

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06840

研究課題名(和文) 悪性リンパ腫発症・悪性化における腫瘍免疫回避を誘導する分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism of immune evasion in malignant lymphoma

研究代表者

杉原 英志 (Sugihara, Eiji)

筑波大学・国際産学連携本部・助教

研究者番号：50464996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では悪性リンパ腫が発症、進展化の過程でどのような機構を経て免疫回避を行うのかマウスモデルを用いて解析を実施した。その結果、非ホジキンリンパ腫の起源細胞である胚中心B細胞で発現するFasがリンパ腫では低発現であること、CD40シグナル活性化によってFas発現を回復させると、細胞障害性T細胞が発現するFasリガンドによりアポトーシスが誘導されること、Livinを発現するヒトリンパ腫細胞株はFas抵抗性を獲得することを見出した。実際Livin高発現はリンパ腫患者の予後不良と関連するため、LivinがFas-Fasリガンドによる腫瘍免疫を復活させる新たな治療標的となり得ることを示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, to examine how malignant lymphoma cells can escape from the immune system, our established mouse lymphoma model was analyzed. We found that Fas expression is downregulated in lymphoma cells, and that restoration of Fas expression by CD40 signal activation in lymphoma cells induces apoptosis triggered by cytotoxic T cells expressing Fas ligand. Furthermore, certain human lymphoma cell lines that highly express a member of Survivin family Livin show resistance to Fas-mediated apoptosis. Given that high expression of Livin is associated with poor prognosis in Non-Hodgkin's lymphoma patients, targeting Livin is a new therapeutic strategy for malignant lymphoma to restore anti-tumor immune activity by Fas-mediated apoptosis.

研究分野：腫瘍医学

キーワード：非ホジキンリンパ腫 腫瘍免疫 Fas Livin

1. 研究開始当初の背景

非ホジキンリンパ腫である「バーキットリンパ腫 (BL)」、「濾胞性リンパ腫」、「びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (DLBCL)」は、脾臓やリンパ節内における胚中心に存在する B 細胞 (GCB 細胞) が起源細胞である成熟 B 細胞性の悪性リンパ腫であり、リンパ腫の中で最も頻度が高い。昨今の化学療法や分子標的薬の開発により、これら悪性リンパ腫はある程度の治療成績の改善が見られるものの、未だ多くの患者の再発が報告されている。加えて、既存の抗がん剤治療ではほとんど効果のない症例の報告もあり、更なる治療の改善には新規治療法の創出が最重要課題である。

がん細胞は一般的に分泌因子や細胞表面分子を介して微小環境中の免疫細胞や免疫を制御する細胞に働きかけることで腫瘍免疫を抑制・回避すると考えられている。近年、PD1-PDL1 と呼ばれる T 細胞の活性を抑制する免疫チェックポイント分子が働くことで腫瘍への攻撃が抑制されることが明らかにされてきたが、これらの分子を標的とした抗体薬が実際メラノーマや肺がんなどの腫瘍に対して顕著な効果を発揮することが報告された。このように免疫チェックポイント阻害剤の成功によって腫瘍免疫の研究は世界的な広がりを見せており、今後の新規がん治療薬開発において腫瘍免疫は最重要なテーマになると考えられる。

本研究開始前の状況として、非ホジキンリンパ腫においては一部の DLBCL 患者検体で HLA 構成分子の変異が免疫回避に関与する報告があったが、リンパ腫全体の発症・悪性化の過程でどのような分子がいかに腫瘍免疫を抑制・回避を誘導するのか、その機構はほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では正常リンパ球が悪性リンパ腫発症の過程で腫瘍免疫から回避する分子機構に焦点を当て、マウスリンパ腫モデルを用いて解析を実施した。またヒトリンパ腫細胞株を用いた解析を行うことで、マウス、ヒトリンパ腫免疫回避を誘導する鍵となる分子機構の解明とそれを標的とした阻害剤・治療法の開発を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

本研究では主に申請者が独自に開発したマウス成熟 B 細胞型リンパ腫モデルを用いて、リンパ腫発症及び維持・悪性化の過程で起こる腫瘍免疫回避の分子機構を *in vitro*、*in vivo* 両面から解析を実施した。またヒトリンパ腫細胞株を用いてマウスリンパ腫で見出した分子の腫瘍免疫への関与を検討した。公共デ

ータベースを用いてリンパ腫患者の予後と腫瘍免疫に関わる分子発現との相関を統計学的に解析した。さらに腫瘍免疫回避に関わる分子の発現ノックダウンや阻害剤を用いた検討を行い、リンパ腫に対する治療標的となり得るのか評価を行った。

4. 研究成果

申請者が開発した成熟 B 細胞型マウスモデルは *Ink4a/Arf* 欠損マウス由来の GCB 様細胞を *ex vivo* で培養し、がん遺伝子 MYC をレトロウイルスベクターにて導入した後、半致死量 X 線照射した同種野生型マウスへ移植することで構築される。まずリンパ腫が形成したマウスよりリンパ腫細胞の表面マーカーを解析したところ、移植前の MYC 導入 GCB 様細胞で高発現が見られた Fas と呼ばれるアポトーシス誘導分子の発現が全てのリンパ腫発症マウスで著しく低下していることを見出した。そこで Fas の発現低下が GCB 細胞からのリンパ腫発症に重要かどうか明らかにするため、shRNA にて Fas の発現を抑制したところ、MYC によるリンパ腫形成の頻度及び発症速度が有意に増加することが分かった。また、発症したリンパ腫の生存においても Fas 発現低下が重要であるか明らかにするため、リンパ腫細胞を培養し、レトロウイルスベクターにて Fas を導入した後、移植を行った。その結果、Fas 導入リンパ腫細胞は有意に生存期間を延長させることが分かった。これらの結果から Fas の発現低下はリンパ腫発症及びリンパ腫細胞の生存・維持にきわめて重要であることが示唆された。

Fas は一般的に細胞障害性 T 細胞 (CTL) に発現する Fas リガンド (FasL) によってアポトーシスが誘導される。そこで CTL が Fas 発現リンパ腫細胞をアポトーシス誘導するのかどうか検討するため、活性化 CD8 陽性 T 細胞との共培養及び CD8 中和抗体を投与したマウスへの移植実験を行った。その結果 Fas 導入リンパ腫は FasL を発現した CD8 陽性 T 細胞によって有意に減少することが分かった。また CD8 陽性 T 細胞を除去したマウスでは Fas 導入リンパ腫細胞が有意に生存・増加することが分かった。これらの結果から CTL による Fas 発現細胞の排除機構がリンパ腫発症の抑制の要になっていることが示唆された。

次にリンパ腫細胞における Fas 発現低下の分子機構を明らかにするため、分子阻害剤などを用いた検討を行った。まず DNA メチル化阻害剤及び HDAC 阻害剤を処理したところ、Fas 発現の回復は起こらず Fas 発現低下はエピジェネティクス制御に依存しないことが分かった。そこで Fas 発現を活性化するシグナルが低下していることが想定された

ため、B 細胞を活性化する因子を処理したところ、CD40L 及び CD40 アゴニスト抗体で Fas 発現が強く回復することを見出した。また、CD40 シグナルの下流についてさらに阻害剤を用いて検討したところ、PI3K, NFκB, MAPK シグナルを介して Fas 発現を増加させることが分かった。さらに発現回復した Fas は FasL によってアポトーシスが強く誘導された。これらの結果から CD40 シグナル活性化による Fas 発現回復はリンパ腫の新たな治療法となり得ることが示唆された。

次にヒト非ホジキンリンパ腫細胞株 (BL:4 株、DLBCL:9 株) においても Fas 発現を調べたところ、84% においてマウスリンパ腫同様に Fas 発現が低下していることが分かった。次に CD40L によって CD40 シグナル活性化を行ったところ、1 株を除いて全ての細胞株で Fas 発現が回復した。さらに FasL 処理を行ったところ、FasL に感受性を示す細胞株がある一方、興味深いことに Fas 発現回復にも関わらず FasL に抵抗性を示す細胞株が存在することが分かった。

そこでアポトーシスを抑制する分子である Bcl ファミリーや Survivin ファミリーなどの発現を調べたところ、抵抗性株において共通して Livin と呼ばれる Survivin ファミリー分子が高発現していることを見出した。公共のデータベースを用いて非ホジキンリンパ腫 (BL 及び DLBCL) 患者の予後解析を行ったところ、Livin 高発現はリンパ腫患者の予後不良と高い相関性を示すことが分かった。一方、Fas 発現は予後良好と相関した。つまり、Livin と Fas 発現はリンパ腫患者の予後において相反する関係であることを見出した。次に Livin 高発現が実際に Fas 抵抗性の原因となっているのかどうか明確にするため、shRNA を用いた検討を行った。その結果、Livin 発現を抑制すると抵抗性株において Fas 発現回復によるアポトーシスが有意に増加することが分かった。さらに Livin 阻害剤である BV6 を処理しても同様に Fas 発現回復によるアポトーシスが有意に増加した。つまり Livin が Fas 抵抗性の責任分子であることが示唆された。

本研究において「Fas-FasL によるアポトーシスの抑制」は非ホジキンリンパ腫の腫瘍免疫からの回避として発症から悪性化の過程できわめて重要な分子イベントであることを明らかにした。Fas は CD40 シグナルの下流であるため、Fas 発現の低下は正常 GCB 細胞が増殖及び分化の段階で必要とする CD40 シグナルから非依存的になることが示唆され、結果的に Fas 発現が低下すると考えられる。一方ヒトリンパ腫においては Fas 発現低下に加え、Livin 発現が Fas 抵抗性の責任分子であることを見出した。これはヒトがマウスとは異なり、より長い年月をかけてリンパ腫

の形成・維持が行われた結果獲得した抵抗性と想定される。実際、リンパ腫の予後不良と相関するため、Livin はリンパ腫において腫瘍免疫を再活性化する最適な標的分子であると考えられる。現在非ホジキンリンパ腫においてリツキサン (CD20 抗体) を使用した標準治療が行われているが、リツキサンは Fas を介したアポトーシスを起こすことが報告されている。また腫瘍免疫活性化を目指して開発されている CD40 アゴニスト抗体がリンパ腫で使用された場合 Fas-FasL によるアポトーシス誘導を起こることが想定される。しかしこれらの抗体治療に対して抵抗性を示すリンパ腫患者も想定される。本研究で見出した Livin がそれら抵抗性の分子マーカーとなる可能性もあり、今後、治療及び診断においても本研究の知見が応用されることが大いに期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

1. Semba T*, Sugihara E* †, Kamoshita N, Ueno S, Fukuda K, Yoshino M, Takao K, Yoshikawa K, Izuhara K, Arima Y, Suzuki M, Saya H. A periostin antisense oligonucleotide suppresses bleomycin -induced formation of a lung premetastatic niche for melanoma. *Cancer Sci.* 2018. in print. doi: 10.1111/cas.13554. *equally contributed, †corresponding author. 査読有
2. Saito Y, Onishi N, Takami H, Seishima R, Inoue H, Hirata Y, Kameyama K, Tsuchihashi K, Sugihara E, Uchino S, Ito K, Kawakubo H, Takeuchi H, Kitagawa Y, Saya H, Nagano O. Development of a functional thyroid model based on an organoid culture system. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 Mar 4;497(2):783-789. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.02.154. 査読有
3. Huang M, Inukai T, Miyake K, Tanaka Y, Kagami K, Abe M, Goto H, Minegishi M, Iwamoto S, Sugihara E, Watanabe A, Somazu S, Shinohara T, Oshiro H, Akahane K, Goi K, Sugita K. Clofarabine exerts antileukemic activity against

- cytarabine-resistant B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with low deoxycytidine kinase expression. *Cancer Med.* 7(4):1297-1316. 2018. doi: 10.1002/cam4.1323. 査読有
4. 杉原英志, 石澤丈, 佐谷秀行: MYC 研究の歴史の原点 造血器腫瘍における MYC の役割. **実験医学**, 36(4):494-500, 2018.
http://jglobal.jst.go.jp/public/201802252776206904 査読無
 5. Ishizawa J, Sugihara E, Kuninaka S, Mogushi K, Kojima K, Benton CB, Zhao R, Chachad D, Hashimoto N, Jacamo OR, Qiu Y, Yoo YS, Okamoto S, Andreeff M, Kornblau MS, Saya H: FZR1 loss increases sensitivity to DNA damage and consequently promotes murine and human B cell acute leukemia, **Blood**, 129(14):1958-1968, 2017. doi: 10.1182/blood-2016-07-726216. 査読有
 6. Kamel W, Sugihara E, Nobusue H, Yamaguchi S-Iwai S, Onishi N, Maki K, Fukuchi Y, Matsuo K, Muto A, Saya H, Shimizu T. Simvastatin-induced apoptosis in osteosarcoma cells: a key role of RhoA-AMPK-p38 MAPK signaling in antitumor activity. **Mol Cancer Ther.** 16(1):182-192, 2017. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0499. 査読有
 7. Thanee M, Loilome W, Techasen A, Sugihara E, Okazaki S, Abe S, Ueda S, Masuko T, Namwat N, Khuntikeo N, Titapun A, Pairojkul C, Saya H, Yongvanit P. CD44 variant-dependent redox status regulation in liver fluke-associated cholangiocarcinoma: a target for CCA treatment. **Cancer Sci.** 107(7):991-1000, 2016. doi: 10.1111/cas.12967. 査読有
 8. Fukaya R, Ohta S, Yaguchi T, Matsuzaki Y, Sugihara E, Okano H, Saya H, Yutaka Kawakami Y, Kawase T, Yoshida K, Toda M. MIF is an essential factor in tumorigenicity and maintenance of brain tumor-initiation cells. **Cancer Res.** 76(9):2813-2823. 2016. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1011. 査読有
 9. Kakehashi A, Ishii N, Sugihara E, Min G, Saya H, Wanibuchi H. CD44v9 is a potential biomarker of tumor initiating cells predicting survival outcome in HCV-positive patients with resected HCC. **Cancer Sci.** 107(5):609-618, 2016. doi: 10.1111/cas.12908. 査読有
 10. Adachi T, Kobayashi T, Sugihara E, Yamada T, Ikuta K, Pittaluga S, Saya H, Amagai M, Nagao K. Hair follicle-derived IL-7 and IL-15 mediate skin-resident memory T cell homeostasis and lymphoma. **Nat Med.** 21(11):1272-1279, 2015. doi: 10.1111/cas.12908. 査読有
 11. Fukuda K, Sugihara E, Ohta S, Izuhara K, Funakoshi T, Amagai M, Saya H. Periostin Is a Key Niche Component for Wound Metastasis of Melanoma. **PLoS One.** 10(6):e0129704, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0129704. 査読有
 12. Yamaguchi SI, Ueki A, Sugihara E, Onishi N, Yaguchi T, Kawakami Y, Horiuchi K, Morioka H, Matsumoto M, Nakamura M, Muto A, Toyama Y, Saya H, Shimizu T. Synergistic antiproliferative effect of imatinib and adriamycin in platelet-derived growth factor receptor-expressing osteosarcoma cells. **Cancer Sci.** 106(7):875-882, 2015. doi: 10.1111/cas.12686. 査読有
- 〔学会発表〕(計 6 件)
1. Sugihara E, Hashimoto N, Osuka S, Ueno S,

- Shimizu T, Okamoto S, Saya H. Livin confers the resistance to lymphoma-suppressive barrier by Fas restoration. 第 76 回日本癌学会学術総会, 2017 年 9 月 30 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
2. Sugihara E, Hashimoto N, Osuka S, Ueno S, Shimizu T, Okamoto S, Saya H. Targeting Livin with Fas-signal restoration is a potential therapy for Non-Hodgkin Lymphomas. 第 78 回日本血液学会学術集会, 2016 年 10 月 14 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
 3. Sugihara E, Hashimoto N, Osuka S, Ueno S, Shimizu T, Okamoto S, Saya H. Development of a new mouse model for mature B cell lymphoma and resistance to Fas restoration-triggered apoptosis. The 58st annual meeting of American Society of Hematology (ASH), 12/3/2016, San Diego, USA.
 4. Sugihara E, Hashimoto N, Ueno S, Shimizu T, Saya H. New mouse lymphoma model reveals the requirement for Fas downregulation in initiation and maintenance of lymphoma cells. 第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 8 日、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)
 5. Sugihara E, Hashimoto N, Ueno S, Saya H. New mouse model for mature B cell lymphoma revealing requirement for Fas downregulation in lymphomagenesis. 20th Congress of European Hematology Association (EHA), 6/11/2015, Vienna, Austria.
 6. Sugihara E, Hashimoto N, Ueno S, Saya H. Novel mouse model for mature B cell lymphoma reveals the requirement for Fas downregulation in lymphomagenesis. Annual meeting American Association for

Cancer Research (AACR), 4/18/2015, Philadelphia, USA.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.genereg.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉原 英志 (SUGIHARA EIJI)
筑波大学・国際産学連携本部・助教
研究者番号 : 50464996