

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：12605

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23880009

研究課題名（和文） リンパ腫のグルココルチコイド耐性を解除する分子メカニズムの解明

研究課題名（英文） Investigation into the molecular mechanism of the resolution of glucocorticoid resistance in lymphoma.

研究代表者

松田 彬 (MATSUDA AKIRA)

東京農工大学・農学部・助教

研究者番号：90613969

研究成果の概要（和文）：

本研究では、リンパ腫由来細胞株を使用し、グルココルチコイド受容体の発現を調節する因子について分子レベルで解析することにより、グルココルチコイド耐性が引き起こされる新しいメカニズムを提唱することができた。また、転写因子 NF- $\kappa$ B を機能抑制することで腫瘍のグルココルチコイド感受性が回復することを細胞レベルおよび個体レベルで確認することができ、これは新規治療法の確立に重要な情報を与えるものである。

研究成果の概要（英文）：

In this research, a novel mechanism of induction of glucocorticoid resistance in lymphoma cells was proposed by analyses of factors that could modulate the expression of glucocorticoid receptors. Furthermore, it was confirmed that inhibition of NF- $\kappa$ B could restore glucocorticoid sensitivity, suggesting that it may be a new strategy for the treatment of lymphoma with glucocorticoid resistance.

交付決定額

（金額単位：円）

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2011 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2012 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 2,500,000 | 750,000 | 3,250,000 |

研究分野：臨床獣医学

科研費の分科・細目：獣医学・臨床

キーワード：リンパ腫・グルココルチコイド耐性・グルココルチコイド受容体・NF- $\kappa$ B

## 1. 研究開始当初の背景

グルココルチコイドは副腎皮質で産生されるホルモンの一種であり、代謝や免疫に深く関与するが、その作用の 1 つとして免疫担当細胞であるリンパ球の分化・増殖・機能を抑制することが知られている。人工的に合成されたグルココルチコイドはリンパ球ががん化したリンパ腫およびリンパ性白血病に対

して増殖抑制効果を持つことが知られ、古くから抗がん治療に使用されてきた。豊富な使用経験や薬効に比べてマイルドな副作用はグルココルチコイドの特記すべき長所であり、その有用性を向上させることは社会的に大きな意義を持つ。グルココルチコイドはその受容体であるグルココルチコイド受容体 (glucocorticoid receptor, GR) を介して

細胞にシグナルを伝達するが、詳細なメカニズムは不明なままに使用されてきた。近年、その分子メカニズムを解明しようという機運が国内外で高まっており、そういった意味では、グルココルチコイドは古くて新しい研究対象であるといえる。腫瘍の治療中に腫瘍がグルココルチコイドに対する耐性を獲得することがある。その原因としては腫瘍細胞における GR の発現異常や機能異常等の関与が指摘されているが、詳細については不明な点が多い。研究代表者は以前より、リンパ腫細胞における転写因子 Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) の恒常的な活性化が GR の発現を低下させ、これがグルココルチコイド感受性を低下させ、耐性を発現させていることを突き止めてきた。このことは、NF- $\kappa$ B を特異的に阻害することでグルココルチコイド耐性を回避することができる可能性を強く示唆している。しかし、活性化した NF- $\kappa$ B がどのようにして GR の発現を低下させているのかというメカニズムについては不明なままであり、グルココルチコイド耐性解除法の確立にむけ、分子レベルでの詳細な基礎研究が必要と考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究計画の目的は、(1) NF- $\kappa$ B と GR とのクロストークについて分子レベルで解析すること、(2) 生体における NF- $\kappa$ B 阻害剤のグルココルチコイド感受性回復効果を判定することであった。具体的には、NF- $\kappa$ B と GR とのクロストークを解明するため、GR の発現を調節する可能性がある転写因子やスプライシングファクターについて網羅的に発現変化を解析し、NF- $\kappa$ B との関連性の強い因子の抽出をすること、さらにサイレンシング技術を用いて GR 発現およびグルココルチコイド感受性との関連性を正確に評価することを目的とした。生体における NF- $\kappa$ B 阻害剤の効果判定については、実際のリンパ腫患者の腫瘍細胞に対し、NF- $\kappa$ B 阻害剤が細胞株と同様にグルココルチコイド感受性の回復効果を持つかどうかを確認すること、さらに NF- $\kappa$ B 阻害剤が腫瘍モデル動物のリンパ腫に対しても同様にグルココルチコイド耐性解除効果を持つかどうかを検証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) NF- $\kappa$ B による GR 発現調節メカニズムを解明するため、リンパ腫細胞株を用い、以下の方法で分子レベルの解析を行った。

- ① NF- $\kappa$ B 阻害剤および siRNA で NF- $\kappa$ B の機能阻害を行い、GR 調節因子 (転写因子およびスプライシングファクター) の発現変化を PCR 法およびウェスタンブロット法を用いて解析した。

- ② NF- $\kappa$ B 阻害剤および siRNA で NF- $\kappa$ B の機能阻害を行い、GR 遺伝子のプロモーター部分と GR 調節因子の結合について、クロマチン免疫沈降法を用いて解析した。
- ③ GR 調節因子の発現を siRNA を用いてノックダウンし、その際の GR アイソタイプ (GR $\alpha$ 、GR $\beta$ ) の発現変化を PCR 法、ウェスタンブロット法、免疫細胞染色法で、またグルココルチコイド感受性を MTT 法および BrdU 取り込み抑制法で検討した。
- ④ GR 調節因子の発現を siRNA を用いてノックダウンし、その際の GR 遺伝子のプロモーター部分と GR 調節因子の結合について、クロマチン免疫沈降法を用いて解析した。

(2) リンパ腫患者由来腫瘍細胞におけるグルココルチコイド感受性に対する NF- $\kappa$ B 阻害剤の効果について検討するため、以下の方法で解析を行った。

- ① NF- $\kappa$ B 阻害剤を添加した場合と添加しなかった場合とでグルココルチコイド感受性に差が生じるかどうか、BrdU 取り込み抑制法によって解析した。
- ② NF- $\kappa$ B 阻害剤を添加することで GR アイソタイプの発現が変化するかどうか、PCR 法を用いて解析した。

(3) 免疫不全マウスを用いて腫瘍モデルを作製するため、BALB/c nu/nu マウスおよび SCID マウスに対し、様々な細胞数のリンパ腫細胞株を腹腔内投与して腫瘍細胞が増殖する条件を探索した。継時的に末梢血を採取し、フローサイトメーターを用いて、ヒト CD45 陽性細胞のモニタリングを行った。

(4) 生体における腫瘍のグルココルチコイド感受性に対する NF- $\kappa$ B 阻害剤の効果を判定するため、前項で確立した腫瘍モデルを作製し、NF- $\kappa$ B 阻害剤およびグルココルチコイドを連日投与して生存期間を記録した。

## 4. 研究成果

(1) NF- $\kappa$ B による GR 発現調節メカニズムの解析

ヒト Burkitt 型リンパ腫由来の Raji 細胞に対し NF- $\kappa$ B の機能阻害を行い、GR 調節候補因子である c-Myb、PU. 1、Hes1、SRp20、SRp30c、SRp40、および ASF/SF2 の発現変化を解析したところ、PU. 1 および SRp30c の発現量が NF- $\kappa$ B 阻害剤の濃度依存的に減少した。したがって、NF- $\kappa$ B の活性化によるグルココルチコイド受容体発現低下には、PU. 1 と SRp30c が深く関与していると考えられた。また、クロマチン免疫沈降法により、PU. 1 が実際にグルココルチコイド受容体プロモーターに結

合しており、NF- $\kappa$ Bの機能阻害によってその結合が抑制されることを確認した。次に、ヒトのGRには機能を持つGR $\alpha$ と機能を持たないGR $\beta$ があるため、GR調節因子がこれらのアイソタイプにどのような変化をもたらすかを検討した。PU.1およびSRp30cについてsiRNAによるノックダウンを行ったところ、PU.1をノックダウンするとGR $\alpha$ 、GR $\beta$ 両方の発現量が増加したが、SRp30cをノックダウンするとGR $\alpha$ の発現量が増加し、GR $\beta$ の発現量は減少した。これらの結果からは、NF- $\kappa$ Bが活性化するとPU.1の発現量が増加してGR遺伝子の転写が増加し、SRp30cの発現量が増加してGR $\alpha$ へのスプライシングが増えたと考えられた。したがって、NF- $\kappa$ Bの活性化はPU.1およびSRp30cを介して機能性受容体であるGR $\alpha$ の発現量を低下させ、グルココルチコイド耐性を発現させていることが明らかとなった。

#### (2) リンパ腫患者由来細胞におけるグルココルチコイド感受性

リンパ腫患者由来の腫瘍細胞に対してNF- $\kappa$ B阻害剤処理を行うと、約半数の腫瘍細胞でグルココルチコイド耐性が解除されることが明らかとなった。これらの細胞では、細胞株での実験と同様に機能性GR (GR $\alpha$ )の発現が減少しており、NF- $\kappa$ B阻害によりGR $\alpha$ の発現が上昇することが確認できた。

#### (3) 腫瘍モデル動物におけるNF- $\kappa$ B阻害剤の効果

実験計画書に則り、BALB/c nu/nuマウスを用いて腫瘍モデルの作製を試みたもののRaji細胞が生着しなかったため、SCIDマウスを用いて腫瘍モデルの作製を試みた。その結果、腹腔内および腹腔内臓器において腫瘍細胞が生存・増殖し、マウスは腫瘍細胞接種から約3~6週間で腹水貯留および腹囲膨満を呈して死亡することが判明した。この腫瘍モデルを用い、NF- $\kappa$ B阻害剤IMD-0354のグルココルチコイド感受性に対する効果を検証した。腫瘍マウスの50%生存期間は、生理的食塩水、デキサメサゾン、IMD-0354の各単独投与群に比べIMD-0354とデキサメサゾンの混合投与群で有意に延長した。このことは、NF- $\kappa$ B阻害剤によるグルココルチコイド感受性の回復がin vivo試験においても確認できたことを示している。

以上の研究結果より、リンパ腫細胞におけるNF- $\kappa$ Bの活性化は、GR発現調節因子であるPU.1やSRp30cを介して機能性GR発現量の減少させることでグルココルチコイド耐性に寄与していることが明らかとなった。さらに、NF- $\kappa$ B阻害剤の全身投与がリンパ腫のグルココルチコイド感受性を

回復させる有効な手段となる可能性が強く示された。これらの知見は、国内外の学会にて発表するとともに、国際的学術雑誌に論文投稿中である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計15件)

- ① Amagai Y, Akane T, Matsuda A, Oida K, Jung K, Nishikawa S, Jang H, Matsuda H. Heterogeneity of internal tandem duplications in the c-kit of dogs with multiple mast cell tumors. *J. Small Anim. Prac.* 2013. In press, 査読有, DOI: 10.1111/jsap.12069.
- ② Amagai Y, Akane T, Matsuda A, Oida K, Jung K, Nishikawa S, Jang H, Ishizaka S, Matsuda H. Increased expression of the antiapoptotic protein MCL1 in canine mast cell tumors. *J. Vet. Med. Sci.* 2013. In press, 査読有, DOI: 10.1292/jvms.13-0025.
- ③ Furusaka T, Matsuda A, Tanaka A, Matsuda H, Ikeda M. Superselective intra-arterial chemoradiation therapy for functional laryngeal preservation in advanced squamous cell carcinoma of the glottic larynx. *Acta. Otolaryngol.* 133(6): 633-640. 2013. 査読有, DOI: 10.3109/00016489.2012.759275.
- ④ Amagai Y, Tanaka A, Matsuda A, Oida K, Jung K, Matsuda H. The phosphoinositide 3-kinase pathway is crucial for the growth of canine mast cell tumors. *J. Vet. Med. Sci.* 2013. In press, 査読有, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23328607>
- ⑤ Furusaka T, Matsuda A, Tanaka A, Matsuda H, Ikeda M. Laryngeal preservation in advanced piriform sinus squamous cell carcinomas using superselective intra-arterial chemoradiation therapy with three agents. *Acta. Otolaryngol.* 133(3): 318-326. 2013. 査読有, DOI: 10.3109/00016489.2012.744144.
- ⑥ Tanaka A, Jung K, Matsuda A, Jang H, Kajiwara N, Amagai Y, Oida K, Ahn G, Ohmori K, Kang K, Matsuda H. Daily intake of Jeju ground water improves the skin condition of the model mouse for human atopic dermatitis. *J. Dermatol.* 40(3): 193-200. 2013. 査読

- 有, DOI: 10.1111/1346-8138.12055.
- ⑦ Amagai Y, Tanaka A, Matsuda A, Jung K, Ohmori K, Matsuda H. Stem cell factor contributes to tumorigenesis of mast cells via an autocrine/paracrine mechanism. *J. Leukoc. Biol.* 93(2): 245-250. 2013. 査読有, DOI: 10.1189/jlb.0512245.
- ⑧ Ohmori K, Nishikawa S, Oku K, Oida K, Amagai Y, Kajiwara N, Jung K, Matsuda A, Tanaka A, Matsuda H. Circadian rhythms and the effect of glucocorticoids on expression of the clock gene period1 in canine peripheral blood mononuclear cells. *Vet. J.* S1090-0233(12) 00432-00437. 2012. 査読有, DOI: 10.1016/j.tvjl.2012.10.010.
- ⑨ Matsuda A, Tanaka A, Pan W, Okamoto N, Oida K, Kingyo N, Amagai Y, Xia Y, Jang H, Nishikawa S, Kajiwara N, Ahn G, Ohmori K, Matsuda H. Supplementation of the fermented soy product ImmuBalance™ effectively reduces itching behavior of atopic NC/Tnd mice. *J. Dermatol. Sci.* 67(2): 130-139. 2012. 査読有, DOI: 10.1016/j.jdermsci.2012.05.011.
- ⑩ Tanaka A, Nomura Y, Matsuda A, Ohmori K, Matsuda H. Mast cells function as an alternative modulator of adipogenesis through 15-deoxy-delta-12, 14-prostaglandin J2. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 301(6): C1360-C1367. 2011. 査読有, DOI: 10.1152/ajpcell.00514.2010.
- ⑪ Okamoto N, Tanaka A, Jung K, Karasawa K, Orito K, Matsuda A, Amagai Y, Oida K, Ohmori K, Matsuda H. Silencing of Int6 gene restores function of the ischemic hindlimb in a rat model for peripheral arterial disease. *Cardiovasc. Res.* 92(2): 209-217. 2011. 査読有, DOI: 10.1093/cvr/cvr203.
- ⑫ Jung K, Tanaka A, Fujita H, Matsuda A, Oida K, Karasawa K, Okamoto N, Ohmori K, Jee Y, Shin T, Matsuda H. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ -mediated suppression of dendritic cell function prevents the onset of atopic dermatitis in NC/Tnd mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127(2): 420-429. 2011. 査読有, DOI: 10.1016/j.jaci.2010.10.043.
- ⑬ Matsuda A, Tanaka A, Amagai Y, Ohmori K, Nishikawa S, Xia Y, Karasawa K, Okamoto N, Oida K, Jang H, Matsuda H. Glucocorticoid sensitivity depends on expression levels of glucocorticoid receptors in canine neoplastic mast cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 144(3-4): 321-328. 2011. 査読有, DOI: 10.1016/j.vetimm.2011.08.013.
- ⑭ Karasawa K, Tanaka A, Jung K, Matsuda A, Okamoto N, Oida K, Ebihara N, Ohmori K, Matsuda H. Retinal Degeneration and rdl Mutation in NC/Tnd Mice—A Human Atopic Dermatitis Model. *Curr. Eye Res.* 36: 350-357. 2011. 査読有, DOI: 10.3109/02713683.2010.542268.
- ⑮ Karasawa K, Tanaka A, Jung K, Matsuda A, Okamoto N, Oida K, Ohmori K, Matsuda H. Patterns of aquaporin expression in the canine eye. *Vet. J.* 190(2): e72-77. 2011. 査読有, DOI: 10.1016/j.tvjl.2010.12.027.

[学会発表] (計 17 件)

- ① 石坂さおり、プロバイオティクスの経口投与が背井場の腸内環境に与える影響、第 25 回日本ウマ科学会学術集会、2012 年 12 月 4 日、東京
- ② 松田彬、蹄葉炎新規治療薬としての NF- $\kappa$ B 阻害剤の効果解析、第 25 回日本ウマ科学会学術集会、2012 年 12 月 3 日、東京
- ③ Tanaka A, Involvement of daily metallic soap in skin conditions of patients with atopic dermatitis. *Skin Allergy Meeting*, Nov. 30<sup>th</sup>, 2012, Berlin, Germany.
- ④ 松田彬、金属石鹼がアトピー性皮膚炎自然発症モデル NC/Tnd マウスの皮膚症状に及ぼす影響、第 154 回日本獣医学会学術集会、2012 年 9 月 16 日、盛岡
- ⑤ 大森啓太郎、イヌ末梢血単核球における時計遺伝子の概日リズム解析、第 154 回日本獣医学会学術集会、2012 年 9 月 16 日、盛岡
- ⑥ Ahn Ginnae、海藻の一種であるカジメに含まれる dieckol の肥満細胞に対する効果、第 154 回日本獣医学会学術集会、2012 年 9 月 16 日、盛岡
- ⑦ 北村亮、イヌ肥満細胞腫における c-kit mRNA 全長の塩基配列解析、第 154 回日本獣医学会学術集会、2012 年 9 月 16 日、盛岡
- ⑧ Jung Kyungsook、角膜損傷における水チャンネル・アクアポリンの発現変化、第 154 回日本獣医学会学術集会、2012 年 9 月 16 日、盛岡
- ⑨ 西川翔、ラジオ波を用いた癌温熱療法の効果についての分子生物学的検討、第 154 回日本獣医学会学術集会、2012 年 9 月 15

- 日、盛岡
- ⑩ 雨貝陽介、イヌ肥満細胞腫における幹細胞因子自己産生メカニズム、第154回日本獣医学会学術集会、2012年9月15日、盛岡
  - ⑪ Jang hyosun、アトピー性皮膚炎モデルマウスにおける皮膚 pH と皮膚バリア損傷の関連性、第154回日本獣医学会学術集会、2012年9月14日、盛岡
  - ⑫ Xia Yan、アトピー性皮膚炎に対する知覚神経刺激への反応性と TRPV1 の関連性の検討、第154回日本獣医学会学術集会、2012年9月14日、盛岡
  - ⑬ 松田彬、リンパ球のグルココルチコイド感受性におけるスプライシング制御因子の役割、Conference for BioSignal and Medicine 2012、2012年9月1日、志摩
  - ⑭ 松田彬、イヌ肥満細胞腫におけるグルココルチコイド感受性に関する検討、第152回日本獣医学会学術集会、2011年9月19日、大阪
  - ⑮ 田中あかね、樹状細胞の機能に対する核レセプターPPAR $\gamma$ の役割、第152回日本獣医学会学術集会、2011年9月19日、大阪
  - ⑯ 石坂さおり、プロバイオティクスの経口投与が成馬の腸内環境に与える効果、第152回日本獣医学会学術集会、2011年9月19日、大阪
  - ⑰ Xia Yan、知覚神経刺激に対するアトピー性皮膚炎自然発症モデル NC/Tnd マウスの反応性の検討、第152回日本獣医学会学術集会、2011年9月19日、大阪

〔図書〕(計1件)

- ① 田中あかね、松田彬、雨貝陽介、松田浩珍、インターズー、肥満細胞腫の腫瘍化メカニズム J-vet No.309、2012年、pp8-15

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：オリゴヌクレオチド

発明者：田中あかね、松田浩珍、松田彬

権利者：国立大学法人東京農工大学

種類：特許

番号：特願 2011-274897

出願年月日：2011年12月15日

国内外の別：国内・国外

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.tuat.ac.jp/~mol\\_path/index.html](http://www.tuat.ac.jp/~mol_path/index.html)

(1)研究代表者

松田 彬 (MATSUDA AKIRA)

東京農工大学・農学府・助教

研究者番号：90613969