

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07068

研究課題名(和文)リンパ形質細胞性リンパ腫の分化動態に関わる因子の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the factor involved in the dynamic differentiation of lymphoplasmacytic lymphoma

研究代表者

和田 直樹 (WADA, Naoki)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80521731

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：グルタミン(Gln)は細胞増殖だけでなく細胞分化にも重要である。Glnはリンパ球の形質細胞分化に必須だが、Glnがリンパ腫の分化に及ぼす影響についての研究は行われてない。そこで、Glnがリンパ形質細胞性リンパ腫(LPL)の形質細胞分化に及ぼす影響について細胞株を用いて調べた。LPLにおいて、Glnはp38 MAPKを介して形質細胞分化を促進していることが分かった。研究代表者は、LPLにおいて、形質細胞に分化した細胞群がアポトーシスに脆弱なことを既に報告した。これらの知見は、これらだけで根治療法に繋げるのは難しいが、LPLの治療に役立つ可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンパ形質細胞性リンパ腫(LPL)において、グルタミンはp38 MAPKを介して形質細胞分化を促進していることが分かった。研究代表者は、LPLにおいて、形質細胞に分化した細胞群がアポトーシスに脆弱なことを既に報告した。(Lab Invest, 2014)。従って、グルタミンは、LPLにおいて、アポトーシスに脆弱な分化した細胞群の割合を増やす因子であることが分かった。このことは抗腫瘍効果(分化誘導療法など)への活用につながる可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Glutamine (Gln) is important not only for cell proliferation but also for differentiation. Although Gln is essential for plasmacytic differentiation of lymphocytes, no study has been done on the effect of Gln on differentiation of tumor cells, such as lymphoma. Here I examined the effect of Gln on plasmacytic differentiation of lymphoplasmacytic lymphoma (LPL) with its cell line. Gln promoted plasmacytic differentiation of LPL, and p38 MAPK signaling pathway mediated such differentiation. I previously reported that the subpopulation with plasmacytic differentiation was vulnerable to apoptosis in LPL. Although it is difficult to lead these findings to the radical therapy, they might help the treatment of LPL.

研究分野：悪性リンパ腫

キーワード：悪性リンパ腫 リンパ形質細胞性リンパ腫 分化動態 グルタミン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腫瘍は単一クローンで構成されるが、腫瘍の heterogeneity と呼ばれる表現型・性質の多様性をもつ。腫瘍細胞集団の中には腫瘍幹細胞と呼ばれる未熟で多分化能を有するアポトーシス耐性細胞群が存在し、抗がん剤や放射線療法など種々の治療でアポトーシスに脆弱な分化した細胞群を死滅させても、未熟なアポトーシス耐性細胞群が生き残ることによって再発が起こってしまう。従って、腫瘍幹細胞を完全に除去することができれば、再発防止に有用な治療法の開発につながる。腫瘍幹細胞は白血病でまずその存在が報告され、その後、乳癌や前立腺癌、膀胱癌など多くの腫瘍でもその存在が報告されてきた。リンパ腫は白血病と並んで詳細に解析されている血液系腫瘍であるが、腫瘍幹細胞および分化動態に関する解析はほとんど行われていない。その理由として、白血病と異なり固形腫瘍であることによる解析の困難さ以外に、例えば、リンパ腫の中で最も頻度が高いびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫では、B リンパ球マーカーがびまん性陽性となる他に表面マーカーの多彩性は乏しく、腫瘍細胞の形態も大型で比較的揃っているため、腫瘍細胞を分画して解析するのが難しいことが挙げられる。リンパ形質細胞性リンパ腫 (Lymphoplasmacytic lymphoma: LPL) は、B リンパ球と形質細胞の性格を併せ持ち、表面マーカーが比較的多彩なリンパ腫である。従って、LPL で表面マーカーに対する抗体を利用すれば、腫瘍細胞を分画して解析しやすい。研究代表者は、LPL において、B リンパ球と形質細胞の性格を両方持たない未熟な細胞群が少数存在すること、その細胞群は多分化能を有しアポトーシス耐性であること、更に、B リンパ球と形質細胞の性格を両方強く持つ分化した細胞群がアポトーシスに脆弱なことを既に報告した (Lab Invest, 2014)。LPL 細胞集団の heterogeneity に関する特性をふまえ、研究代表者は、LPL 細胞集団をアポトーシスに脆弱な分化した細胞群だけにすれば、抗腫瘍効果を発揮しやすくなると考えた。

2. 研究の目的

LPL 細胞集団のうち未熟なアポトーシス耐性細胞群およびアポトーシスに脆弱な分化した細胞群に関して、前者の細胞群を無くし、後者の細胞群への分化を促進する因子は何か探索を試みた。グルタミンは細胞増殖だけでなく細胞分化にも重要な役割を果たしている。グルタミンはリンパ球の分化に重要な役割を果たしているが、リンパ腫の分化に対してグルタミンが及ぼす効果については知見が乏しい。LPL は形質細胞分化を伴う B 細胞性リンパ腫で、B リンパ球と形質細胞の性格を併せ持つので、リンパ腫の分化について検討しやすい腫瘍である。そこで、LPL の細胞株を用いて、リンパ腫の分化に対してグルタミンが及ぼす効果を調べた。もし、グルタミンが LPL の分化促進因子であれば、LPL 細胞集団をアポトーシスに脆弱な細胞群に分化させ、抗腫瘍効果を発揮しやすくさせる候補因子になると考えた。

3. 研究の方法

(1) グルタミン 0, 0.5, 1, 2, 3 or 4mM で MWCL-1 [LPL の細胞株] を培養し、各々の細胞数を計測する。

(2) グルタミン 0, 0.5, 1, 2, 3 or 4mM で MWCL-1 を 48 時間培養し、各々の CD138 陽性割合をフローサイトメトリーで調べる。

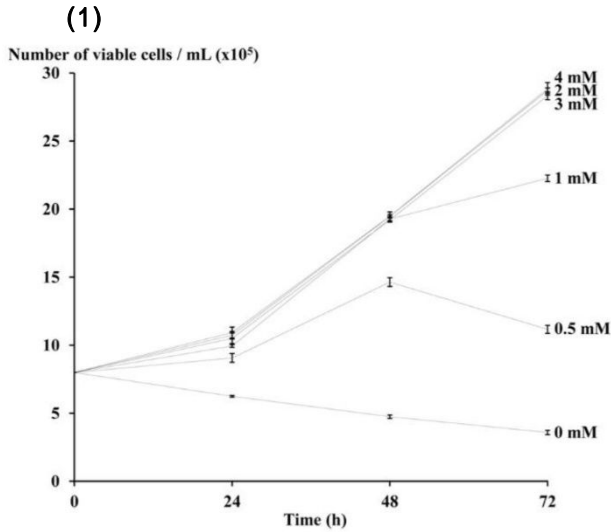
(3) MWCL-1 を CD138(-)MWCL-1 と CD138(+)MWCL-1 に単離する。グルタミン 2mM で CD138(-)MWCL-1 と CD138(+)MWCL-1 を 48 時間培養し、各々の CD138 陽性割合をフローサイトメトリーで調べる。

(4) SB203580 [p38 MAPK inhibitor], rapamycin [mTORC1 inhibitor], PD98059 [MEK inhibitor], SP600125 [JNK inhibitor] を加えてグルタミン 2mM で MWCL-1 を 48 時間培養し、各々の CD138 陽性割合をフローサイトメトリーで調べる。

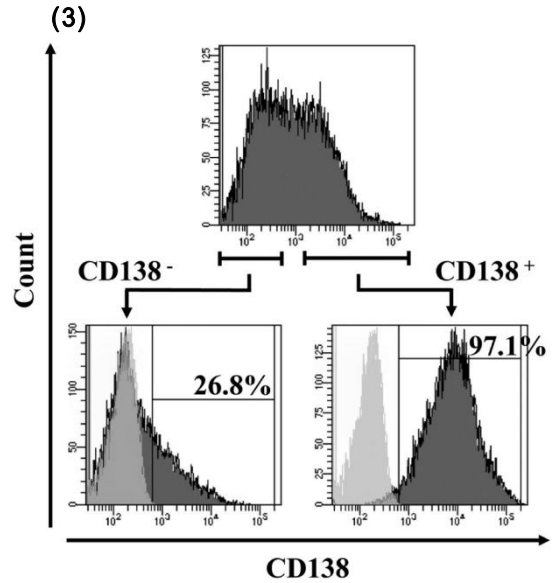
(5) グルタミン 0 or 2mM で MWCL-1 を 36 時間培養し、各々の p38 MAPK リン酸化についてイムノプロットングで調べる。

(6) MWCL-1 を CD138(-)MWCL-1 と CD138(+)MWCL-1 に単離し、各々の p38 MAPK リン酸化についてイムノプロットングで調べる。

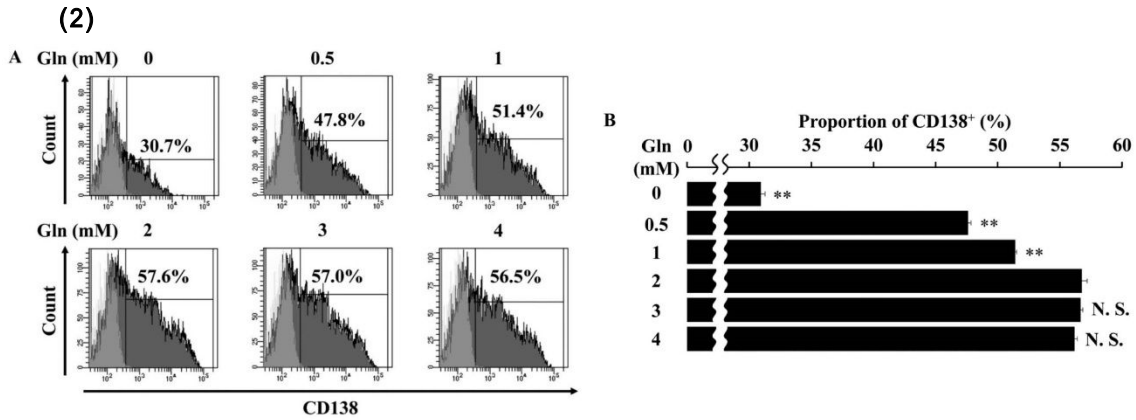
4. 研究成果



Each value was shown as the mean \pm SE of three experiments. The number in 2mM of Gln was higher than that in 0, 0.5 or 1mM of Gln, and was similar to that in 3 or 4mM of Gln when cultured for 72h.



Histogram displaying flow cytometric data with anti-CD138 antibody. The proportion values of number of CD138(+) cells were shown. The gray area was correspond to isotype control of sorted CD138(-) cells cultured for 48h in 2mM of Gln. Several CD138(-) cells differentiated into CD138(+) cells.

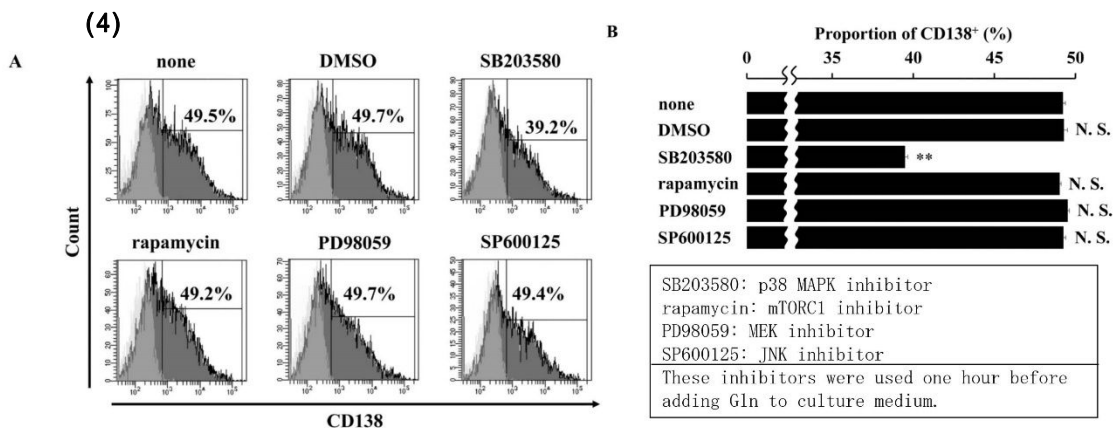


(A) Histogram displaying flow cytometric data with anti-CD138 antibody. The proportion values of number of CD138(+) cells were shown. The gray areas were correspond to isotype controls.

(B) Bar graphs showing the proportion of CD138(+) cells.

** $p < 0.01$ when compared to 2mM of Gln.

N. S. $p > 0.05$ when compared to 2mM of Gln.

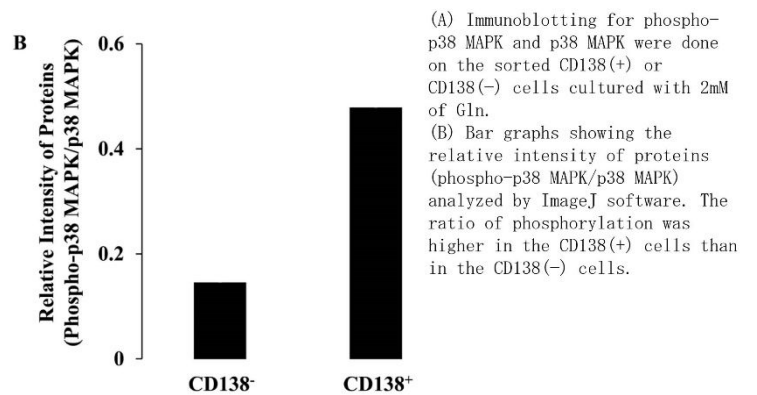
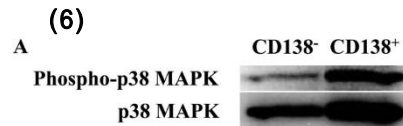
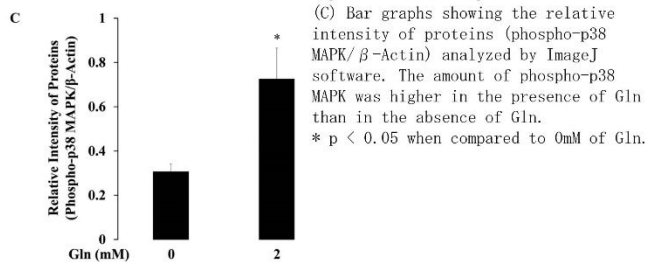
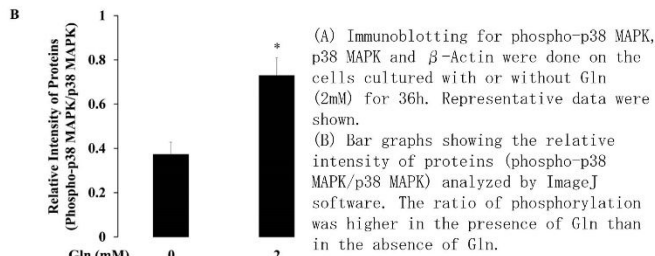
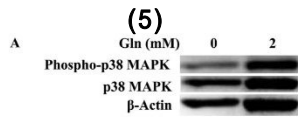


(A) Histogram displaying flow cytometric data with anti-CD138 antibody. The proportion values of number of CD138(+) cells were shown. The gray areas were correspond to isotype controls. (B) Bar graphs showing the proportion of CD138(+) cells. DMSO was solvent for inhibitors.

N. S. $p > 0.05$ when compared to none (no inhibitors).

** $p < 0.01$ when compared to none (no inhibitors).

SB203580: p38 MAPK inhibitor
 rapamycin: mTORC1 inhibitor
 PD98059: MEK inhibitor
 SP600125: JNK inhibitor
 These inhibitors were used one hour before adding Gln to culture medium.



(1) 72 時間後、グルタミン 2mM で培養した細胞数は、グルタミン 0, 0.5 or 1mM で培養した細胞数より多かった。グルタミン 2mM で培養した細胞数とグルタミン 3 or 4mM で培養した細胞数はほぼ変わらなかった。

(2) グルタミン 2mM で培養した細胞の CD138 陽性割合は、グルタミン 0, 0.5 or 1mM で培養した細胞の CD138 陽性割合より多かった。グルタミン 2mM で培養した細胞の CD138 陽性割合とグルタミン 3 or 4mM で培養した細胞の CD138 陽性割合はほぼ変わらなかった。

(3) グルタミン 2mM で CD138(-)MWCL-1 を 48 時間培養した結果、CD138(-)から CD138(+)へ分化する細胞の存在が確認された。

(4) SB203580 [p38 MAPK inhibitor] を加えてグルタミン 2mM で培養した細胞の CD138 陽性割合は、rapamycin [mTORC1 inhibitor], PD98059 [MEK inhibitor], SP600125 [JNK inhibitor] を加えてグルタミン 2mM で培養した細胞の CD138 陽性割合より低かった。

(5) グルタミン 2mM で培養した細胞の p38 MAPK リン酸化タンパク発現レベルは、グルタミン 0mM で培養した細胞の p38 MAPK リン酸化タンパク発現レベルより高かった。

(6) MWCL-1 を CD138(-)MWCL-1 と CD138(+)MWCL-1 に単離すると、p38 MAPK リン酸化タンパク発現レベルに関して、CD138(+)MWCL-1 のほうが CD138(-)MWCL-1 より高かった。

LPL において、グルタミンは p38 MAPK を介して形質細胞分化を促進していることが分かった。研究代表者は、LPL において、B リンパ球と形質細胞の性格を両方持たない未熟な細胞群が少数存在すること、その細胞群は多分化能を有しアポトーシス耐性であること、更に、B リンパ球と形質細胞の性格を両方強く持つ分化した細胞群がアポトーシスに脆弱なことを既に報告した (Lab Invest, 2014)。従って、グルタミンは、未熟なアポトーシス耐性細胞群の割合を減らし、アポトーシスに脆弱な分化した細胞群の割合を増やす因子であることが分かった。このことは抗腫瘍効果 (分化誘導療法など) への活用につながる可能性があると考えられる。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Wada N, Nojima S, Tahara SI, Ohshima K, Kurashige M, Kawasaki K, Tone M, Kusumoto S, Ikeda JI, Morii E.	4. 巻 214
2. 論文標題 Effect of glutamine on lymphoplasmacytic lymphoma, especially on the viewpoint of the differentiation into vulnerable subpopulation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pathol Res Pract	6. 最初と最後の頁 1667-1674
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.prp.2018.08.019.	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 和田直樹, 大畑麻衣, 田中さやか, 桑江優子, 大澤政彦, 森井英一
2. 発表標題 リンパ形質細胞性リンパ腫の分化に対してグルタミンが及ぼす効果について
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

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

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
---------	---------