれらの細胞の増殖を抑制し、刺激を中止すると増殖の抑制が解除された。多核化した細胞を観察すると核の間をつなぐブリッジの構造を認めた。この構造は DNA と結合する色素 DAPI によって染色されることからクロマチンブリッジであることが示唆された。以前の検討で CD30 刺激は HTLV-1 感染細胞の細胞分裂を阻害することを示したが、クロマチンブリッジの形成が原因であると考えられた。さらに CD30 刺激による ATN-1、TL-0m1 の増殖抑制にはクロマチンブリッジの形成が関与していると考えられた。

(2) ゲノム異常

クロマチンブリッジは DSBs などの DNA 損傷に伴い認めることが報告されている。CD30 刺激は ATN-1、TL-0m1 に γ -H2AX の発現を誘導した。CGH による解析では、CD30 刺激は ATN-1 細胞にゲノム不均衡を誘導した。それらの多くは gain であった。CD30 刺激はゲノムの特定領域に異常を誘発するというよりは全体の領域にランダムに異常を生じる可能性が考えられた。ATN-1 の triplicate のサンプルで共通に抽出されたゲノム不均衡は DQX1 (DEA box RNA-dependent ATPase, CCNA2 (cyclin A2)、EFNB2 (ephrin-B2)、PCDH9 (protocadherin-9)) でいずれも gain であった。これらの結果から CD30 刺激は HTLV-1 感染細胞に DNA 損傷を誘導、その結果クロマチンブリッジが形成されて細胞分裂異常が起こり、その繰り返しによりゲノム異常が蓄積していくと考えられた。さらに CD30 刺激による DNA 損傷はホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) 活性化を介した活性酸素 (ROS) の誘導が原因であることが示唆された。

(3) 遺伝子発現の変化

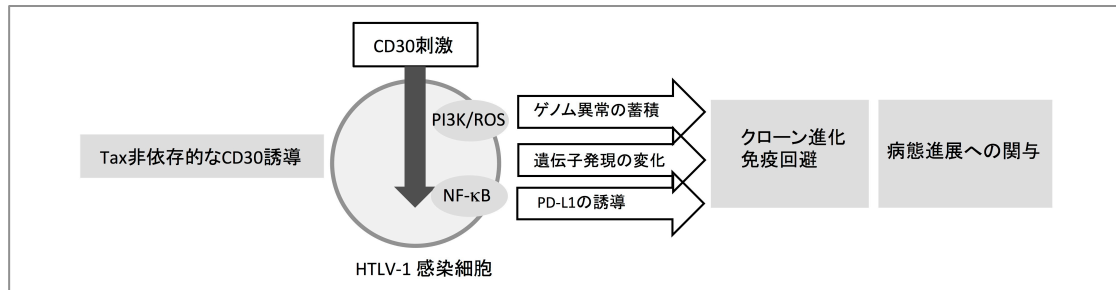
RNA シークエンスの結果、ATN-1 で 2822 個、TL-0m1 で 682 個の遺伝子が有意に変化していた。これらの遺伝子のうち、ATN-1 と TL-0m1 で共通なものは 201 個あった。これらの中に CGH による解析で抽出された 4 つの遺伝子 DQX1、CCNA2、EFNB2、PCDH9 は含まれていなかった。この理由としては遺伝子発現に際しての修飾、すなわちエピジェネティクスの変化などが関与している可能性が想定された。gene ontology (GO) 解析では molecular function で calcium ion binding、cellular process では plasma membrane、biological process では inflammatory response が第 1 位として抽出されたが、ゲノム異常に関連したものは抽出されなかった。一方 201 個の共通に変化している遺伝子の中に PD-L1 (CD274) の発現上昇を認めた。PD-L1 は免疫チェックポイントを司る分子として知られており、PD-L1 を発現した HTLV-1 感染細胞は細胞性免疫による排除から逃れると考えられる。CD30 は PD-L1 ゲノム遺伝子のプロモーターを NF- κ B 依存性に誘導し、CD30 刺激後の ATN-1、TL-0m1 における PD-L1 発現の上昇は抗 PD-L1 抗体による免疫染色でも確認された。これまで HTLV-1 感染細胞での PD-L1 の発現上昇の原因は PD-L1 ゲノム遺伝子の 3' 領域の欠失によるとする報告があるが、本研究の結果は HTLV-1 感染細胞における PD-L1 の発現上昇の新たなメカニズムの存在を示唆するものである。

(4) HTLV-1 Tax と CD30 の関係の検討

Tax は CD30 プロモーターの活性化を誘導せず、Tax を強制発現させた Jurkat 細胞での CD30 の発現を増強しなかった。Tax は HTLV-1 感染細胞の病態が進行すると宿主免疫反応による排

除により発現細胞が抑制されることが報告されている。一方 CD30 は HTLV-1 感染細胞の病態が進行すると発現細胞が増えることが報告されている。すなわち Tax と CD30 は病態の異なる時期に HTLV-1 感染細胞のゲノム異常の誘発と病態の進展に関与する可能性が示唆された。

以上の結果を下図にまとめた。



CD30 は Tax とは独立して HTLV-1 感染細胞に誘導される。CD30 刺激は PI3K の活性化を介した ROS の産生により HTLV-1 感染細胞に DNA 損傷を誘発、その結果クロマチンブリッジが形成されて細胞分裂異常が起こり、それらの繰り返しによりゲノム異常が蓄積していくと考えられる。CD30 刺激は多くの遺伝子の発現を誘導するが、NF-κB 活性化を介して PD-L1 の発現上昇を誘導させて HTLV-1 感染細胞の免疫による排除を阻害しようと考えられた。CD30 はゲノム異常の蓄積、遺伝子発現の変化、PD-L1 の誘導により HTLV-1 感染細胞のクローン進化や免疫回避に関与、HTLV-1 感染者の病態の進展に関与していると考えられた。したがって CD30 を発現した HTLV-1 感染細胞は微小管阻害薬を付加した抗 CD30 抗体による CD30 を標的とした分子標的療法の対象となると考えられた。さらに PD-L1 の誘導阻止には NF-κB 阻害薬の開発が重要と考えられた。

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 2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 Wada N, Uojima H, Satoh T, Okina S, Iwasaki S, Shao X, Takiguchi H, Arase Y, Itokawa N, Atsukawa M, Miyazaki K, Hidaka H, Kako M, Kagawa T, Iwakiri K, Horie R, Suzuki T, Koizumi W.	4. 巻 39(3)
2. 論文標題 Impact of Anti-GPIIb/IIIa antibody-producing B cells as a predictor of the response to lusutrombopag in thrombocytopenic patients with liver disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dig Dis.	6. 最初と最後の頁 234-242
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000510692	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中島誠、宇都宮與、渡邊俊樹、堀江良一、内丸薫
2. 発表標題 CD30シグナルが誘導する染色体不安定性の促進機構
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

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、宇都宮與、渡邊俊樹、堀江 良一、内丸 薫
2. 発表標題 成人T細胞白血病リンパ腫においてCD30シグナルは染色体不安定性を高める
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
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

〔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	渡邊 真理子 (Watanabe Mariko) (90270701)	北里大学・医療衛生学部・助教 (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
---------	---------