

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460439

研究課題名(和文) B細胞リプログラミングとヒト化マウスモデルによるホジキンリンパ腫発症機構の解析

研究課題名(英文) Analyses of molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma by transformation of B cells and humanized mice model

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではホジキンリンパ腫(HL)発症の分子基盤の解明を目的とした。Epstein-Barr virus (EBV)由来のLMP-1タンパク質はB細胞への感染で誘導され、リンパ芽球様細胞株(LCL)になる過程でHLで認められるCD30とJunBの発現もたすことが示された。さらに実際のEBV関連リンパ増殖性疾患で上記を示唆する結果を得た。一方LCLとHL間で幹細胞様集団の存在や、ABF-1の過剰な誘導といった共通する特徴の存在が示された。以上からEBV感染の初期段階でB細胞ではHLで認められる特徴の一部がすでに誘導され、その後の進展に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study we aimed to clarify biological bases underlying in the development of Hodgkin lymphoma (HL). LMP-1, Epstein-Barr virus (EBV)-derived protein induced JunB and CD30, molecules characteristic for HL cells, during transformation of normal B cells to lymphoblastoid cells. In addition, we found that lymphoblastoid cell line (LCL) already contained stem cell-like population morphologically similar to that had been found in HL. Induction of activated B cell factor-1 (ABF-1), molecule reported as responsible for loss of B-cell phenotype in HL was also induced in LCL. These results indicated that a part of biological bases, which characterize HL was already induced at early phase of EBV infection to B cells.

研究分野：人体病理

キーワード：ホジキンリンパ腫 CD30 Epstein-Barr virus (EBV) リンパ芽球様細胞株 (LCL)

## 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで Hodgkin リンパ腫(HL)細胞の増殖や生存を支える分子基盤の解析に焦点を当てた研究を行ってきた。これにより HL の増殖の分子基盤が tumor necrosis factor receptor (TNFR)ファミリーに属する CD30 の過剰発現による転写因子 NF- $\kappa$ B と AP-1 の恒常的活性化と密接に関わっていることを分子レベルで明らかにした。

HL の腫瘍細胞は、Hodgkin Reed-Sternberg(H-RS)細胞が代表的であるが、HL が H-RS のみならず比較的小型の腫瘍細胞からなることを示唆する報告は約 20 年前にあるが、その後はほとんど注目されていない。HL の約半数に Epstein-Barr virus (EBV)の感染を認め、B リンパ球の腫瘍化への関与が示唆されている。ほとんどが B 細胞に由来する HL 細胞は B 細胞としての性質の多くを失いリプログラミングの過程を経て腫瘍化すると考える報告がある。

従来の HL 研究が HL は特徴的 H-RS 細胞に代表される比較的均一な細胞集団とする理解に立脚したものであるのに対し、本研究は近年の癌幹細胞の概念や HL 細胞が H-RS を含んだヘテロな腫瘍集団であることに立脚した新しい視点から、不明である「ホジキンリンパ腫発症の分子基盤」の解明に挑戦する特色をもった研究である。

## 2. 研究の目的

Hodgkinリンパ腫(HL)はほとんどが B 細胞に由来する腫瘍と考えられている。形態的には大型で単核の Hodgkin(H)細胞と多核の Reed-Sternberg(RS)細胞の出現を特徴とする特異なリンパ腫として理解されている。H-RS の特徴や分子基盤に関する報告はこれまでの研究で多くの知見の蓄積がある。しかしながら「B 細胞のリプログラミングや HL 幹細胞の形成、HL細胞の分化、H-RS 細胞の形成機構の解析」という視点での研究は未だ無い。本研究は上記課題に基づいて、HLの発生や HL 細胞の分化について俯瞰的に明らかにし、得られた知見に基づき、HLや癌に対するより本質的な理解や新規治療法を探索することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) Epstein-Barr virus(EBV)産生細胞株 B95.8 細胞の培養上清を用いて正常末梢血 B リンパ球にEBVを感染させ、シクロスポリンによる免疫抑制下において Lymphoblastoid cell line (LCL)へとトランスフォームさせた。

感染前、20日間、50日間のポイントにおいて EBV由来分子のLMP-1とHodgkinリンパ腫の分子基盤であるCD30、JunB の誘導を蛍光免疫染色法にて検討した。

(2) 免疫抑制下のEBV増殖性疾患および HL の診断に用いられた標本切片を用いて、正常 B 細胞が LCL へとトランスフォームする過程で誘導される事を確認した LMP-1、JunB、CD30 の発現を免疫染色法により検討した。EBV は EBV 増殖性疾患の全てにおいて EBER を検出する in situ ハイブリダイゼーションにて検出した。

(3) B細胞の分化に関わる転写因子 E2A は HL において抑制因子である activated B cell factor-1 (ABF-1)の過剰な誘導により抑制されていることが報告されている。ABF-1 の誘導を LCL、HL 細胞株において RT-PCR 法による遺伝子及びウエスタンブロット法によるタンパクレベルで解析した。

(4) ヒト化マウスを用いた HL 発症モデルの作製を行い、LCL が生体内のどこで増殖し、形質を変化させていくかを検討した。ヒト化マウスに宿主由来の蛍光ラベルされた LCL を戻すことによりその分布や増殖状態を観察できる系の確立を試みた。

(a) ヒト臍帯血から分離した造血幹細胞を生まれたばかりの NOD/scid/ c-/- (NOG) マウスに注射することによりマウスの免疫系の全てがヒト免疫細胞で構成されるようになったヒト化マウスを作製する。作製したヒト化マウスから B細胞を分離してシクロスポリンによる免疫抑制下において EBV を感染させトランスフォームし、LCL を作製する。

(b) 作製した LCL にレンチウイルスベクターを用いて蛍光蛋白質 mCherry を発現させる。蛍光蛋白質を発現した細胞はフローサイトメトリーにて分離する。発現していない集団はコントロールとして保存しておく。

(c) ヒト化マウス尾静脈から蛍光ラベルした mCherry-LCL を注射して、その分布を経時的に蛍光検出機を用いてスキャンして観察を行ない、増殖の見られる臓器を中心として解析する。

(5) ベラパミルに対するヘキスト染色性をフローサイトメトリー(FCM)により解析することで side population(SP)という分画に癌幹細胞分画が濃縮されることが報告され、癌幹細胞集団の同定の一つの方法として広く用

いられている。LCL について FCM によりソーティングし、SP 分画と non-SP 分画における分子発現の解析と SP 分画特異的分子群の注出を抽出しHLと比較を行い、HL 細胞との相互関係を明らかにする。

#### 4. 研究成果

(1) 正常B細胞をEpstein-Barr virus (EBV) 感染によりLCLへトランスフォームする過程でLMP-1に加えCD30およびその発現に関与するJunBの誘導を蛍光免疫染色法で明らかにした。さらにリポ ターゼンアッセイによりLMP-1がJunBプロモーターおよびCD30プロモーターを活性化することを示した。

(2) 免疫抑制下の Epstein-Barr virus (EBV) 増殖性疾患および Hodgkin リンパ腫 (HL) の診断に用いられたリンパ節標本の切片を用いて、正常B細胞がLCLへトランスフォームする過程で誘導される事を確認したLMP-1、JunB、CD30の発現を免疫染色法により検討した。HLにおいてはJunB、CD30の発現を認めた。EBV増殖性疾患においてはLMP-1、JunB、CD30の発現を認めた。EBVはEBV増殖性疾患の全てにおいてEBERを検出するin situハイブリダイゼーションにて検出した。コントロールの正常扁桃ではLMP-1とCD30の発現は認めず、JunBは細胞質に弱く発現していた。

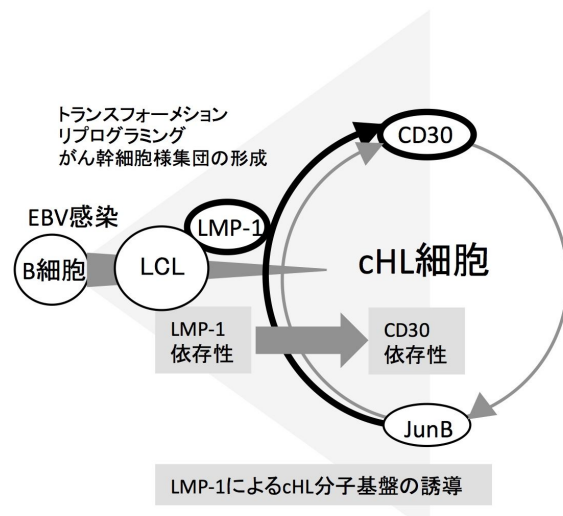
(3) B細胞の分化に関わる転写因子E2AはHLにおいて抑制因子であるABF-1の過剰な誘導により抑制されていることが報告されている。ABF-1の誘導をLCLに加え、HL細胞株においてウエスタンブロット法およびRT-PCR法により確認したところ、ABF-1はLCLにおいて既に誘導されている事が示された。

(4) 一方、ヒト化マウス尾静脈から蛍光ラベルしたLCLを注射して、その分布を経時的に蛍光検出機を用いてスキャンして観察した。注射する蛍光ラベルしたLCLの細胞数、蛍光イメージアナライザーの感度に関する検討では、蛍光の種類についての検討も追加して行ったが、非特異的な蛍光が詳細な解析を困難なものとした。

(5) ベラパミルに対するヘキスト染色性をフローサイトメトリーにより解析することでside population(SP)という分画に癌幹細胞分画が濃縮されることが報告され、癌幹細胞

集団の同定の一つの方法として広く用いられている。樹立したLCLのフローサイトメトリーによる解析でこれらの細胞にはすでにSPが存在していることが示された。ソーティングしサイトスピン後、ギムザ染色を行いこのSPとnon-SPの細胞の形態を解析したところ、SPはnon-SPに比べて小型の細胞により構成され、結果は既に我々が報告したHLに類似していることが示された。

以上の結果より、正常B細胞がLCLとなる過程でEBV感染に伴うLMP-1誘導がJunBを介してCD30を誘導すると考えられた現象が、確かに臨床検体の検討においても示唆されること、LCL形成の過程で既にB細胞としての分化の抑制と腫瘍化への脱制御、がん幹細胞様集団が形成されており、Hodgkinリンパ腫の特徴がすでに形成されつつあることが示唆された。



#### 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4件)

- 1 Nakashima M, Watanabe M, Uchimaru K, Horie R. Trogocytosis of ligand-receptor complex and its intracellular transport in CD30 signalling. Biol Cell、査読有、110(5)巻、2018、109-124. DOI: 10.1111/boc.201800002.
- 2 Watanabe M, Nakano K, Kadin ME, Higashihara M, Watanabe T, Horie R.

- CD30 Induces Heat Shock Protein 90 and Signal Integration in Classic Hodgkin Lymphoma Cells.  
Am J Pathol., 査読有、187(1)巻、2017、163-175.  
DOI: 10.1016/j.ajpath.2016.09.007.
- 3 Miyazaki K, Koike Y, Kunishima S, Ishii R, Danbara M, Horie R, Yatomi Y, Higashihara M.  
Immature platelet fraction measurement is influenced by platelet size and is a useful parameter for discrimination of macrothrombocytopenia.  
Hematology, 査読有、20巻、2015、587-592.  
DOI: 10.1179/1607845415Y.0000000021.
- 4 Toda T, Watanabe M, Kawato J, Kadin ME, Higashihara M, Kunisada T, Umezawa K, and Horie R.  
Brefeldin A exerts differential effects on anaplastic lymphoma kinase positive anaplastic large cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma cell lines.  
Br J Haematol., 査読有、170(6)巻、2015、837-846.  
DOI: 10.1111/bjh.13508.
- 〔学会発表〕(計8件)
- 1 渡邊真理子、東原正明、堀江良一  
古典的 Hodgkin リンパ腫における CD30 を介した HSP90 誘導シグナル伝達制御機構の解析  
第 64 回日本臨床検査医学会学術集会、2017.
- 2 Makoto Nakashima, Mariko Watanabe, Kaoru Uchimar, Ryouich Horie  
Internalization of ligand-receptor complex and its intracellular transport in CD30 signaling  
第79回日本血液学会学術集会、2017.
- 3 堀江良一、渡邊真理子、中野和民、Marshall E. Kadin、渡邊俊樹、東原正明  
古典的Hodgkinリンパ腫におけるCD30を介したHSP90誘導とシグナル統合機構の解析  
第57回リンパ網内系学会総会、2017.
- 4 Makoto Nakashima, Tadanori Yamochi, Mariko Watanabe, Atae Utsunomia, Masaaki Higashihara, Kaoru Uchimar, Toshiki Watanabe, Ryouichi Horie  
The emergence of hyperpliod cells in CD30+ subpopulation of adult T-cell leukemia.  
第 78 回日本血液学会、2016.
- 5 堀江良一、渡邊真理子、内丸薫、中野和民、Marshall E. Kadin、渡邊俊樹、東原正明

古典的Hodgkinリンパ腫におけるCD30を介したHSP90誘導とシグナル統合機構の解析  
第 56 回日本リンパ網内系学会、2016 (誌上発表).

- 6 中島誠、矢持忠徳、渡邊真理子、内丸薫、宇都宮與、東原正明、渡邊俊樹、堀江良一  
成人T細胞性白血病におけるCD30陽性集団に高倍数体細胞は出現する  
第3回日本HTLV-1学会学術集会、2016.
- 7 堀江良一、戸田崇史、渡邊真理子、河戸淳仁、梅澤一夫、東原正明  
ALK陽性未分化大細胞型リンパ腫と古典的Hodgkinリンパ腫細胞株に対して異なる感受性を示す薬 剤の探索とBrefeldin Aの同定  
第 54 回日本リンパ網内系学会総会、2015.
- 8 堀江良一、戸田崇史、渡邊真理子、河戸淳仁、Marshall E. Kadin、梅澤一夫、東原正明  
Differential effects of Brefeldin A on anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin lymphoma  
第77回日本血液学会学術集会、2015.

〔図書〕(計1件)

- 1 堀江良一、特集 ホジキンリンパ腫、医薬ジャーナル社、Vol.26 No.2、2016、39-45.

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：新規 NF- B 阻害剤  
発明者：大村智、堀江良一、砂塚敏明、渡邊真理子、廣瀬友靖、菅原章公、野口吉彦  
権利者：学校法人北里研究所  
種類：特許  
番号：特願 2017-181123  
出願年月日：平成 29 年 9 月 21 日  
国内外の別：国内

6. 研究組織

- (1)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
- (2)研究分担者  
堀江 良一 (HORIE, Ryouichi)  
北里大学・医療衛生学部・教授  
研究者番号：80229228