

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16566

研究課題名(和文) ADAM10に着目したHodgkinリンパ腫の癌微小環境解析

研究課題名(英文) ADAM10 related tumor microenvironment in Hodgkin lymphoma

研究代表者

増田 渉 (Wataru, Masuda)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：00623464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Hodgkinリンパ腫におけるADAM10の機能を解明するため、培養細胞株にADAM10阻害剤を投与した。細胞同士が固着して大型集塊となるhomotypic cell aggregationを認めた。ADAM10阻害剤投与群と非投与群からRNAを抽出し、マイクロアレイ解析でADAM10阻害剤により発現変化した遺伝子を得た。この分子を元にHodgkinリンパ腫患者の腫瘍組織で免疫組織学的解析を行い、臨床的特徴と共に解析したところ、2つの予後良好因子(腫瘍細胞におけるCXCR5発現低下と非腫瘍細胞におけるMHC class 発現)を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

a disintegrin and metalloproteinases 10 (ADAM10)は、HRS細胞の生存に必要なNotchシグナルを調節する機能の他に、CD30や複数のサイトカインの分泌調整を行うproteinaseの一種である。本研究はHodgkinリンパ腫がADAM10とその基質分子を介して構築する癌微小環境における分子機構の解明で、近年の癌微小環境を標的とした分子標的療法や免疫チェックポイント阻害剤の進歩に貢献する可能性がある。Hodgkinリンパ腫はAYA世代に発生する稀少癌で、治療上の社会的意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：The aim of the study is to clarify the function of a disintegrin and metalloproteinases 10 (ADAM10) on tumor microenvironment in Hodgkin lymphoma. We found that Hodgkin lymphoma cell line L-428 caused homotypic cell aggregation due to ADAM10 selective inhibitor (GI254023X). We extracted RNA from both L-428 cell line with or without the inhibitor and RNA microarray analysis revealed the alteration in gene expression related to ADAM10. We focused on cytokines and immune markers among these genes and analyzed immunohistochemical study using patient tumor tissue. We found that two types of favorable prognosis marker; loss of CXCR5 on Hodgkin/Reed-Sternberg (HRS) cells and expression of MHC class on non-tumor cells around HRS cells.

研究分野：病理学

キーワード：Hodgkinリンパ腫 癌微小環境 ADAM10

### 1. 研究開始当初の背景

**Hodgkin** リンパ腫は、**Hodgkin/Reed-Sternberg (HRS)**細胞と呼称される大型の腫瘍細胞が、多数の非腫瘍細胞を背景に増殖する悪性リンパ腫の一亜型である<sup>1)</sup>。従来の化学療法は腫瘍細胞を標的とした抗腫瘍効果を目的としていたが、近年登場した免疫チェックポイント阻害剤は非腫瘍細胞を標的に、これまでにない優れた治療効果と有効性を示している<sup>2)</sup>。本研究は、**Hodgkin** リンパ腫における癌微小環境の分子機構の一端を解明することを目的として着想した。

### 2. 研究の目的

**Hodgkin** リンパ腫が構築する癌微小環境の分子機構を解明し、近年著しい進歩を遂げている分子標的療法や免疫チェックポイント阻害剤による治療学の進歩に貢献することである。そのため、**Hodgkin** リンパ腫で腫瘍細胞の生存に必須とされる **Notch** シグナルとその調節分子である **a disintegrin and metalloproteinases 10 (ADAM10)**に着目した<sup>3), 4)</sup>。**ADAM10**は、形質膜表面で **Notch** シグナルを律速的に調節する **proteinase** の一種である<sup>4)</sup>。**ADAM10**の基質分子は **Notch** の他に **CD30** や複数のサイトカインが知られている。特に **CD30** は **Hodgkin** リンパ腫の病理診断で最も重要な分子であり、**Hodgkin** リンパ腫の形質膜表面では **ADAM10** が **CD30** 分子を切断し、切断された **CD30** 分子は周囲の非腫瘍細胞の形質膜表面で **CD30 ligand** と結合して非腫瘍細胞内に取り込まれる<sup>5)</sup>。**ADAM10** が構築する **Hodgkin** リンパ腫の癌微小環境の特徴を解明したいと考え、以下の研究を行った。

### 3. 研究の方法

**Hodgkin** リンパ腫の培養細胞を用いた実験的研究と、その結果を基にしてヒト組織を用いた臨床病理学的解析を行った。

#### 1: 培養細胞株を用いた研究

**Hodgkin** リンパ腫の培養細胞株(**L-428, KMH2, L-540, HDLM2**)に **ADAM10** 選択的阻害剤 (**GI254023X, 10 μM**)を投与して、経時的に観察した。**24** 時間程度で細胞同士が固着性に集簇する **homotypic cell aggregation** を認めた(図 1)。この現象は **48** 時間から **72** 時間でも持続していた。固着性集塊は **L-428** でのみ認められ、他の細胞株(**KMH2, L-540, HDLM2**)では見られなかった。**ADAM10** 選択的阻害剤を投与した細胞群と非投与群から **RNA** を抽出し、**RNA** マイクロアレイ解析から発現変化した遺伝子群を得た(図 2)。

#### 2: ヒト組織を用いた臨床病理学的解析

上記で得られた遺伝子群のうち、細胞運動に関するサイトカイン(**CXCR5, CXCL13**)と免疫関連分子(**MHC class II**)に着目し、ヒト腫瘍組織で免疫組織学的に解析した(図 3)。**HRS** 細胞における **CXCR5** 発現の消失と非腫瘍細胞における **MHC class II** 発現が予後良好因子と考えられた(図 4-1, 図 4-2)。

表 1 は **Hodgkin** リンパ腫患者 **41** 例について年齢、性別、治療薬の種類、生存期間などを示す。

図 1. **Hodgkin** リンパ腫細胞株の固着性集塊

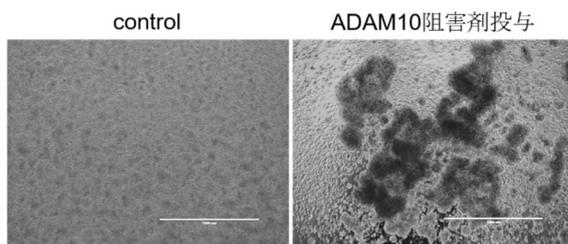


図 2. **RNA** マイクロアレイ解析

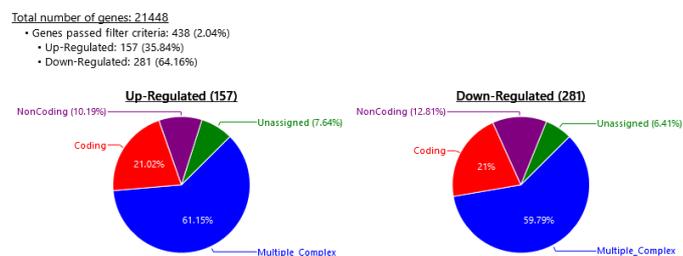


図 3. 代表的な症例の病理組織像と免疫形質発現

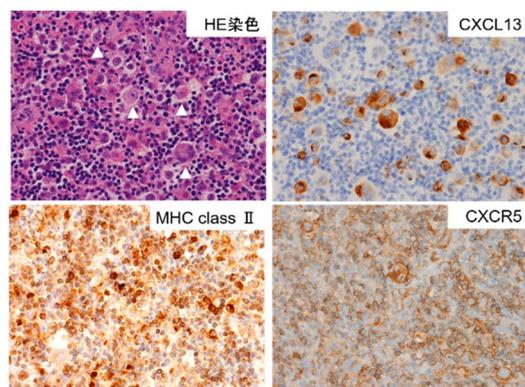


図 4-1. **CXCR5** 発現による予後解析

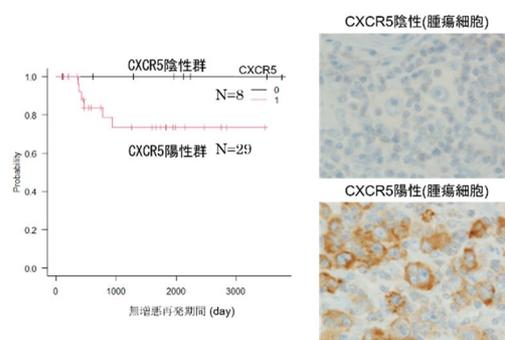
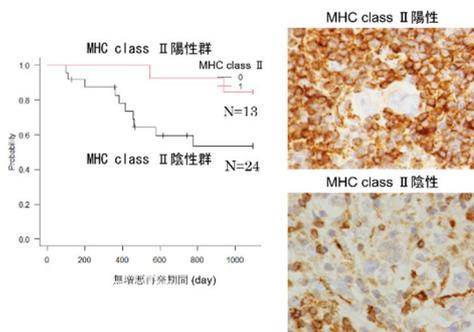


図 4-2. MHC class II 発現による予後解析 表 1. Hodgkin リンパ腫患者の臨床病理学的特徴



年齢	16.8-70.2 歳(median 44.1)
性別	19/21 (男性/女性)
Stage I/II/III/IV	2/19/8/10
化学療法とその回数	ABVD 1-8 (中央値6) MOPP 0-5 (中央値0)
自家末梢血幹細胞移植	2例
生存例・死亡例	生存32例・死亡9例
再発・難治例	再発8例・難治6例
無増悪生存期間	98-3774 days (中央値1291)

#### 4. 研究成果

得られた研究結果を図 1-4 として示す。

図 1 は Hodgkin リンパ腫培養細胞株から得た画像で、腫瘍細胞同士が固着性に集簇する **homotypic cell aggregation** と呼ばれる現象である。そして、図 2 はこの細胞株から抽出した RNA を用いた RNA マイクロアレイ解析結果で、ADAM10 阻害剤投与により発現増加した遺伝子 157 個、発現低下した遺伝子は 281 個であった。これらの遺伝子から、細胞運動に関するサイトカイン(CXCL13, CXCR5)と免疫関連分子(MHC class II)を元にヒト腫瘍組織の免疫組織化学を行った。腫瘍細胞である HRS 細胞における CXCR5 発現の消失と非腫瘍細胞における MHC class II 発現が患者の予後に関連した。しかし、HRS 細胞における ADAM10 の発現はほとんどみられず、免疫組織化学において予後因子と ADAM10 の発現相関はみられなかった。

#### 考察

Hodgkin リンパ腫が他の悪性腫瘍と組織学的に異なる点は、腫瘍組織中の腫瘍細胞が少数で、腫瘍組織内には大多数の非腫瘍細胞が存在する点である<sup>1)</sup>。すなわち、少数の HRS 細胞が多数の非腫瘍細胞と生存する特異な免疫環境が存在していると推測される。この特異な癌微小環境に関する ADAM10 の機能を解析したところ、従来の化学療法を施行された患者群において、予後良好因子として腫瘍細胞の CXCR5 の発現低下と非腫瘍細胞における MHC class II 発現を認めた。CXCR5 はケモカイン CXCL13 の受容体分子で、B リンパ球の運動能やリンパ節への homing に関連している<sup>6)</sup>。HRS 細胞における CXCR5 の発現低下は CXCL13-CXCR5 シグナル低下の可能性があり、このシグナルに関連した細胞運動能の低下の可能性が推測される。一方、本研究では幾つかの症例で HRS 細胞に CXCL13 発現がみられたが、CXCL13 発現と CXCR5 発現の相関は明らかではなかった。また、MHC class II は B リンパ球の活性化や B リンパ球-T リンパ球間の相互作用、免疫応答に関連している<sup>7)</sup>。MHC class II 分子を発現する非腫瘍細胞の存在は、癌微小環境において HRS 細胞に対する抗腫瘍効果の存在が示唆される。本研究は ADAM10 に関連したサイトカインと免疫関連分子が Hodgkin リンパ腫の予後に関連していたが、これらの分子と ADAM10 について免疫組織学的な関連は明らかではなかった。

#### 参考文献

- 1: WHO 分類改訂第 4 版による白血病・リンパ系腫瘍の病態学, 中外医学社, ホジキンリンパ腫, p469 - 84.
- 2: Bagchi S, Yuan R, Engleman EG. Immune Checkpoint Inhibitors for the Treatment of Cancer: Clinical Impact and Mechanisms of Response and Resistance. *Annu Rev Pathol.* 2021 Jan 24; 16:223-249.
- 3: Schwarzer R, Dörken B, Jundt F. Notch is an essential upstream regulator of NF-κB and is relevant for survival of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Leukemia.* 2012 Apr;26(4):806-13.
- 4: Smith TM Jr, Tharakan A, Martin RK. Targeting ADAM10 in Cancer and Autoimmunity. *Front Immunol.* 2020 Mar 24; 11:499.
- 5: Eichenauer DA, Simhadri VL, von Strandmann EP, et al. ADAM10 inhibition of human CD30 shedding increases specificity of targeted immunotherapy in vitro. *Cancer Res.* 2007 Jan 1;67(1):332-8.
- 6: Hsieh CH, Jian CZ, Lin LI, et al. Potential Role of CXCL13/CXCR5 Signaling in Immune Checkpoint Inhibitor Treatment in Cancer. *Cancers (Basel).* 2022 Jan 7;14(2):294.
- 7: Katikaneni DS, Jin L. B cell MHC class II signaling: A story of life and death. *Hum Immunol.* 2019 Jan;80(1):37-43.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 増田 渉, 東守洋, 沢田圭佑, 菊地淳, 川野竜太郎, 百瀬修二, 渡邊俊樹, 田丸淳一
2. 発表標題 ADAM10阻害下におけるHodgkinリンパ腫細胞株の細胞接着集塊形成
3. 学会等名 第59回リンパ網内系学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 飛内 賢正、木下 朝博、塚崎 邦弘、永井 宏和、山口 素子、丸山 大	4. 発行年 2020年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 406
3. 書名 悪性リンパ腫治療マニュアル（改訂第5版）	

1. 著者名 佐藤康晴、竹内賢吾	4. 発行年 2023年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 292
3. 書名 リンパ組織（非腫瘍性疾患病理アトラス）	

〔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
---------	---------