

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19688

研究課題名(和文)皮膚悪性リンパ腫におけるガングリオシド解析と新規治療の可能性探索

研究課題名(英文)Analyzing ganglioside expression of cutaneous malignant lymphoma

研究代表者

清原 英司 (KIYOHARA, EIJI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70423176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：糖鎖であるガングリオシドは腫瘍で重要な役割を果たしているが、皮膚悪性リンパ腫における関与を調べるため、リンパ腫細胞株において増殖に關与するGD3を産生する酵素GD3 synthaseの上昇を確認した。次に皮膚リンパ腫患者の皮膚腫瘍部から回収した腫瘍細胞におけるGD3の発現量を実際に解析した結果、正常人と比較して腫瘍細胞では有意にGD3が増加していた。この結果よりガングリオシドが皮膚リンパ腫において何らかの役割がある可能性が示唆された。そこでGD3 synthaseをターゲットとした薬剤を細胞株で投与し、細胞死を確認したが抗腫瘍効果は弱かったため、治療標的としてさらなる解析が必要である。

研究成果の概要(英文)：Gangliosides have important roles in promoting growth of several tumors. However, there is few reports of ganglioside expression in cutaneous lymphoma. GD3, which is one of the gangliosides, is known to promote growth of tumors. GD3 synthase which can synthesize GD3 from GM3, was increased on lymphoma cell lines. Next, GD3 expression on tumor cells, which were collected from tumors of mycosis fungoides patients, was analyzed. This analysis showed that GD3 on the tumor cells was significantly increased, compared with blood cells of healthy donors. This result implied ganglioside might have important role in cutaneous lymphoma. To show possibility of new target of treatment, we tested apoptosis of lymphoma cell lines, caused by anti-GD3 synthase treatment. However, suppression level of tumor growth was not enough. Taken together, further analysis of ganglioside will be needed in cutaneous lymphoma.

研究分野：皮膚悪性腫瘍

キーワード：皮膚悪性リンパ腫 ガングリオシド GD3 GD3 synthase 菌状息肉症

1. 研究開始当初の背景

細胞膜に局在するタンパク質や脂質の多くは糖鎖修飾をうけて発がん進展において様々な機能をもつ。その一つとして GNT-V と呼ばれる糖鎖転換酵素が EMT や発がんにおいて重要な役割を果たすことを我々が作成した GNT-V トランスジェニックマウスにおいて証明した (Terao M et al. J Biol Chem 2011 286(32):283303-11)。

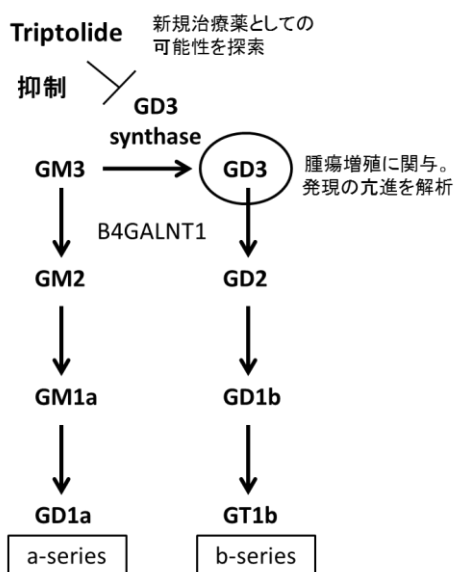
また、セラミドと呼ばれる脂質と糖鎖が結合したものにシアル酸が含まれるものをガングリオシド(シアル酸含有スフィンゴ糖脂質)と呼ぶ。この細胞表面に存在するガングリオシドは細胞組織特異的な分子種分布を示し、細胞の発生や分化、癌化に伴って分布が大きく変動することが知られる。

皮膚悪性リンパ腫は造血系悪性腫瘍のうち、主に異型リンパ球を主体として皮膚浸潤をきたす疾患である。近年、欧米での新規治療薬が承認されているが、無効例や進行を抑えられない症例がまだまだ数多く存在するため、病態の更なる解析と新規の治療アプローチが求められている。今回我々は皮膚悪性リンパ腫におけるガングリオシドの役割に注目した。

腫瘍増殖に対して機能をもつガングリオシドとして a-series、b-series と呼ばれるグループが知られている。a-series に含まれる GM3 は EGF シグナルの抑制などにより腫瘍抑制へと働く (Haga Y et al. Biochim Biophys Acta 2008, 1780:393-404)。

一方、GM3 に GD3 転換酵素 (GD3 synthase) が働くと Neu5Ac の付加により GD3 となる。この b-series に含まれる GD3 は悪性黒色腫において integrin signal を介して腫瘍増殖に関与している (Ohkawa Y et al. J Biol Chem. 2010, 285:27213-27223)。

細胞膜上のガングリオシドの変化



また、化学療法に抵抗性を示すことが知られている Cancer stem cell(CSC)において GD3 や GD2 が高発現していることが乳がんにお

いて報告された (Liang YJ et al. PNAS 2013, 110(13):4968-73)。さらに GD3 synthase が乳がんにおいて EMT を制御し、転移を促していることも明らかになった (Sarkar TR et al. Oncogene 2014 ahead of print)。

そこで、データベース解析を利用して GD3 synthase に注目すると、悪性リンパ腫の GD3 synthase 発現量は正常のリンパ球と比較して高発現していた (OncoPrint 使用, Basso lymphoma 2005)。これはリンパ腫において GD3 が増加しており、腫瘍形成において重要な役割を持つことを示唆する。また、皮膚悪性リンパ腫の 30% を占める ATL の細胞株において GD3 synthase が高発現していることも報告されている (Yamashiro S et al. Glycoconj J 1995 12:894-900)。

以上のデータから、皮膚悪性リンパ腫は腫瘍抑制に働く a-series の GM3 に対して GD3 synthase が高発現することで腫瘍増殖に有利な b-series のガングリオシドが増加している可能性を考えた。

また、抗腫瘍効果を促す薬剤として Triptolide が注目されている。Triptolide は GD3 synthase を抑制することで GD3 の発現量を減少させ、アポトーシスを誘導する (Kwon HY et al. Exp Mol Med 2010,42(12):849-55)。さらに白血病細胞株を p53 を介さずに MDM2 を阻害することでアポトーシスを誘導することも報告された (Huang M et al. Mol Cancer Ther 2013, 12(2):184-94)。

よって皮膚悪性リンパ腫の新規治療ターゲットとしてガングリオシド、特に b-series に発現している GD3 と GD3 synthase に着目して解析を行い、Triptolide による治療の可能性を検討することにした。

2. 研究の目的

皮膚悪性リンパ腫におけるガングリオシドの発現を解析する。特に腫瘍増殖に関与した GD3 の発現量と GD3 synthase をターゲットとした治療の可能性について探索する。

3. 研究の方法

(1) 皮膚リンパ腫細胞株の HH と Hut78 を培養し、発現しているガングリオシドや GD3 synthase や β 4GALNT1 などの転換酵素を、mRNA を回収して qRT-PCR 法によって測定した。また、採苗表面上に発現しているガングリオシドの GD3 を FACS analysis にて直接測定した。

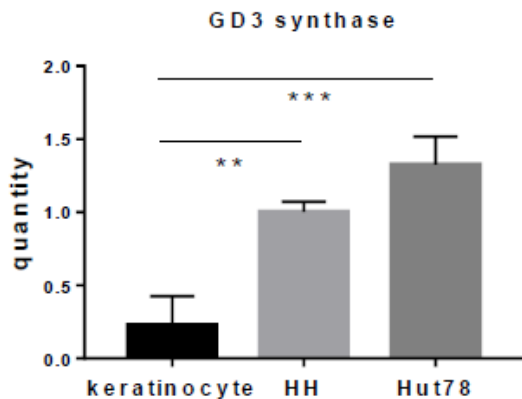
(2) Triptolide による抗腫瘍効果をみるために培養した HH と Hut78 に Triptolide を投与して 24 時間後に アネキシン V と PI を使用した FACS analysis でアポトーシスを測定した。

(3) 当院リンパ腫専門外来へ皮膚リンパ腫で代表的な菌状息肉症患者を集めてデータベース化し、その中から同意を得た stage IIB

患者の腫瘍細胞が多く含まれている病変部を切除した。皮膚組織を細断し、リンパ球を比重遠心法で回収した。T細胞性のマーカーで腫瘍細胞を同定し、GD3とフェノタイプをFACS analysisで直接測定した。

4. 研究成果

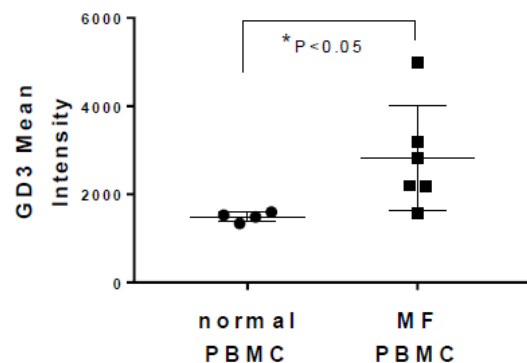
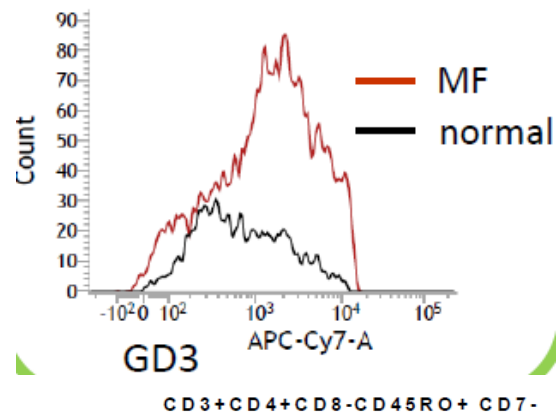
(1) まず、皮膚リンパ腫細胞株である HH cell と Hut78 cell を *in vitro* で培養し、mRNA を回収して GD3 への転換酵素である GD3 synthase と B4GALNT1 の発現量を qRT-PCR にて解析した。その結果、2種類とも皮膚の角化細胞と比較して有意に GD3 synthase が上昇していた。同様に B4GALNT1 酵素も有意に上昇していた。以上より、Triptolide のターゲットとなる GD3 synthase の発現が細胞株で確認できた。また、FACS analysis にて細胞膜上の GD3 を測定した所、HH よりも Hut78 の方が GD3 発現量は高値であった。このことから細胞株に関して GD3 synthase と GD3 の相関が示唆された。



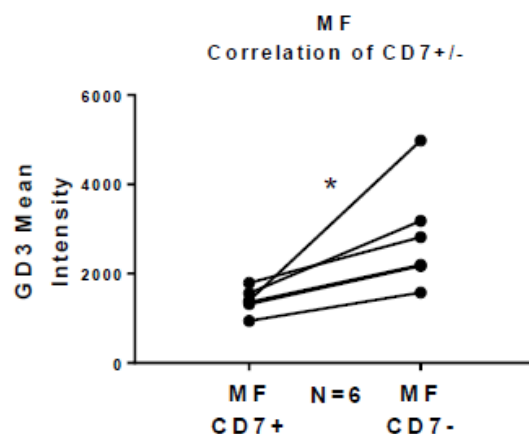
(2) GD3 synthase の抑制が報告されている Triptolide を *in vitro* で培養した HH と Hut78 に投与して、24 時間後の細胞死をアネキシン V と PI にて評価した。すると、Hut78 では対称群の DMSO と比較して低濃度から高濃度まですべての濃度で、ほぼ細胞死がみられなかった。HH では細胞死が確認できたものの、コントロール群と比較して抗腫瘍効果は 10%未満の増加しかなかった。以上の結果から、Triptolide による皮膚悪性リンパ腫への抗腫瘍効果は乏しいと考えた。また、以上の結果より *in vivo* での Triptolide による抗腫瘍効果の実験は進めなかった。

(3) 次に皮膚悪性腫瘍にて臨床検体を 24 時間以内に解析することにした。十分量の腫瘍細胞が集まっていると考えられた菌状息肉症 (MF) 患者の病変部から腫瘍細胞を回収し、FACS 解析を行った。最初に死細胞を除去し、がん化した T 細胞における GD3 の発現量を FACS にて測定した。腫瘍細胞は CD7-CD3+CD4+CD8-CD45RO+細胞と考えて測定した結果、正常人の末梢血リンパ球と

比較して腫瘍細胞で有意差 ($p < 0.05$) をもって GD3 が増加していた。この結果より GD3 が皮膚リンパ腫において何らかの働きもっている可能性が示唆された。



また、さらに解析を進めると CD7 陽性細胞から同様の CD3+CD4+CD8-CD45RO+分画と比較すると、CD7 陰性細胞において GD3 発現量が有意に増加していた。菌状息肉症では CD7 陰性例が多いことから、ガングリオシドの増加と CD7 欠損の関係が腫瘍増殖に関与する可能性が示唆された。



その他、皮膚悪性リンパ腫患者ではかゆみによる QOL 低下があり、かゆみに関与したサイトカインを ELISA で測定した結果、かゆみに関連する既存のサイトカイン上昇が強い患者で GD3 が高値になっている傾向もみられた。

組織サンプルを使って実際のアミノ酸解析

を行う予定であったが、皮膚へ浸潤した腫瘍部位のみを回収するサンプル調整が困難であったことと、他施設の専門家との都合も合わなかったため研究期間中には行えなかった。

以上、ガングリオシドの GD3 が皮膚リンパ腫において何らかの役割をもつ可能性が示唆された。GD3 synthase をターゲットとした薬剤を細胞株で投与し、細胞死を確認したが抗腫瘍効果は弱かったため、治療標的としてさらなる解析が必要である。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 清原 英司、Analyzing ganglioside expression of cutaneous malignant lymphoma、The 42nd annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology、2017. 12. 15 (高知)
- ② 清原 英司、Analysis of pruritus factor in cutaneous malignant lymphoma、2017. 9. 27、ザルツブルグ (Austria)
- ③ 高田 洋子、Exploring pruritogens in cutaneous malignant lymphoma、The 65th Montana symposium on the biology of skin、オレゴン (USA)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清原 英司 (KIYOHARA, EIJI)
大阪大学大学院医学系研究科 皮膚科
助教
研究者番号：70423176

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

松村 知加 (MATSUMURA CHIKA)
高田 洋子 (TAKATA YOKO)