

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08673

研究課題名(和文) 単一細胞解析での分裂期促進因子 PLK1 発現異常による皮膚 T 細胞腫瘍進展機構の解明

研究課題名(英文) The role of PLK1 in refractory cutaneous T-cell lymphomas

研究代表者

樋口 智紀 (Higuchi, Tomonori)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・講師

研究者番号：00448771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000 円

研究成果の概要(和文)：Polo-like kinase 1 (PLK1) の発現異常は様々な悪性腫瘍の進展と密接に関連する。本研究では、難治性皮膚 T 細胞リンパ腫である成人 T 細胞白血病/リンパ腫(ATL)の急性転化した患者で PLK1 がより高発現し、慢性期患者では単一細胞レベルで PLK1 発現が異なり、散在することを明らかにした。また、PLK1 の発現抑制やタンパク阻害は細胞周期の停止やアポトーシスを誘導し、ATL 細胞の増殖を抑制することも明らかにした。したがって、これらの知見は PLK1 が ATL の進展において重要な役割をもつことを示し、難治性皮膚 T 細胞リンパ腫での PLK1 を標的とした治療戦略において有用な情報を提供する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで不明であった PLK1 発現異常と難治化 ATL 細胞との関連性とこれに関わる分子を明らかにし、PLK1 選択的な阻害薬の治療上の有効性についてその可能性を示した。したがって、国内外で問題となる難治性皮膚 T 細胞腫瘍の診断・治療における PLK1 の新たな臨床的意義を示し、PLK1 やその関連分子を標的とした治療戦略において有用な情報を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：High expression of polo-like kinase 1 (PLK1) is closely associated with the progression of various malignancies. In this study, we demonstrated that PLK1 is highly expressed in tumor cells from patients with aggressive adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL), while the expression levels of PLK1 in tumor cells from patients with indolent ATL is different at the single-cell level. We also found that pharmacological and genetic inhibitions of PLK1 induce cell cycle arrest and apoptosis, and suppress proliferation of ATL cells. Thus, these findings indicate that PLK1 has a key role in the progression of ATL and might prove to be useful for PLK1-targeted therapeutic strategies in refractory cutaneous T-cell lymphoma.

研究分野：皮膚腫瘍学

キーワード：PLK1 ATL

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

皮膚病変を呈する成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (ATL) も含まれる難治性皮膚 T 細胞腫瘍において、抗 CCR4 抗体薬やヒストン脱アセチル化酵素阻害薬が分子標的薬として治療の奏功が認められているが、急性増悪する難治性皮膚 T 細胞腫瘍では未だ十分な治療効果を発揮していない。この問題を解決するためには、治療効果の予測や適切な薬剤・治療の選択に有用なバイオマーカーの発見が必要不可欠である。

分裂期キナーゼは細胞分裂を制御する重要なタンパク群であり、Polo-like kinase 1 (PLK1) もその一つである。PLK1 の過剰発現は胃がんや乳がん、肝臓がん、AML など様々な悪性腫瘍で報告され、腫瘍細胞の生存・増殖の促進や放射線治療・化学療法への強い抵抗性に深く関与する。代表者らもこれまでに急性期の脾辺縁帯リンパ腫や MYC および BCL6 遺伝子再構成を伴う高悪性度 B 細胞リンパ腫において、PLK1 が腫瘍形成に大きく寄与することを明らかにした。したがって、PLK1 発現異常は難治性を有する腫瘍細胞を特徴づけている可能性がある。ATL などの難治性皮膚 T 細胞腫瘍も高い治療抵抗性を示すことから PLK1 は有望な治療標的と考えられるが、これらの腫瘍における PLK1 の発現様式や機能は不明である。

2. 研究の目的

慢性期を経て急性増悪する ATL を研究モデルとして、PLK1 発現異常による皮膚 T 細胞腫瘍の進展機構を単一の腫瘍細胞レベルで解明し、急性増悪する難治性皮膚 T 細胞腫瘍に対する診断・治療への応用を視野に入れた分子基盤を提供する。

3. 研究の方法

(1) ATL 細胞株における PLK1 の発現解析

7 種類の ATL 細胞株 (H582、HUT102、MT-1、KK1、SO4、ST1、KOB) から RNA を調整し、*PLK1* の mRNA 発現を real-time PCR 解析により定量的に調べた。mRNA 発現解析における陽性コントロールとして、フィトヘマグルチニン (PHA) 刺激した健常者由来の末梢血単核細胞 (PBMCs) を使用した。また、PLK1 のタンパク発現はイムノプロット法により調べた。

(2) ATL 患者検体における PLK1 の発現解析

48 例の ATL 患者由来 (くすぶり型: 5 例、慢性型: 8 例、リンパ腫型: 19 例、急性型: 16 例) の末梢血細胞から RNA を調整し、*PLK1* の mRNA 発現を real-time PCR 解析により定量的に調べた。比較解析のため、20 例の健常者由来の PBMCs を使用した。また、4 例の皮膚組織標本 (慢性期 ATL 患者由来: 2 例、非腫瘍性皮膚患者由来: 2 例) における PLK1 のタンパク発現を免疫組織化学染色法によって調べた。

(3) PLK1 が ATL 細胞の増殖および生存に与える影響の検討

PLK1 の発現解析を基に、siRNA による発現抑制系を用いて ST1 細胞株における PLK1 の細胞増殖に与える影響について検討した。また、細胞周期解析およびアポトーシスアッセイによって PLK1 発現抑制による増殖・生存に与える影響についても検討した。これらの実験における測定・解析はすべてフローサイトメーターを用いて行った。

(4) ATL 細胞株における PLK1 関連発現遺伝子の検討

ATL 細胞株において PLK1 が細胞増殖および生存に関与する要因を調査するために siRNA による PLK1 発現抑制系を用いて細胞増殖・生存関連遺伝子の発現変動を RNA-seq によって網羅的に解析した。

(5) ATL における PLK1 選択的阻害薬の抗腫瘍効果に関する検討

PLK1 選択的阻害薬を任意の濃度で処理した ATL 細胞株 HUT102、ST1、SO4 を用いて細胞増殖アッセイ、細胞周期解析、アポトーシスアッセイを行い、ATL における PLK1 選択的阻害薬の抗腫瘍効果について検討した。

4. 研究成果

(1) PLK1 は ATL 細胞株で高発現する

代表者らはまず、7 種類の ATL 細胞株における PLK1 の発現について検討した。その結果、

PHA-PBMCs と比較してすべての ATL 細胞株で *PLK1* mRNA が高発現していた。また、これらの ATL 細胞株における *PLK1* 発現は、タンパクレベルでも確認された。これらの結果より、皮膚 T 細胞リンパ腫の中でも ATL で *PLK1* がその腫瘍形成に関与している可能性が示された。

(2) 患者由来の ATL 細胞で *PLK1* は高発現するが、慢性期 ATL では散在的に発現する

ATL 細胞株で *PLK1* が高発現していたことから、ATL 患者由来の腫瘍細胞における *PLK1* の発現について検討した。その結果、健常者末梢血細胞 (20 例) と比較して、ATL 患者由来 PBMCs で *PLK1* の発現が亢進していた。また、その発現亢進は“くすぶり型”や“慢性型”よりも悪性度がより高い“リンパ腫型”“急性型” (16 例) で強く認められ、ATL の進展と *PLK1* の発現異常に関連性があることが示唆された。免疫組織化学染色による *PLK1* タンパク発現解析でも ATL 細胞で強く発現することが確認されたが、急性増悪前の慢性期 ATL 患者の皮膚病変部では *PLK1* を発現する ATL 細胞は散在していた。これらの結果より、慢性期の ATL 患者では細胞集団レベルで把握できない少数の *PLK1* 高発現細胞が存在し、*PLK1* によるこの ATL 細胞の増殖・生存の促進が急性増悪に関連する可能性が示された。

(3) ATL 細胞において *PLK1* の発現抑制は細胞増殖を低下させる

PLK1 の高発現が ATL 細胞の生存・増殖を促進して急性増悪に関連する可能性について検討するため、siRNA による *PLK1* 発現抑制系を用いて機能解析を行った。その結果、ATL 細胞株における *PLK1* の発現低下は有意な細胞増殖抑制を示した。また、この細胞増殖抑制は ATL 細胞のアポトーシス誘導と細胞周期における G2/M 期の停止が原因であることが明らかとなった。したがって、*PLK1* は ATL 細胞の増殖・生存に寄与し、ATL の急性増悪に関連する可能性が示された。

(4) ATL 細胞において *PLK1* は細胞増殖・生存に関与する遺伝子の発現制御に関連する

PLK1 が ATL 細胞の増殖・生存に関与することから、これらに関連する遺伝子について *PLK1* 発現抑制系を用いた RNA-seq 解析によって網羅的に調査した。その結果、*PLK1* 発現抑制によって 321 個の上方制御された遺伝子と 192 個の下方制御された遺伝子が有意に得られた。上方制御された遺伝子群にはアポトーシスの誘導に関連する *TXNIP*、*BRCA1* などが含まれ、下方制御された遺伝子群には癌関連転写因子である *SOX4* やグルコースの輸送を促進する *SLC2A3*、細胞周期・解糖経路に関連する *HILPDA* などが含まれていた。これらのことから、ATL において *PLK1* は多数の細胞増殖・生存に影響する遺伝子の発現制御に関わることで腫瘍の進展に関与する可能性が示された。

(5) *PLK1* 選択的阻害薬はアポトーシスを誘導して ATL 細胞株の増殖を抑制する

ATL 治療における *PLK1* 選択的阻害薬の有用性を検討するために、*PLK1* 阻害薬 Volasertib で 3 種の ATL 細胞株 HUT102、SO4、ST1 を処理し、細胞増殖およびアポトーシス解析を行った。その結果、siRNA による *PLK1* 発現抑制実験と同様に、Volasertib 濃度依存的にすべての ATL 細胞株の増殖は有意に低下し、その増殖抑制は G2/M 期の停止およびアポトーシスの誘導によるものであった。これらのことから、*PLK1* 選択的な阻害薬は ATL 細胞の細胞周期を停止させ、さらにアポトーシスを誘導することで抗腫瘍効果を発揮することが明らかとなった。

(まとめ)

難治性皮膚 T 細胞リンパ腫では、抗 CCR4 抗体治療薬モガムリズマブが使用されているが、エビデンスに基づいた標準治療法の選択肢は不足しており、特に再発または 1 次難治性の ATL 患者の場合、十分な治療奏功の結果は得られていない。したがって、異なる経路を標的とする新しい治療法の開発は、利用可能な治療オプションの数をさらに拡大し、再発性および 1 次難治性 ATL 患者の転帰を改善する可能性がある。本研究において、代表者らは臨床検体も含め *PLK1* が ATL 細胞で高発現することを明らかにした。また、*PLK1* の発現はより悪性度の高い“リンパ腫型”や“急性型”で高く、慢性期の ATL である“くすぶり型”や“慢性型”では散在的に ATL 細胞で高発現していることを示した。さらに、*PLK1* の発現抑制や阻害薬を用いた実験系により *PLK1* が ATL 細胞の増殖や生存に密接に関わることを示した。したがって、*PLK1* を標的とした阻害薬は ATL 細胞に対して抗腫瘍効果を発揮し、急性増悪する ATL の新たな治療薬として期待できる。

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 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Higuchi T, Hashida Y, Matsuo K, Kitahata K, Ujihara T, Murakami I, Nakayama T, Daibata M.	4. 巻 114(6)
2. 論文標題 EBV-positive pyothorax-associated lymphoma expresses CXCL9 and CXCL10 chemokines that attract cytotoxic lymphocytes via CXCR3.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2622-2633
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15782	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 Kitamura N, Hashida Y, Higuchi T, Ohno S, Sento S, Sasabe E, Murakami I, Yamamoto T, Daibata M.	4. 巻 18(5)
2. 論文標題 Detection of Merkel cell polyomavirus in multiple primary oral squamous cell carcinomas.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Odontology	6. 最初と最後の頁 1933-1938
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10266-023-00807-y	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 Ogasawara F, Higuchi T, Nishimori T, Hashida Y, Kojima K, Daibata M.	4. 巻 26(22)
2. 論文標題 Targeting VEGF with bevacizumab inhibits malignant effusion formation of primary human herpesvirus 8-unrelated effusion large B-cell lymphoma in vivo.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cellular and Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 5580-5589
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jcmm.17570	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 Nishimori T, Higuchi T, Hashida Y, Ujihara T, Taniguchi A, Ogasawara F, Kitamura N, Murakami I, Kojima K, Daibata M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Development of a novel cell line derived xenograft model of primary herpesvirus 8 unrelated effusion large B cell lymphoma and antitumor activity of birabresib in vitro and in vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 8976-8987
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cam4.4394	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 Hashida Y, Higuchi T, Matsumoto S, Iguchi M, Murakami I, Hyodo M, Daibata M.	4. 巻 112
2. 論文標題 Prognostic significance of human papillomavirus 16 viral load level in patients with oropharyngeal cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4404-4417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15105	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 Hashida Y, Higuchi T, Nakajima S, Nakajima K, Ujihara T, Kabashima K, Sano S, Daibata M	4. 巻 223
2. 論文標題 Human Polyomavirus 6 Detected in Cases of Eosinophilic Pustular Folliculitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 1724-1732
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/infdis/jiaa607	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 Hashida Y, Higuchi T, Nakajima K, Ujihara T, Murakami I, Fujieda M, Sano S, Daibata M.	4. 巻 140(8)
2. 論文標題 Human Polyomavirus 6 with the Asian-Japanese Genotype in Cases of Kimura Disease and Angiolymphoid Hyperplasia with Eosinophilia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 1650-1653.e4.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2019.12.027	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3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 樋口智紀, 西森大洋, 橋田裕美子, 大畑雅典
2. 発表標題 ヒトヘルペスウイルス8型陰性原発性滲出性リンパ腫細胞由来の異種移植モデルにおけるピラプレシブの抗腫瘍活性.
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西森大洋, 樋口智紀, 橋田裕美子, 小島研介, 大畑雅典
2. 発表標題 HHV8陰性原発性滲出性リンパ腫細胞由来の異種移植モデルの樹立とその解析.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西森大洋, 樋口智紀, 橋田裕美子, 谷口亜裕子, 小島研介, 大畑雅典
2. 発表標題 ヒトヘルペスウイルス8型感染を認めない原発性滲出液リンパ腫様リンパ腫に由来する新規細胞株の樹立.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
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
研究分担者	橋田 裕美子 (Hashida Yumiko) (00767999)	高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・助教 (16401)	
研究分担者	大畑 雅典 (Daibata Masanori) (50263976)	高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・教授 (16401)	

	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
研究協力者	中山 隆志 (Nakayama Takashi)		

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