

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08728

研究課題名(和文) 活性酸素制御を介したホジキンリンパ腫細胞の未熟性の維持と分化誘導機構の解析

研究課題名(英文) Regulation of Hodgkin lymphoma cell differentiation by reactive oxygen species

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Hodgkin lymphoma (HL) 細胞の分化の制御機構について検討した。HL細胞株は活性酸素の一種である過酸化水素で大型化、多核化した。未分化な集団は分化した集団に比べ活性酸素量が少なく、低酸素関連遺伝子群の発現を強く認め、hypoxia inducible factor (HIF)-1 やその下流の抗酸化分子heme oxygenase-1 (HO-1)の強い発現を認めた。HIF-1 および HO-1は過酸化水素によるHL細胞株の分化を抑制した。HIF-1 を介した HO-1の誘導は細胞内活性酸素の除去によりHL細胞の分化を抑制、その破綻はHL細胞の分化を起こすと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでHodgkinリンパ腫(HL)は大型のHodgkinおよびReed-Sternberg(H-RS)細胞を特徴とし、これらの細胞が腫瘍細胞として増殖すると考えられてきた。本研究はHL細胞にはがん幹細胞様の小型細胞集団が存在、中型細胞を経てH-RS細胞へ分化するという新しい視点に立ち、そのメカニズムが低酸素環境の模倣と活性酸素の制御にあることを明らかにした。本研究の成果は、がん細胞の分化機構を標的とした新しい治療法の開発につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study we examined molecular mechanisms underlying in the differentiation of Hodgkin lymphoma (HL) cells. We found that hydrogen peroxide induces H and RS-like cells in HL cell lines, however this treatment induces cell death in unrelated lymphoid cell lines. Intracellular reactive oxygen species (ROS) of HL cell lines are low in immature cells compared to differentiated cells of HL cell lines. Microarray analyses revealed the enrichment of upregulated genes under hypoxic conditions in the immature cells of HL cell lines. Hypoxia inducible factor (HIF)-1 and its downstream molecule, heme oxygenase-1 (HO-1), a scavenger of ROS was preferentially expressed in the immature cells. HIF-1 and HO-1 inhibited differentiation of HL cell lines. These results indicate that induction of HO-1 via HIF-1 inhibits differentiation of immature HL cells by a reduction of ROS and its breakdown might trigger HL cell differentiation by accumulation of intracellular ROS.

研究分野：血液病理学

キーワード：ホジキンリンパ腫 分化 活性酸素 HIF-1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

古典的 Hodgkin リンパ腫 (HL) は大型の Hodgkin および Reed-Sternberg (H-RS) 細胞を特徴とする。これらの細胞が腫瘍細胞として増殖するという考え方がこれまで一般的に支持されている。その一方、HL 細胞には幹細胞様の小型細胞の集団が存在して中型の細胞を経て H-RS 細胞へと分化していくことが示唆されている。しかしながら HL 細胞の未分化性の維持や分化機構に関する知見は未だない。フローサイトメトリーにより、がん幹細胞の性質を有する分画 side population 分画 (SP) とその他の major population 分画 (MP) を同定、分離することが出来る。我々はこの解析で、HL 細胞株の SP と MP を同定、SP は比較的均一な小型で造血幹細胞様形態を示すこと、一方 MP は中型や大型の H-RS 様細胞からなること、SP から MP が誘導され、HL 細胞の分化のモデルとなることを示した (Cancer Sci. 101(11):2490-6. 2010)

しかしながら、HL 細胞の分化機構に関する知見は未だない。活性酸素は酸化ストレスの原因物質として知られるが、細胞の老化への関与が報告されている。予備実験で「1. 活性酸素を抑制する分子群の小型細胞での発現亢進、2. 活性酸素で小型細胞は H-RS 様細胞へと分化する、3. HL 細胞以外のリンパ系腫瘍細胞は活性酸素で細胞死を起こすこと」を見いだした。これらは HL 細胞での活性酸素を介した特異な分化経路の存在を示唆する。

2. 研究の目的

HL で認められる「幹細胞様の小型細胞集団が存在、中型細胞を経て H-RS 様細胞への分化」がどのような機構により制御されているのかを明らかにすることを目的とする。すなわち HL 細胞の分化機構を、活性酸素抑制に関わる分子群の誘導機構と活性酸素の発生源であるミトコンドリアとのクロストークの視点で解析する。得られた知見をがん治療への応用という方向性で考察する。

3. 研究の方法

(1) 活性酸素による HL 細胞の分化誘導の検討

予備実験で得られた結果を踏まえ、解析する HL 細胞株数を増やして詳細なデータを得る。HL 細胞株 KMH2、L428、L540、HDLM2 を用い、培養液に活性酸素種 (ROS) の一つである過酸化水素 (25 μ M および 50 μ M) を添加して 72 時間培養し、サイトスピンによりスライドグラスの上に固定後、May-Giemsa 染色を行い、細胞の形態変化を顕微鏡にて観察する。過酸化水素の添加濃度、処理時間は最適化する。コントロールとして B 細胞系細胞株 Namalwa、T 細胞系腫瘍株 Jurkat を用い、HL 細胞株に分化が認められる濃度での影響を上記と同じ方法により検討する。ヘキスト (Hoechst33342) 染色を行い、H-RS 細胞に見られる多倍性細胞の増加やアポトーシスに伴う変化などをフローサイトメトリーの DNA ヒストグラム解析で検出する。

(2) HL 細胞株の SP および分化した細胞集団である MP における活性酸素活性の測定

HL 細胞株において、がん幹細胞様未分化分画が濃縮される細胞集団である SP とその他の MP をフローサイトメトリーで同定する系は既に確立している。細胞内の活性酸素活性を検出する General Oxidative Stress Indicator (CM-H2DCFDA) を用いて、上記方法により分離した HL 細胞株 KMH2、L428 の SP と MP における活性酸素活性をフローサイトメトリーで測定する。MTT アッセイなどにより SP、MP の増殖との関係も検討する。

(3) HL 細胞株の SP、その他の細胞集団である MP のミトコンドリア由来活性酸素の測定

ミトコンドリア由来活性酸素を検出する蛍光試薬 MitoTracker Red CM-H₂XRos を用いる。HL 細胞株 KMH2、L428 について、上記方法により分離した SP と MP における活性酸素をフローサイトメトリーにより測定する。さらにソーティングを行い SP と MP についてサイトスピン後、ミトコンドリアの量に差があるか蛍光顕微鏡を用いて観察する。

(4) HL 細胞株の SP と MP で発現している分子のマイクロアレイによる解析とバリデーション
予備実験で、SP では活性酸素を抑制するヘムオキシゲナーゼなどの分子群の発現が亢進、さらに Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を加えると低酸素下で誘導される遺伝子群が MP と比べて亢進していることが見いだされている。フローサイトメトリーにより SP と MP を分離、SP において上昇している分子として同定されているヘムオキシゲナーゼ (HO-1) の発現を定量的 PCR により確認する。HL 細胞株の SP と MP をサイトスピン後、HO-1 に対する抗体を用いた蛍光免疫染色により蛋白レベルでの発現の差を確認する。GSEA で同定された低酸素下で誘導される遺伝子群についても一覧表として整理を行い、後の解析に備える。

(5) HL 細胞 SP で低酸素下で誘導される遺伝子群の発現亢進を制御する分子としての HIF-1 α
すでに実施したアレイ解析の結果にもとづき、SP において上昇している分子として同定されている HO-1、SP における低酸素下で誘導される遺伝子群の発現亢進を制御する分子として HIF-1 α を想定して、これを確認する実験を行う。HL 細胞株 KMH2、L428 を用いてフローサイトメトリーにより SP と MP を分離、ソーティングしてサイトスピン後、HO-1、HIF-1 α に対する抗体を用いた蛍光免疫染色を行う。

(6) HL 細胞株で低酸素状態を模倣したときに HIF-1 α および HO-1 誘導の検討

塩化コバルト (CoCl₂) は HIF-1 α を安定化して低酸素下を模倣する薬剤として知られる。HL 細胞株を CoCl₂ にて処理して回収、ウェスタン法により HIF-1 α とその下流にある HO-1 の誘導を検討する。

(7) HL 細胞株が低酸素状態模倣下では活性酸素による分化誘導に抵抗性であることの検討

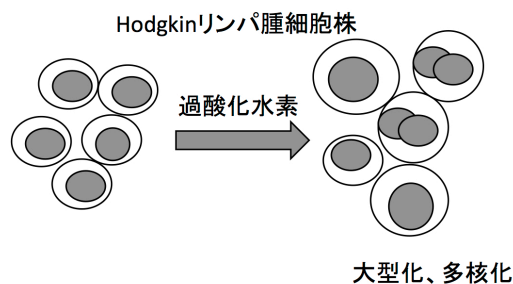
HL 細胞株を CoCl₂ の処理有り無し、過酸化水素による処理有り無しの 4 つの群について、処理後培養を行い、サイトスピンによりスライドガラスの上に固定、May-Giemsa 染色を行い、細胞の形態変化を顕微鏡にて観察する。さらに HO-1 に対する siRNA を用いて HO-1 を発現誘導できないようにした条件、あるいは HO-1 阻害剤 ZnPP 添加で同様の実験を行い、低酸素下を模倣状態での HIF-1 α -HO-1 誘導が活性酸素を抑制、分化抑制に働く可能性を検討する。

4. 研究成果

(1) HL 細胞株は過酸化水素により大型多核化する。

HL 細胞株 (KMH2、L428、L540、HDLM2) に過酸化水素を添加して 72 時間培養したところ、大型化とともに多核の細胞の増加を認めた。一方、HL と無関係な T および B リンパ系細胞株 (Namalwa、Jurkat) ではこのような減少は認めず、むしろ細胞死を示唆する小型化、核の断片化を認めた。さらに HL 細胞株ではフローサイトメトリーによる検討で、細胞の大型化や 2 倍体以上の核型を持つ細胞の増加を求めた。これらのことは活性酸素が HL 細胞の分化を誘導していることを示唆する。さらにこの分化は HL 細胞に特徴的である可能性が示唆された (図 1)。

図 1 過酸化水素による Hodgkin リンパ腫細胞株の分化誘導



(2) HL 細胞株の未分化な集団は分化した集団よりも細胞内活性酸素の量が少ない。

HL 細胞株の未分化な細胞集団の SP は分化した細胞集団である MP より活性酸素量が少ない。HL 細胞株 (KMH2、L428) において分化に伴う細胞内活性酸素の量の変化を、フローサイトメトリーで活性酸素を検出する蛍光試薬 CM-H2DCFDA を用いて測定したところ、SP の活性酸素量は MP とくらべて有意に少なかった。細胞内活性酸素の発生源は主にミトコンドリアであることから、ミトコンドリア由来活性酸素を検出する蛍光試薬 MitoTracker Red CM-H₂XRos を用いて同様に検討した。SP のミトコンドリア由来活性酸素量は MP とくらべて有意に少なかった。

これらの結果は HL 細胞では分化に伴って細胞内活性酸素量が多くなっていることを示唆する。過酸化水素の添加の実験結果と併せて、HL 細胞の分化には細胞内活性酸素量の増加が関与していることが示唆される (図 2)。

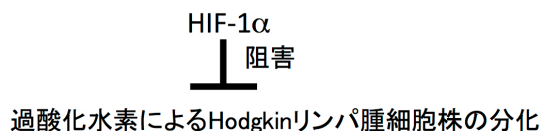
図 2 Hodgkin リンパ腫細胞株の SP、MP 分画における活性酸素量



(3) HL 細胞株の SP では MP よりも HIF-1 α が強く誘導され、その阻害は細胞内活性酸素の増加や分化誘導を引き起こす

GSEA で同定された低酸素下で誘導される遺伝子群について整理を行ったところ、SP では HIF-1 α の結合モチーフを持つ遺伝子群が有意に多く発現していることが示された。HL 細胞株 (KMH2、L428) の SP と MP の比較では、SP で HIF-1 α タンパク質のより強い発現を認めた。これらの発現は小型の細胞により強く認めた。HIF-1 α を安定化する塩化コバルト存在下では HL 細胞株の過酸化水素による大型化、多核化が抑制された (図 3)。

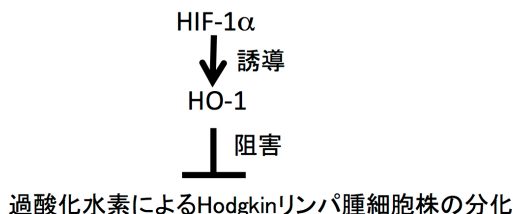
図 3 Hodgkin リンパ腫細胞株の SP では HIF-1 α が高発現し、過酸化水素による分化を阻害する。



(4) HL 細胞株の SP では MP よりも HO-1 が強く誘導され、その阻害は分化誘導や細胞内活性酸素の増加を引き起こす。

HL 細胞株 (KMH2、L540) において HIF-1 α を安定化する塩化コバルト存在下では HO-1 の誘導が増強された。HO-1 の免疫染色を行ったところ、SP では MP よりも HO-1 が強く発現していた。HO-1 の阻害下では HL 細胞株の大型化、多核化が促進された。HO-1 の阻害により細胞内の過酸化水素の増加、SP 分画の相対的増加を認めた (図 4)。

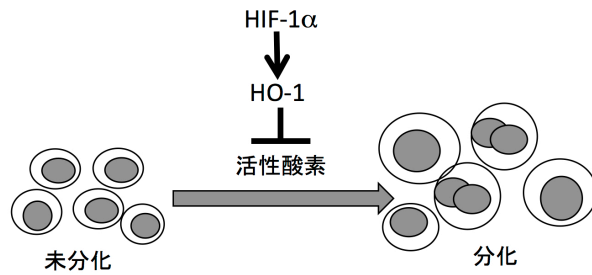
図 4 Hodgkin リンパ腫細胞株の SP では HIF-1 α により HO-1 が誘導され、過酸化水素による分化を阻害する。



まとめ

HL 細胞では未分化な分画で HIF-1 α により HO-1 が誘導され、活性酸素量を抑制することで、分化を抑えている。何らかの理由でこの抑制が弱まると細胞は分化して大型、多核化、H-RS 様細胞が出現してくる (図 5)。この結果は、分化制御に関連する分子を標的とした新規治療法につながる可能性があると考えられた。

図 5 Hodgkin リンパ腫細胞の分化制御機構



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Watanabe M, Sugawara A, Noguchi Y, Hirose T, Omura S, Sunazuka T, Horie R.	4. 巻 178
2. 論文標題 Jietacins, azoxy natural products, as novel NF- B inhibitors: Discovery, synthesis, biological activity, and mode of action.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur J Med Chem.	6. 最初と最後の頁 636-647
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejmech.2019.05.079.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakashima M, Yamochi T, Watanabe M, Uchimar K, Utsunomiya A, Higashihara M, Watanabe T, Horie R.	4. 巻 24
2. 論文標題 CD30 characterizes polylobated lymphocytes and disease progression in HTLV-1-infected individuals.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clin Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 5445-5457
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1078-0432.CCR-18-0268	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Higuchi H, Yamakawa N, Imadome KI, Yahata T, Kotaki R, Ogata J, Kakizaki M, Fujita K, Lu J, Yokoyama K, Okuyama K, Sato A, Takamatsu M, Kurosaki N, Alba SM, Azhim A, Horie R, Watanabe T, Kitamura T, Ando K, Kashiwagi T, Matsui T, Okamoto A, Handa H, Kuroda M, Nakamura N, Kotani A.	4. 巻 131
2. 論文標題 Role of exosomes as a proinflammatory mediator in the development of EBV-associated lymphoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 2552-2567
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/blood-2017-07-794529	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Uojima H, Arase Y, Itokawa N, Atsukawa M, Satoh T, Miyazaki K, Hidaka H, Sung JH, Kako M, Tsuruya K, Kagawa T, Iwakiri K, Horie R, Koizumi W.	4. 巻 24
2. 論文標題 Relationship between response to lusutrombopag and splenic volume.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 World J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 5271-5279
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3748/wjg.v24.i46.5271	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakashima M, Watanabe M, Uchimaru K, Horie R.	4. 巻 110
2. 論文標題 Trogoctyosis of ligand-receptor complex and its intracellular transport in CD30 signalling.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biol Cell.	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 0.1111/boc.201800002.	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7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、渡邊真理子、中野和民、内丸薫、堀江良一
2. 発表標題 活性酸素種によるホジキンリンパ腫細胞の分化とHIF-1 を介したHeme Oxygenase 1による分化制御機構
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島 誠、矢持 忠徳、渡邊 真理子、宇都宮 與、東原 正明、渡邊 俊樹、内丸 薫、堀江 良一
2. 発表標題 CD30陽性HTLV-1感染細胞の特徴とプレントキシマブベドチンの効果について
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中島誠、渡邊真理子、内丸薫、堀江良一
2. 発表標題 トロゴサイトーシスによるCD30 リガンド・レセプター複合体の細胞内移行機構の解析
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中島 誠、矢持 忠徳、渡邊 真理子、宇都宮 與、東原 正明、渡邊 俊樹、内丸 薫、堀江 良一
2. 発表標題 CD30リガンド刺激によるCD30+HTLV-1感染細胞の増殖とプレントキシマブベドチンの効果の解析
3. 学会等名 第5回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第57回日本リンパ網内系学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中島誠、渡邊真理子、内丸薫、堀江良一
2. 発表標題 CD30シグナルにおけるリガンド・レセプター複合体の内在化と細胞内輸送
3. 学会等名 第79回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 渡邊真理子、東原正明、堀江良一
2. 発表標題 古典的Hodgkinリンパ腫におけるCD30を介したHSP90誘導とシグナル伝達制御機構の解析
3. 学会等名 第64回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 新規NF- B阻害剤	発明者 堀江良一他6名	権利者 学校法人北里研究所
産業財産権の種類、番号 特許、W0/2019/059132	取得年 2019年	国内・外国の別 外国

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----