

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：14202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20769

研究課題名（和文）3D培養にて検証したEBウイルス陽性リンパ腫細胞に対するアルギニンの抗腫瘍効果

研究課題名（英文）Anti-tumor effects of arginine in three-dimensional cultured EBV-positive lymphoma cells

研究代表者

能島 舞（Noujima, Mai）

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：20961783

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：EBV非関連リンパ腫細胞株であるFL18をアルギニン添加培地および非添加培地で二次元培養したところ、アルギニン濃度依存的に細胞増殖能が低下する傾向がみられた。この結果から、EBV陰性リンパ腫では、アルギニンが「腫瘍抑制効果」を示すと推測される。さらに、FL18の三次元培養に成功し、最適な培養条件を得ることができた。FL18細胞株を アルギニン非添加培地での二次元培養、アルギニン添加培地での二次元培養、アルギニン非添加培地での三次元培養、アルギニン添加培地での三次元培養の4群に分けメタボローム解析を行ったところ、アルギニン添加により特定の代謝系に変化がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンパ腫細胞株におけるアルギニン投与効果の検証は、リンパ腫の腫瘍微小環境の理解の一助となる。また、リンパ腫だけでなくその他悪性腫瘍においても、代謝変化に基づく新規治療法の発見に貢献しうると思われる。

研究成果の概要（英文）：Two-dimensional culture of FL18 (EBV-negative lymphoma cell line) in arginine- and non-arginine-supplemented medium showed a trend toward a decrease in cell proliferative capacity in arginine concentration-dependent manner. This result suggests that arginine has a "tumor suppressive effect" in EBV-negative lymphomas. We succeeded in three-dimensional culture of FL18 and obtained optimal culture conditions. We divided the FL18 into four groups: (1) two-dimensional culture in arginine-free medium, (2) two-dimensional culture in arginine-added medium, (3) three-dimensional culture in arginine-free medium, and (4) three-dimensional culture in arginine-added medium. The metabolomic analysis showed that the addition of arginine altered specific metabolic systems.

研究分野：病理学

キーワード：アルギニン EBウイルス 三次元培養 リンパ腫

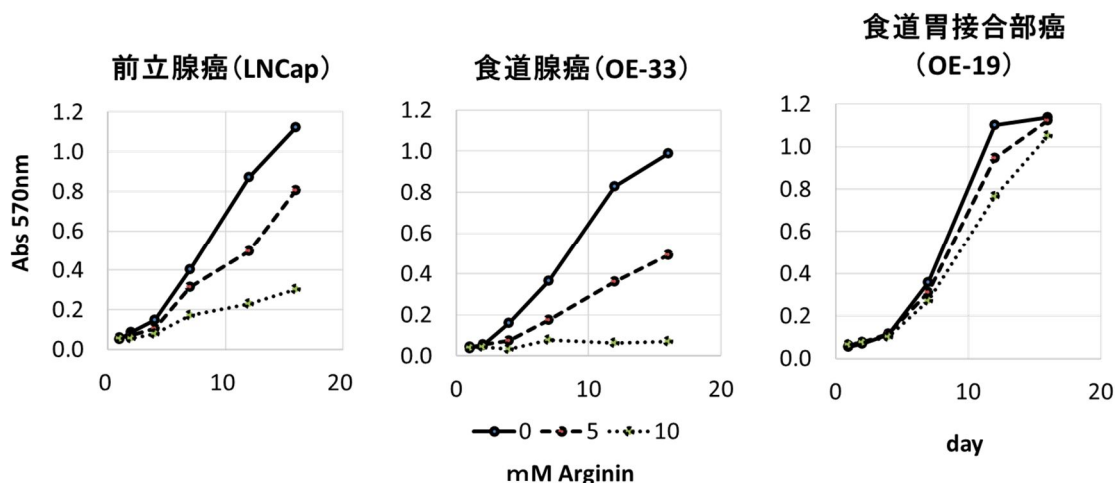
## 1. 研究開始当初の背景

アルギニンは体内で合成できるが特殊な条件下で枯渇しうる準必須アミノ酸であり、細胞増殖に必須である。アルギニンが腫瘍細胞に取り込まれると「腫瘍促進効果」を示し、抗腫瘍の役割を担うT細胞に取り込まれると「腫瘍抑制効果」を示すとされる。この相反するアルギニンの作用は「腫瘍の種類」「腫瘍細胞におけるアルギニン合成遺伝子の発現の有無」「腫瘍微小環境の状態」「個体の免疫細胞と腫瘍細胞との関係性」によって異なると考えられており (Albaugh VL et al. J Surg Oncol 2017;115:273-280), 腫瘍微小環境におけるアルギニン代謝状態の解明と新規治療への応用が広く研究されている。

我々は、これまで、当施設で確立した Cellbed という担体を用いる三次元培養の手法により、癌腫の組織型によってアルギニンの効果に違いがあることを明らかにしてきた。Cellbed は超微細シリカファイバーでできた線維集合体で、その構造は生体の疎性結合組織に類似している。腫瘍の増殖にはがん細胞同士のインターアクションが重要であり、我々は、平面で接着する二次元培養と立体で接着する三次元培養では大きくがん代謝が異なることをメタボローム解析を用いて明らかにしている (Murakami S. Cancer Sci. 2021;112:918-931)。

以上の三次元培養の手法を用いた我々のこれまでの検討では、前立腺癌由来細胞株 (LNCap)、食道腺癌由来細胞株 (OE33) ではアルギニン濃度依存的に細胞増殖が抑制されるが、食道胃接合部癌由来細胞株 (OE19) では有意な抑制効果がみられなかった (図1)。これは、癌腫の組織型によってアルギニンの代謝状態が異なることを支持する結果であった。一方で、リンパ腫を含む浮遊系細胞に対するアルギニンの効果は未検討であり、他施設からの報告も乏しい。特に、EBV ウイルス (EBV) 関連リンパ腫の一部では腫瘍細胞の免疫逃避機構が腫瘍の進展に寄与していることが解明されてきている。また、EBV 陽性リンパ腫細胞株においてはアルギニン投与により EBV の再活性化が抑制されるという報告がある (Agawa H et al. Virology 2002;304,114-124)。以上より、EBV 関連リンパ腫と EBV 非関連リンパ腫でアルギニン代謝状態に違いがあると仮説を立て、本研究の着想に至った。

図1



## 2. 研究の目的

本研究の目的は、リンパ腫細胞のアルギニン代謝状態を解明し治療への応用可能性に言及することである。なかでも、EBV 陰性リンパ腫と EBV 陽性リンパ腫のアルギニン代謝状態に違いがあるか検討することである。

## 3. 研究の方法

(1) アルギニン投与がリンパ腫細胞株の増殖に与える影響を調べる。具体的には、FL18 (EBV 非関連リンパ腫細胞株)、FL18EB (EBV 関連リンパ腫細胞株)、Akata (EBV 関連リンパ腫細胞株) を、アルギニン添加培地 (5mM, 10mM) および非添加培地で培養し、MTT アッセイで経時的に細胞増殖能を比較する。なお、細胞培養は二次元培養に加えて、当施設で確立した Cellbed という培養担体を用いる三次元培養法に基づいて行う。

(2) リンパ腫細胞株のアルギニン代謝状態を解析する。具体的には、メタボローム解析 (HMT に委託) を行い、EBV 関連および EBV 非関連リンパ腫細胞株のアルギニン投与による代謝の変化を検証する。さらに、アルギニン分解酵素 arginase (ARG)、アルギニン合成に必須の酵素

argininosuccinate synthase (ASS), 細胞外からアルギニンを取り込む輸送体 cationic amino acid transporter 1 (CAT1) の発現の有無や程度を, 半定量 PCR, ウェスタンブロッティングで検証する.

(3) 上記(1)(2)により細胞株で得られた結果が, 生体内でも反映されているか検証する. 具体的には, EBV 非関連リンパ腫, EBV 関連リンパ腫の初発時リンパ節生検検体のホルマリン固定パラフィン包埋検体を用いて, ARG, ASS, CAT1 の発現の有無や程度を, 免疫染色(酵素抗体法)で検証する.

#### 4. 研究成果

EBV 非関連リンパ腫細胞株である FL18 をアルギニン添加培地および非添加培地で二次元培養したところ, アルギニン濃度依存的に細胞増殖能が低下する傾向がみられた(図2). この結果から, EBV 陰性リンパ腫では, アルギニンが「腫瘍抑制効果」を示すと推測される.

さらに, FL18 の三次元培養に成功し, 最適な培養条件を得ることができた(図3). FL18 細胞株を アルギニン非添加培地での二次元培養, アルギニン添加培地での二次元培養, アルギニン非添加培地での三次元培養, アルギニン添加培地での三次元培養の 4 群に分けメタボローム解析を行ったところ, アルギニン添加により特定の代謝系に変化がみられた. 今後は変化のみられた代謝系について, その関連蛋白の発現の程度や局在を免疫染色(酵素抗体法)等で検討する予定である.

EBV 関連リンパ腫細胞株である FL18EB は浮遊状態で安定した培養が得られているものの, 未だ三次元培養の最適な条件が得られていない. 今後は数種の EBV 関連リンパ腫細胞株を用いて三次元培養の確立を目指すとともに, EBV 関連および EBV 非関連リンパ腫細胞株におけるアルギニン添加への反応性の違いを検討し, EBV の存在がアルギニン代謝に及ぼす影響についても考察する予定である.

以上より, 本研究において「EBV 非関連リンパ腫細胞株ではアルギニンが腫瘍抑制効果を示すこと」「EBV 非関連リンパ腫細胞株は Cellbed を用いた三次元培養が可能であること」「EBV 非関連リンパ腫はアルギニン添加により特定の代謝系に変化がみられること」が分かり, これらが現時点での本研究の成果である. 腫瘍微小環境や腫瘍免疫に注目が集まるなか, リンパ腫細胞株におけるアルギニン投与の効果は今後も重要な検討課題であり, また, リンパ腫だけでなくその他悪性腫瘍においても代謝改変に基づく新規治療法の発見に貢献しうると考えられる. 今後も本研究を継続する予定である.

図2 EBV 非関連リンパ腫細胞株(二次元培養), 細胞増殖能

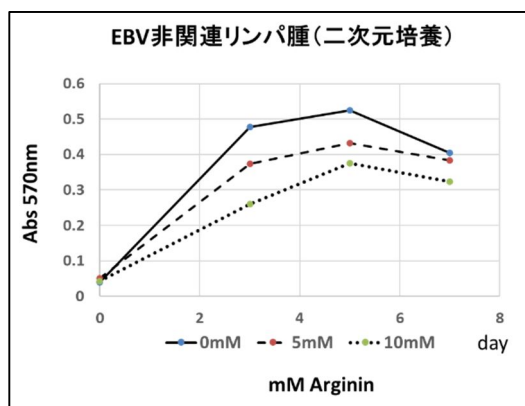
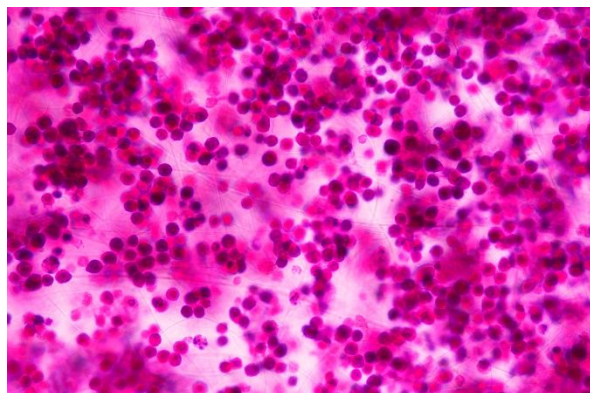


図3 EBV 非関連リンパ腫細胞株(三次元培養), HE 染色(400 倍)



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|