

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 年度～2011 年度

課題番号：21591226

研究課題名（和文） マントル細胞リンパ腫におけるストローマ依存性薬剤耐性の克服

研究課題名（英文） The Role of Reactive Oxygen Species In Apoptosis Induction of Mantle Cell Lymphoma (MCL); Inhibition of NADPH Oxidase 2 Induces Apoptosis In MCL

研究代表者

三浦 裕次 (MIURA YUJI)

愛知医科大学・看護学部・教授

研究者番号：00345612

研究成果の概要（和文）：

本研究において、マントル細胞リンパ腫 (mantle cell lymphoma, MCL) の増殖には悪性細胞周辺の微小環境(ニッチ)が必要で、ストローマと MCL 細胞との細胞間相互作用で活性酸素(ROS)が重要な役割を果たしていることが明らかになった。これらは難治性悪性リンパ腫であるマントル細胞リンパ腫に対する有効な治療薬となりうると考えられ、これらの併用によって抗癌剤の治療効果を高める可能性があることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Mantle cell lymphoma (MCL) is an aggressive tumor and is characterized by deregulated growth and resistance to apoptosis. Reactive oxygen species (ROS) are important signal transduction molecules in regulation of MCL cell growth, differentiation and apoptosis. ROS generated by Nox2, at least in part, transmit cell survival signals through the AKT-ASK1 pathway in MCL cells and their depletion leads to apoptosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000 円	510,000 円	2,210,000 円
2010 年度	1,500,000 円	450,000 円	1,950,000 円
2011 年度	500,000 円	150,000 円	650,000 円
年度			
年度			
総計	3,700,000 円	1,110,000 円	4,810,000 円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：(1) 悪性リンパ腫 (2) ストローマ (3) 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

マントル細胞リンパ腫 (mantle cell lymphoma, MCL) は、進行性かつ治療抵抗性で最も予後不良な悪性リンパ腫である。骨髄や消化管など複数のリンパ節外に浸潤し、進行した病期で見つかる比率が高い。この原因の一つとして、悪性細胞周辺の微小環境(ニッチ)が重要な役割を果たしている可能性がある。悪性細胞

は単独では存在せず、線維芽細胞や血管内皮細胞などのいわゆるストローマ細胞と共存する。ストローマによる細胞接着並びに液性因子を介した生存シグナル伝達分子が細胞の増殖やアポトーシスの抑制に関与している。

2. 研究の目的

本研究では、このストローマと MCL 細胞との細胞間相互作用を解析するとともに、これを阻止することにより有効な治療法の確立を目的とする。

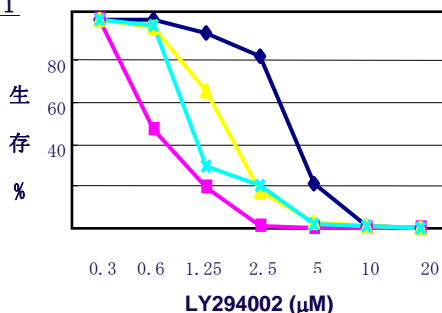
3. 研究の方法

- (1) 細胞生存の解析: 生細胞染色用色素 Calcein (FITC) と死細胞染色色素 Ethidium (PE) を共に用いることで生死細胞二重蛍光染色を行い、フローサイトメトリーで viability の判定および細胞毒性について検討する。S17 ストローマ細胞と MCL 細胞を共培養した際の MCL 生細胞数は、CD19 を APC で染色するにより三重蛍光染色により解析する。
- (2) アポトーシス解析: アポトーシスを誘導後、細胞を Annexin V と 7AAD で生細胞と死細胞を染色し、フローサイトメトリーで、早期アポトーシス細胞と後期アポトーシス細胞を高精度に解析する。
- (3) Western blot 解析: MCL 細胞を S17 ストローマ細胞と培養すると、単独で MCL 細胞を培養して時と比較し、細胞増殖能は低下するものの、PI3K/AKT 阻害剤や PDK1 阻害剤による細胞傷害活性は減弱する。S17 ストローマ細胞と培養した MCL 細胞の AKT, ERK, ATK や p38 などの発現を Western blot 解析で検討する。ADA を作用させた際 PI3K/PDK/AKT 経路や ASK/JNK/p38 経路が複雑に作用しているので、これらの蛋白リン酸化を詳細に検討する。
- (4) 遊走能の検討: 低酸素化の癌細胞は、抗癌剤に抵抗性で転移能が高く、癌幹細胞と類似した性質をもつ。MCL 細胞の遊走活性を、pore size 0.5 μ m 孔の透過膜を底に有する Transwell (Costar) のチャンバーを用いて解析する。腫瘍の低酸素領域では、線維芽細胞からの SDF1 の産生が亢進し、腫瘍細胞での CXCR4 の発現が増加し、腫瘍細胞自身の変形性や浸潤能が高まっている。誘導された遊走反応が CXCR4 阻害剤 AMD3100 で抑制するか否かを解析する。

4. 研究成果

- (1) 細胞の生存と死におけるシグナル伝達系の解析
10 種類の MCL 細胞株において、蛋白リン酸化酵素 (protein tyrosin kinase, PTK) 阻害剤による細胞生存能を検討した。PI3K/AKT に対する阻害剤 LY294002 によってアポトーシスが誘導された (IC₅₀<5 μ M, 図 1)。

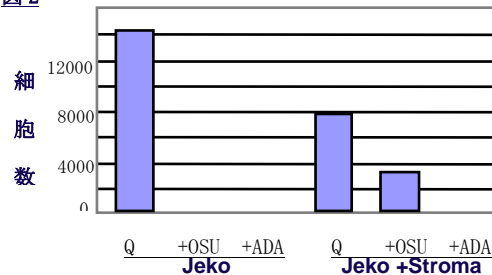
図 1



特に全細胞株で PDK1 の恒常的リン酸化を観察し、PDK1 に対する阻害剤 OSU03012 によって細胞増殖は完全に抑制された (IC₅₀<2 μ M)。ERK 阻害剤 PD098059 や mTOR 阻害剤 Rapamycin は細胞生存に有意な影響を与えなかった。一方、p38MAPK 阻害剤 SB203580 では細胞増殖を促進させたことから、p38 経路は細胞死に正のシグナルを送っているため、この阻害は細胞死を抑制し細胞生存をもたらしたと考えられた。細胞の生存にとって PI3K/PDK1/AKT シグナル伝達系が重要な役割を果たし、細胞死には p38 経路が関与していると考えられた (図 5)。

- (2) ストローマ細胞依存性薬物耐性の克服
PI3K/PDK1/AKT 経路のシグナル伝達の阻害によって MCL 細胞はアポトーシスしたが、MCL 細胞株をストローマ細胞と共培養し PI3K/PDK1/AKT 阻害剤を作用させると、アポトーシスは抑制され細胞生存は維持された (図 2)。

図 2



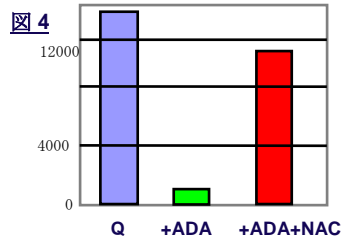
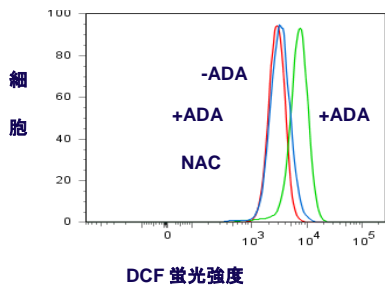
これらの所見は、ストローマ細胞は MCL 細胞に対して何らかの生存シグナルを送っており、薬物耐性への関与を示唆するものである。PTK 阻害剤は癌に対する主要な標的治療戦略の一つであるが、ストローマ細胞依存性薬物耐性を克服することが重要な課題といえる。

アダホスチン (Adaphostin, ADA) は強力な PTK 阻害剤で、全 MCL 細胞株において IC₅₀ が 0.3-1.2 μ M の低濃度で、抗腫瘍活性を有していることを見出した。さらに、ADA は、MCL 細胞とストローマを共培養した際でも、全 MCL 細胞にアポトーシスを誘導した (図 2)。これらの所見は難治性 MCL に対する ADA の有効性を示唆するのみならず、ストローマ細胞と MCL 細胞との細胞間相互作用を理解する上で極めて重要な所見である。

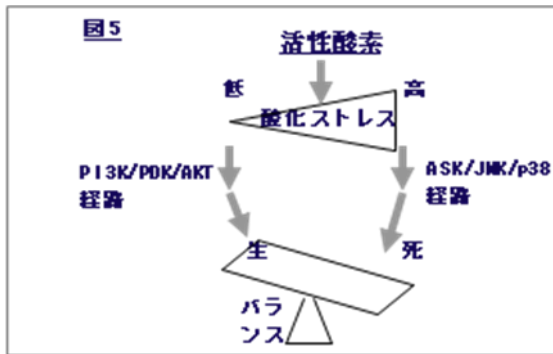
- (3) 活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) の役割

MCL 細胞に ADA を作用させると、アダホスチンは細胞内の ROS を増加させ、DNA の strand break を誘導し、アポトーシスに導く (図 3 と 4)。

図 3



さらに、活性酸素阻害剤 N-acetylcysteine (NAC)で前処理すると、ROSの増加は抑制され細胞死は抑制された。この所見は、ADAの抗腫瘍作用に活性酸素が関与していることを示唆するものである。



(4) MCL における悪性細胞周辺の微小環境 (ニッチ)の役割の検討

ストローマ細胞ニッチモデルを樹立し、この細胞間相互作用を解析した。ストローマ細胞と MCL 細胞を共培養すると、MCL 細胞を単独培養した場合と比較し、MCL 細胞の生存は有意に延長した。MCL 細胞の生存能は、抗酸化剤の添加により用量依存性に抑制された。その際に MCL 細胞の生存能は、細胞内 ROS の産生は有意に減少しアポトーシスが誘導された。さらに、ストローマ細胞と共培養した際の MCL 細胞の RNA 発現強度を比較したところ、ストローマ細胞と共培養した MCL 細胞で、ROS の生成源として機能している Nox family 遺伝子のうち Nox2 の遺伝子発現が有意に亢進していた。また Nox2 の発現は、MCL 細胞は健常人の B 細胞と比較し有意に亢進していた。

(5) MCL 細胞の増殖における Nox family 遺伝子の機能的役割の検討

MCL 細胞株 SP49 や SP53 を SiRNA Nox2-RNA で knockdown すると、細胞内 ROS の産生は減少し、アポトーシスが有意に誘導された。

これらの結果から、MCL ではストローマなどの微小環境(ニッチ)が MCL 細胞の生存に重要な役割を果たしていることが示唆された。また、抗酸化剤や Nox2-SiRNA によって MCL 細胞化株にアポトーシスを誘導したことから、ストローマと MCL 細胞との細胞間相互作用で ROS が重要な役割を果たしていると考えられた。このような悪性細胞周辺のニッチの環境改良、つまりストローマと腫瘍細胞との細胞間相互作用の分断こそが難治性悪性リンパ腫の有効な治療標的となりうること、さらにこれらの併用によって抗癌剤の治療効果を高める可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Yuji Miura, Hiroshi Miwa, Toshihito Ohno, Miyako Haneda, Yoshitaka Hosokawa, Masakazu Nitta, and Masanori Daibata. The Role of Reactive Oxygen Species In Apoptosis Induction of Mantle Cell Lymphoma (MCL); Inhibition of NADPH Oxidase 2 Induces Apoptosis In MCL. Blood, 2010; 116: 3616.

[学会発表] (計 2 件)

Yuji Miura, Hiroshi Miwa, Toshihito Ohno, Miyako Haneda, Yoshitaka Hosokawa, Masakazu Nitta, Masanori Daibata The Role of Reactive Oxygen Species in Apoptosis Induction of Mantle Cell Lymphoma (MCL); Inhibition of NADPH Oxidase 2 Induces Apoptosis in MCL.

第 52 回米国血液学会年次総会. 平成 22 年 12 月 6 日. 米国フロリダ州オーランド
三浦裕次. 遺伝子の異常によって起こる病気がん. 平成 21 年度愛知医科大学公開講座. 平成 21 年 9 月 12 日. 愛知医科大学 (愛知県)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

三浦 裕次 (MIURA YUJI)
愛知医科大学・看護学部・教授
研究者番号：00345612

(2)研究分担者

三輪 啓志 (MIWA HROSHI)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号：00209967