

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461585

研究課題名(和文) 超低分子量ヒアルロン酸を用いたCD44高発現腫瘍に対する分子標的療法の開発

研究課題名(英文) CD44-targetted therapy for CD44-high expressing tumors by ultra-low-molecular-weight hyaluronan

研究代表者

杉田 完爾(SUGITA, Kanji)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：60138055

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：CD44高発現白血病細胞株にCD44リガンドの超低分子量ヒアルロン酸を添加すると、サイミジン取り込みが著明に抑制された。遺伝子編集技術によって作成されたCD44欠損細胞株では抑制されなかった。サイミジン取り込みの抑制は細胞死誘導であり、汎カスパーゼ阻害剤やオートファジー阻害剤で抑制されず、ネクローシス阻害剤で完全に抑制された。透過電子顕微鏡による細胞形態でもネクローシスが支持された。細胞内reactive oxygen species濃度が著明に上昇することが明らかになり、ネクローシス誘導に関連していると考えられた。CD44高発現の腫瘍に対し、CD44標的療法は有効である可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We investigated the biological effects of ultra-low-molecular-weight (ULMW)-HA on MLL+ALL cell lines with high surface expression of CD44, and found that the addition of ULMW-HA strongly suppressed thymidine uptakes. The cell line almost lacking surface CD44 expression established by genome editing using CRISPR/Cas9 system showed no suppression, demonstrating an essential role of surface CD44 expression for ULMW-HA-triggered inhibition of thymidine uptake. This inhibition was not due to cell cycle arrest but due to induction of cell death. The cell death was neither blocked by pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK nor autophagy inhibitor 3-methyladenine, but was completely blocked by necrosis inhibitor necrostatin-1. ULMW-HA-triggered necrotic cell death was further supported by morphological changes on transmission electron microscopy. Elevation of intracellular reactive oxygen species production after ULMW-HA stimulation suggested a role for inducing this necrotic cell death.

研究分野：小児科

キーワード：超低分子量ヒアルロン酸 白血病 CD44 細胞死 ネクローシス

1. 研究開始当初の背景

小児白血病の予後は、近年の多剤併用化学療法の進歩によって格段に向上してきているが、未だに難治性白血病が残存している。乳児白血病の大部分を占める *MLL* 遺伝子に再構成を有する急性リンパ性白血病(*MLL+ALL*)は代表的な難治性白血病であるが、他の白血病より細胞表面に *CD44* を高発現していることが知られている。ヒアルロン酸(HA)は *CD44* の自然リガンドで、組織の細胞外マトリックスの主要な構成成分であるとともに、炎症や感染の存在する部位では様々な分子サイズのHAが間葉系細胞から活発に分泌されることが知られている。従って、異なる分子量を有するHAによる *MLL+ALL* 細胞の刺激が、どのような生物学的効果を示すのかを明らかにすることは、非常に興味深い研究テーマであると同時に難治性白血病 *MLL+ALL* の治療戦略に繋がる可能性がある。

2. 研究の目的

MLL+ALL 細胞株ならびに新鮮白血病細胞に高分子量HA(HMW-HA)あるいは超低分子量ヒアルロン酸(ULMW-HA)を添加し、その生物学的効果を検討する。また、効果が認められた場合は、そのメカニズムを検討する。

3. 研究の方法

最初に *MLL+ALL* 細胞株 8 株に HMW-HA あるいは ULMW-HA (2.5mg/ml) を添加して 3 日間培養し、 H^3 -thymidine を用いてサイミジン取り込みを測定したところ、*CD44* を高発現する 6 株では、ULMW-HA の添加で著明なサイミジン取り込みの低下が認められた。一方、*CD44* 低発現の 2 株ではサイミジン取り込みが抑制されなかった。従って、細胞表面 *CD44* の高発現がサイミ

ジン取り込み抑制に必要であることが示唆された(図1)。HMW-HA 添加ではサイミジン取り込みの変化は認められなかった。ULMW-HA によるサイミジン取り込み抑制のメカニズムを明らかにするために、特に ULMW-HA 添加でサイミジン取り込みが抑制された細胞株 KOPB26 を用いて 1) から 11) の実験を行った。また、最後に新鮮 *MLL+ALL* 細胞を用いた検討 12) を行った。

- (1) CRISPR/Cas9 system を用いた遺伝子編集技術による *CD44* 欠損細胞株の作成
- (2) 細胞数の測定
- (3) 細胞回転の解析
- (4) 細胞死の解析
- (5) 塗抹標本上の細胞形態の解析
- (6) カスパー 3 の活性化の解析
- (7) 細胞死関連の各種阻害剤の影響
- (8) 培養上清中 high-mobility protein group B1 (HMGB1) 濃度の測定
- (9) シグナル伝達分子の解析
- (10) 細胞内 reactive oxygen species (ROS) 濃度の測定
- (11) 透過電顕を用いた細胞形態の観察
- (12) 新鮮 *MLL+ALL* 細胞を用いた検討

4. 研究成果

- (1) CRISPR/Cas9 system を用いた遺伝子編集技術によって、親株 KOPB28 から *CD44* 欠損細胞株を作成できた。*CD44* 欠損細胞株では ULMW-HA 刺激によってサイミジン取り込みが全く抑制されなかった。このことは ULMW-HA 刺激によるサイミジン取り込みの抑制には、ULMW-HA が結合する細胞表面 *CD44* 発現が必須であることが示された(図

- 2)。
- (2) ULMW-HA 刺激によるサイミジン取り込み抑制のメカニズムを検討するために、細胞数の変化を検討したところ、培養3日後から著明な細胞数の減少が認められた。
- (3) フローサイトメトリー法を用いたPI染色で細胞回転解析を行ったところ、ULMW-HA 刺激によって細胞回転停止は誘導されなかった。また、subdiploid 分画の増加が認められず、アポトーシス誘導は否定的であった。
- (4) フローサイトメトリー法(アネキシンV/PI染色)を用いたULMW-HA 刺激による細胞死の解析を行ったところ、アポトーシス分画の増加は検出されなかった。
- (5) 細胞塗抹標本でもULMW-HA 刺激によるアポトーシス細胞の増加は検出されなかった。多くの死細胞は小型化し、細胞質の崩壊が認められた。
- (6) ULMW-HA 刺激による細胞死のメカニズムを同定するために、フローサイトメトリー法を用いたカスペース3の活性化を検討したが、ULMW-HA 刺激で活性化カスペース3は検出されなかった(図3A)。
- (7) ULMW-HA 刺激によるサイミジン取り込み抑制は、汎カスペース阻害剤Z-VAD-FMK やオートファジー阻害剤3-methyladenine では全く抑制されず、ネクローシス阻害剤necrostatin-1で完全に抑制された。従って、ULMW-HA 刺激はMLL+ALL細胞にネクローシスを誘導していることが示唆された(図3B, C)。
- (8) ネクローシスマーカーとして知られているHMGB1の培養上清の濃度をULMW-HA 刺激後に経時的に測定したところ、

刺激3日からネクローシス誘導高温処理(55度3分)よりも大量のHMGB1が検出された(図3D)。

- (9) ウエスタンブロット法で、ULMW-HA(10mg/ml)刺激後のJNK1, p38, p42/p42MAPK, Aktのリン酸化の変化を検討した。JNK1, p38は変化が認められず、p42/p42MAPK, Aktは、刺激30分後からリン酸化の増強が認められた(図4A)。
- (10) ULMW-HA 刺激により経時的に細胞内reactive oxygen species濃度が上昇することが明らかになった(図4B)。
- (11) ULMW-HA 刺激後の透過電子顕微鏡による細胞形態の観察では、死細胞はネクローシスの特徴を有していた。生細胞の一部は、ERストレス誘導性オートファジーを示唆する形態を示し、ネクローシスから逃れるための生体防御メカニズムと考えられた。
- (12) MLL+ALL細胞株で得られた結果が新鮮MLL+ALL細胞でも観察されるかどうかを検討するために、液体窒素に保存されていた4症例の新鮮白血病細胞を用いて実験を行った。4症例とも、CD44を高発現し、ULMW-HA 刺激によりサイミジン取り込みが抑制され、細胞死が有意に誘導された(図5、表)

<考察>

本研究によって、CD44を高発現しているMLL+ALL細胞は、CD44リガンドであるULMW-HA刺激によってネクローシスが誘導されることが示された。不思議な現象として、白血病が炎症や感染症の遷延に伴って体内の白血病細胞が消退し、一過性に寛解に導入される場合があることが知られている。多くの白血病は

細胞表面 CD44 をある程度以上発現していることが知られており、上記現象は、炎症や感染部位で産生された ULMW-HA による直接刺激かつ ULMW-HA 刺激によって白血病細胞から放出される HMGB1 と協調的に作用して白血病細胞にネクローシスを誘導することが、そのメカニズムである可能性がある。種々の白血病幹細胞は CD44 を高発現していることが知られており、CD44 標的療法は新たな治療戦略となることが期待される。

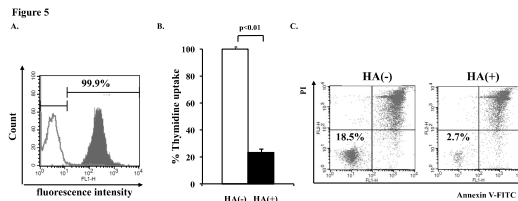
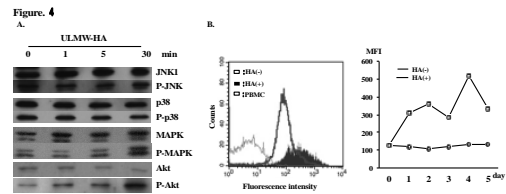
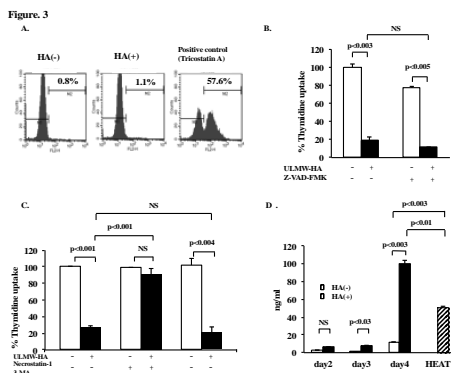
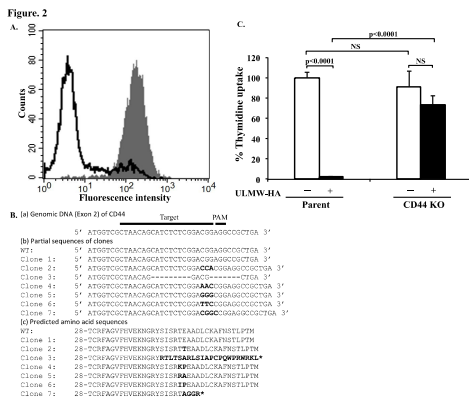
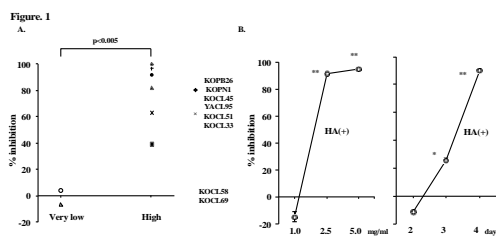


Table. Characteristics of primary leukemia cells and induction of cell death after ULMW-HA stimulation

case no.	Age(month /Sex)	WBC (x10 ⁹ /μl)	Fusion gene	CD44 expression % MFI(fold) after ULMW-HA stimulation	% decrease in viability
1	7/F	824	<i>MLL-AF4</i>	98.9	50.2
2	3/F	183	<i>MLL-ENL</i>	98.8	41.6
3	5/M	700	<i>MLL-AF4</i>	99.9	47.9
4	28/M	327	<i>MLL-AF9</i>	99.9	84.9

Abbreviations:
MFI, mean fluorescence intensity; F, female; M, male
MFI(fold), MFI(stained by FITC-conjugated anti-CD44 antibody)/MFI (stained by murine IgG1)
%decrease in viability after ULMW-HA stimulation:
[1- [(lower left population% with HA) / (lower left population% without HA)]]x100

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

笠井慎、古市嘉行、安藤徳江、加賀美恵子、阿部正子、中根貴弥、合井久美子、犬飼岳史、斉藤正、大野伸一、杉田完爾．超低分子量ヒアルロン酸はCD44を介して*MLL*遺伝子再構成陽性ALL細胞にネクローシスを誘導する。

第77回日本血液学会学術集会、(ANA クラウンプラザホテル金沢(石川県・金沢市)、2015年10月16-18日。

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉田完爾 (SUGITA, Kanji)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：60138055

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

犬飼岳史 (INUKAI, Takeshi)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号： 30293450

合井久美子 (GOI, Kumiko)

山梨大学・総合研究部・講師

研究者番号： 70324192

大城浩子 (OSHIRO, Hiroko)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号： 50377537