

令和 4 年 5 月 6 日現在

機関番号：83904

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17854

研究課題名（和文）B細胞性腫瘍における解糖系亢進の新規機序の解明と治療標的としての有用性の検証

研究課題名（英文）Exploration of a novel mechanism of glycolysis enhancement in B-cell tumors and investigation of its usefulness as a therapeutic target

研究代表者

今橋 伸彦（Imahashi, Nobuhiko）

独立行政法人国立病院機構（名古屋医療センター臨床研究センター）・その他部局等・血液内科医師

研究者番号：90726861

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、B細胞性腫瘍の代謝がT細胞により活性化され、そのことによりB細胞性腫瘍の治療抵抗性がもたらされている可能性を検討した。慢性リンパ性白血病細胞において、T細胞により腫瘍の解糖系が亢進されること、並びに、T細胞により腫瘍の生存が支持されることが示唆された。しかし、T細胞による腫瘍の解糖系亢進が、T細胞による腫瘍の生存促進に關与している可能性は否定的であった。その他のB細胞性腫瘍では、T細胞による腫瘍細胞の解糖系亢進効果は明らかではなかったが、多発性骨髄腫細胞の生存がT細胞により支持されることが示唆された。これらの知見から、B細胞性腫瘍に対する、新規治療が開発されることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

B細胞性腫瘍の解糖系亢進が、B細胞性腫瘍の治療成績低下の一因になっていることが明らかになっている。これまでの研究では、B細胞性腫瘍の解糖系が亢進する機序としては、癌関連遺伝子の異常などが報告されているが、本研究では、B細胞性腫瘍の代謝がT細胞により活性化されるという全く新しい仮説を検証し、慢性リンパ性白血病において、その可能性があることを明らかにした。また、多発性骨髄腫の生存がT細胞により支持されていることを示唆する知見もえられた。これらの知見は、B細胞性腫瘍に対する新規治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the possibility that the metabolism of B-cell malignancies is activated by T cells, which leads to the treatment resistance of B-cell malignancies. The results of glucose uptake assay suggested that glycolysis of chronic lymphocytic leukemia cells is activated by T cells. Moreover, survival of chronic lymphocytic leukemia cells was supported by T cells. However, the increased glycolytic activity of chronic lymphocytic leukemia cells by T cells was unlikely to be involved in the enhanced survival of leukemia cells. We did not observe a clear increase in glucose uptake by T cells in other B-cell tumors. However, we found that survival of myeloma cell lines was supported by T cells. These results may pave a way to development of novel therapy for B-cell tumors.

研究分野：B細胞性腫瘍

キーワード：B細胞性腫瘍 代謝

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

B細胞性腫瘍の治療成績が未だに不十分である。最近、腫瘍の代謝が抗腫瘍免疫に与える影響が注目されており、解糖系が亢進した腫瘍は、グルコース消費/乳酸産生により、抗腫瘍免疫を抑制することが報告されている (Cell Metab. 2016;24:657-71.)。また、解糖系亢進が腫瘍の抗癌剤抵抗性に寄与することも報告されている (Cancer Res. 2015;75:2071-82.)。このように、B細胞性腫瘍の解糖系亢進は、B細胞性腫瘍の治療成績低下の一因となっている。

B細胞は、T細胞により活性化され、活性化されたB細胞は、解糖系が亢進している。B細胞性腫瘍は、正常B細胞の形質を部分的に保有しているため、同様のことがB細胞性腫瘍とT細胞との間でも起こりうる。すなわち、B細胞性腫瘍の解糖系がT細胞により亢進されることで、

B細胞性腫瘍の生存が支持される可能性、B細胞性腫瘍の抗癌剤感受性が低下する可能性、B細胞性腫瘍のグルコース消費/乳酸産生が増加し、T細胞の機能低下がもたらされる可能性、が考えられる。しかしながら、これらの可能性についてはこれまで十分に検討されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では以下の3点を明らかにすることを目的とした。

T細胞が、B細胞性腫瘍の解糖系に与える影響

T細胞によるB細胞性腫瘍の解糖系亢進が、B細胞性腫瘍の生存および抗癌剤感受性に与える影響

T細胞によるB細胞性腫瘍の解糖系亢進が、T細胞の機能に与える影響

### 3. 研究の方法

#### (1) T細胞の分離

健常人より採取した末梢血単核球より、磁気ビーズを用いて、positive selectionで、CD4陽性T細胞またはCD3陽性T細胞を分離した。

#### (2) Glucose uptake assay

T細胞とB細胞性腫瘍とを48-72時間培養したのちに、両細胞を2-NBDG存在下で37度/15分間インキュベートし、2-NBDGの取り込みを、フローサイトメトリーで評価した。T細胞とB細胞性腫瘍との区別は、蛍光色素標識CD4抗体を用いて行った。これにより、B細胞性腫瘍の解糖系の程度を評価した。

#### (3) viabilityの評価

B細胞性腫瘍を、種々の条件で48-72時間培養したのちに、viability dyeで染色し、フローサイトメトリーを用いてviabilityを測定した。B細胞性腫瘍の細胞株は、CFSEで染色することにより、共培養したT細胞と区別した。一部の実験では、無血清培地や抗癌剤ibrutinib、melphalan、bortezomibなど、2-Deoxy-D-glucose (2-DG)を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) T細胞がB細胞性腫瘍の解糖系に与える影響

B細胞性腫瘍の解糖系が、T細胞により亢進されるか否かを検討するために、慢性リンパ性白血病細胞と健常人のT細胞とを共培養した後に、glucose uptake assayにより、慢性リンパ性白血病細胞のグルコースの取り込み能を検討した。その結果、T細胞との共培養により、慢性リンパ性白血病細胞のグルコースの取り込み能が上昇することが示唆された (図1)。その他、複数のB細胞性腫瘍の細胞株を用いて、同様の検討を行ったが、一定した結果は得られなかった。これらのことから、腫瘍の種類によっては、T細胞によりB細胞性腫瘍の解糖系が亢進されることが示唆された。

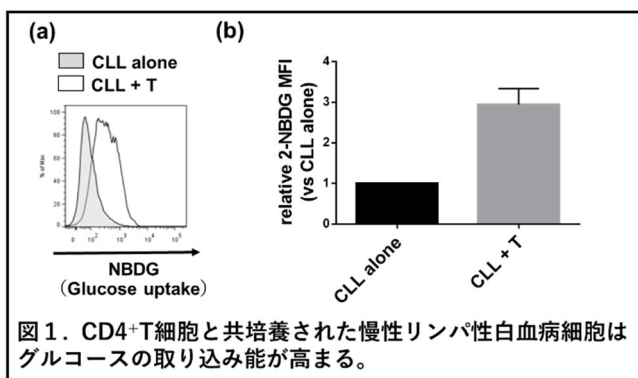


図1. CD4<sup>+</sup>T細胞と共培養された慢性リンパ性白血病細胞はグルコースの取り込み能が高まる。

#### (2) 慢性リンパ性白血病における検討

慢性リンパ性白血病の解糖系がT細胞により亢進される可能性が明らかになったため、次に、慢性リンパ性白血病細胞の生存がT細胞により支持されるか否かを検討した。その結果、既報の通り、慢性リンパ性白血病の生存率低下は、T細胞との共培養により抑制されることが示唆された (図2)。さらに、慢性リンパ性白血病細胞の抗癌剤感受性は、T細胞との共培養により低下

することも示唆された(図2)。以上のことより、慢性リンパ性白血病細胞の解糖系は、T細胞により亢進されること、慢性リンパ性白血病細胞の生存は、T細胞により支持されること、が示唆された。そこで次に、実際に、T細胞による慢性リンパ性白血病細胞の生存支持効果に、解糖系亢進が関与しているか否かを検討した。慢性リンパ性白血病細胞を解糖系阻害剤である2-Deoxy-D-glucose(2-DG)で前処理した後に、T細胞と共培養し、ibrutinibへの感受性を評価した。しかしながら、解糖系を阻害しても慢性リンパ性白血病細胞はT細胞存在下では、ibrutinibへの感受性が低下したままであった。従って、T細胞による慢性リンパ性白血病細胞の生存支持効果に、解糖系亢進が関与している可能性は否定的であった。

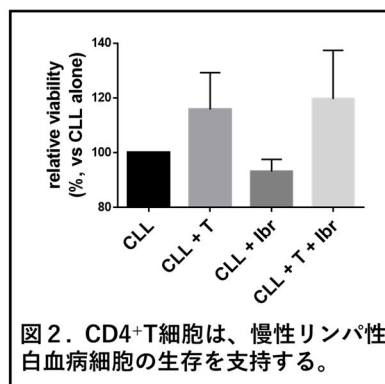


図2. CD4<sup>+</sup>T細胞は、慢性リンパ性白血病細胞の生存を支持する。

### (3) 多発性骨髄腫における検討

多発性骨髄腫は、同種造血幹細胞移植を行っても、再発率が高く、graft-versus-tumor効果が弱いことが示唆される。その原因として、T細胞が、多発性骨髄腫の生存を支持している可能性を考えた。そこで、in vitroにおいて、多発性骨髄腫細胞の生存がT細胞により支持されるか否かを検討した。多発性骨髄腫の複数の細胞株を健常人のT細胞と無血清培地で共培養したところ、多発性骨髄腫の生存率低下はT細胞との共培養により抑制されることが明らかになった(図3)。次に、T細胞による多発性骨髄腫の生存支持効果に関与する分子を同定するために、T細胞による多発性骨髄腫細胞の生存支持効果が、blocking抗体により減弱するか否かを検討した。その結果、多発性骨髄腫上の接着分子が、T細胞による多発性骨髄腫の生存支持に関与している可能性が示唆された。今後、その接着分子のligandへのblocking抗体を用いてこの結果を確認する予定である。また、T細胞が多発性骨髄腫の抗癌剤感受性に与える影響についても検討を開始している。

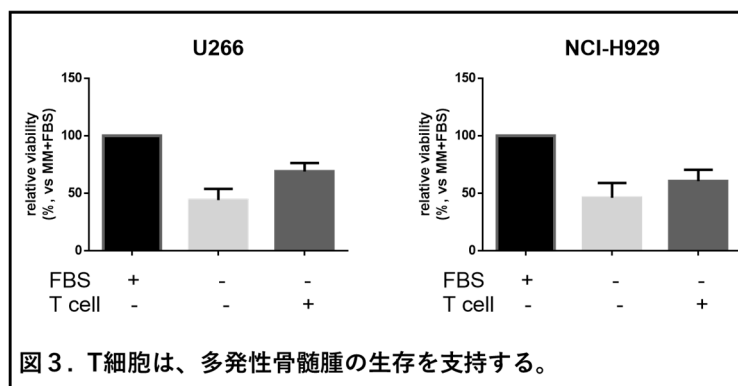


図3. T細胞は、多発性骨髄腫の生存を支持する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Matsuoka K, Imahashi N, Ohno M, Ode H, Nakata Y, Kubota M, Sugimoto A, Imahashi M, Yokomaku Y, Iwatani Y	4. 巻 298
2. 論文標題 SARS-CoV-2 accessory protein ORF8 is secreted extracellularly as a glycoprotein homodimer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101724 ~ 101724
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.101724	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 -
1. 著者名 Imahashi N, Terakura S, Kondo E, Kato K, Kim SW, Shinohara A, Watanabe M, Fukuda T, Uchida N, Kobayashi H, Ishikawa J, Kataoka K, Shiratori S, Ikeda T, Matsuoka K, Yoshida S, Kondo T, Kimura T, Onizuka M, Ichinohe T, Atsuta Y, Kanda J	4. 巻 57
2. 論文標題 Impact of donor types on reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplant for mature lymphoid malignancies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bone Marrow Transplantation	6. 最初と最後の頁 243 ~ 251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41409-021-01525-1	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 Shaim H, Shanley M, Basar R, Daher M, Gumin J, Zamler D, Uprety N, Wang F, Huang Y, Gabrusiewicz K, Miao Q, Dou J, Alsuliman A, Kerbauy L, Acharya S, Mohanty V, Mendt M, Li S, Lu J, Wei J, Fowlkes N, Gokdemir E, Ensley E, Kaplan M, Kassab C, Li L, Ozcan G, Banerjee P, Imahashi N, et al.	4. 巻 131
2. 論文標題 Targeting the $\alpha$ v integrin/TGF- $\beta$ axis improves natural killer cell function against glioblastoma stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI142116	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 該当する
1. 著者名 Daher M, Basar R, Gokdemir E, Baran N, Uprety N, Nunez Cortes A, Mendt M, Kerbauy L, Banerjee P, Shanley M, Imahashi N, et al.	4. 巻 137
2. 論文標題 Targeting a cytokine checkpoint enhances the fitness of armored cord blood CAR-NK cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 624 ~ 636
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2020007748	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 該当する

1. 著者名 Imahashi N, Arakawa M, Iwakoshi A, Mori M, Nagai H, Iida H	4. 巻 -
2. 論文標題 Oral Kaposi sarcoma following cord blood transplantation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eJHaem	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Imahashi Nobuhiko, Terakura Seitaro, Kondo Eisei, Kako Shinichi, Uchida Naoyuki, Kobayashi Hikaru, Inamoto Yoshihiro, Sakai Hitoshi, Tanaka Masatsugu, Ishikawa Jun, Kozai Yasuji, Matsuoka Ken-ichi, Kimura Takafumi, Fukuda Takahiro, Atsuta Yoshiko, Kanda Junya	4. 巻 55
2. 論文標題 Comparison of reduced-intensity/toxicity conditioning regimens for umbilical cord blood transplantation for lymphoid malignancies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone Marrow Transplantation	6. 最初と最後の頁 2098 ~ 2108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41409-020-0905-6	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 Yamasaki Satoshi, Mori Jinichi, Kanda Junya, Imahashi Nobuhiko, Uchida Naoyuki, Doki Noriko, Tanaka Masatsugu, Katayama Yuta, Eto Tetsuya, Ozawa Yukiyasu, Takada Satoru, Onizuka Makoto, Hino Masayuki, Kanda Yoshinobu, Fukuda Takahiro, Atsuta Yoshiko, Yanada Masamitsu	4. 巻 99
2. 論文標題 Effect of allogeneic HCT from unrelated donors in AML patients with intermediate- or poor-risk cytogenetics: a retrospective study from the Japanese Society for HCT	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Hematology	6. 最初と最後の頁 2927 ~ 2937
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00277-020-04261-6	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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 今橋 伸彦、寺倉 精太郎、近藤 英生、加藤 光次、金 成元、篠原 明仁、渡邊 瑞希、福田 隆浩、内田 直之、小林 光、石川 淳、片岡 圭亮、荒 隆英、池田 宇次、松岡 賢市、吉田 周郎、近藤 忠一、木村 貴文、鬼塚 真仁、一戸 辰夫、熱田 由子、諫田 淳也
2. 発表標題 成熟リンパ系腫瘍に対する、強度減弱前処置を用いた同種造血幹細胞移植におけるドナーの比較
3. 学会等名 第44回日本造血・免疫細胞療法学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松岡和弘, 今橋伸彦, 中田佳宏, 大野美希, 久保田舞, 大出裕高, 横幕能行, 岩谷靖雅
2. 発表標題 SARS-CoV-2 ORF8は二量体糖タンパク質として細胞外に分泌される
3. 学会等名 第68回 日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今橋伸彦, 寺倉精太郎, 近藤英生, 賀古真一, 内田直之, 小林光, 稲本賢弘, 酒井均, 田中正嗣, 石川淳, 香西康司, 松岡賢市, 木村貴文, 福田隆浩, 熱田由子, 諫田淳也
2. 発表標題 Comparison of reduced-intensity/toxicity conditioning regimens for UCBT for lymphoid malignancies
3. 学会等名 第82回日本血液学会
4. 発表年 2020年～2021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
---------	---------