

学内グラント 報告書

平成25年度 学内グラント終了時報告書

難治性悪性リンパ腫の増殖機構の解明と新たな治療法の開発

研究代表者 森 茂久 (医学教育センター)

緒言

悪性リンパ腫の治療成績は近年向上しているが、いまだに難治性、治療抵抗性の悪性リンパ腫が多く存在している。難治性、治療抵抗性となった悪性リンパ腫の一つの病態として「白血化」悪性リンパ腫が挙げられる。悪性リンパ腫の「白血化」は本来リンパ節で腫瘍を形成するリンパ腫細胞が治療経過中に末梢血中に出現、増殖する状態である。白血化が治療経過中に出現した場合には難治性であり、follicular lymphomaを除くと、いずれも予後不良である。また初発時にすでに白血化した状態では臨床病期IV期と進行期で、治療に抵抗性で治癒には至りにくい。

難治性、治療抵抗性を呈する悪性リンパ腫白血化の機序については知見は乏しい。リンパ節を場とし腫瘍を形成し増殖する悪性細胞が末梢血中で増殖する機序として、一つはリンパ系から血管系への侵入、そして「リンパ」節という増殖の支持環境が無い状態で血管内増殖が可能となる増殖機構の獲得がある。Dolcetti¹⁾らはマウスの系でT-lymphoblastic lymphomaでは、細胞接着分子である $\alpha 4 \beta 7$ の発現が白血化に関与することを報告している。白血化の過程は複雑であり、その他にも原因が複数存在することが考えられている。悪性リンパ腫細胞の白血化、血管内増殖の病態には、接着分子の関与が指摘されているが、その実態は不明である。白血化の病態解明が遅れている大きな原因として良好なモデルが無いことが挙げられる。増殖機構、特に血管内での増殖機構を解明することによって、その知見を元に有用なモノクローナル抗体や低分子薬を得られる可能性がある。

一方、血管内リンパ腫 (Intravascular Lymphoma: IVL) は、基本的に小血管腔内、特に毛細血管内に腫瘍細胞が存在するという特徴を持つ。CD29 ($\beta 1$ -integrin), CD54 (ICAM-1) などの接着因子発現の消失が血管外に遊走できずに血管内で増殖する原因であるとするPonzoni²⁾らの説もあるが、CD29, CD54が消失していないIVL症例もある。

IVL細胞には以下の特徴があり、血管内での細胞増殖機構解明への手がかりになると考えられる。

1) 血管内指向性: 血管内の方がgrowth advantageがある、血管外への浸潤能が弱い、またリンパ節へのホーミング能が弱い。2) 塊状増殖: 細胞間接着が強い。他の腫瘍でみられる血管内の腫瘍塞栓との病態が近似する。

本研究の大目標: 我々はIVL細胞株, SMCH-12を樹立したが、調査した限りにおいてIVL細胞株の樹立報告はない。SMCH-12の細胞生物学的解析を行い、血管内で増殖する機構に関連する知見を得る。IVL細胞株に特異的に発現する遺伝子群を解析し、血管内増殖機構に関与する重要な遺伝子群を明らかにする。他方、種々のリンパ腫細胞株との比較を行うことによって、血管内増殖にとって普遍的に重要な遺伝子群を見つけ出せると考えられる。またIVL細胞株を用いてIVLのモデルマウス作製を試みる。

増殖機構、特に血管内での増殖機構を解明し、その知見を元に有用なモノクローナル抗体や低分子薬を得ることにより、悪性リンパ腫の白血化、腫瘍細胞の血管内増殖を阻止する新たな治療法を開発できる可能性がある。微量な白血化の阻止は悪性リンパ腫細胞のリンパ節外での増殖阻止につながり、ひいては病期の進行を食い止めるか、少なくとも遅らせることにつながることを期待される。ことに最近増加している高齢な悪性リンパ腫の患者では、腫瘍の根絶である治癒を望みにくく、腫瘍の進展をいかに遅らせるかが治療戦略上の鍵となる。悪性リンパ腫の血管内増殖を阻害し、白血化を阻止する薬剤の開発が可能となれば、限局期から進行期への進展を阻止、あるいは遅らせることができ、治癒率向上、また治癒に至らなくとも寿命を延長することが可能となると考えられる。

今回学内グラント終了時報告における実験目的: CD29 ($\beta 1$ -integrin), CD54 (ICAM-1) などの接着因子発現の消失が血管外に遊走できずに血管内で増殖する原因とするPonzoni²⁾らの説をもとに、逆にCD29を発現するIVL細胞株SMCH-12におけるCD29発現と増

殖の関係を検定した。まず細胞接着機能を阻害する抗CD29抗体を用いて、その影響を検定した。CD29抗原は、130 kDaのインテグリン β 1鎖で、インテグリン α 1~ α 8と α Vサブユニットと非共有結合的に結合したヘテロダイマーとして発現する。CD29複合体は、CD29に結合する α 鎖に依存して、細胞間および細胞と細胞外マトリックスの接着を媒介する。今回用いたCD29抗体であるclone 4B4はCD29を介する接着に対して、接着を阻害する。

材料と方法

(1) IVL細胞株の基本特性の解析

細胞株：SMCH-12. 抗体：細胞表面マーカー用の各種モノクローナル抗体. 染色体, FISH解析：検査会社に委託。

(2) 細胞接着阻害実験

細胞株：SMCH-12. CD29抗体(clone 4B4, ベックマン・コールター社). 約 1×10^5 /mlの細胞液を調整し、96穴プレートに各200 μ l/wellずつ分注し、CD29抗体を最小0.5%量から最大16%量まで、添加した。37°C, 5% CO₂濃度下にて3日間培養し、凝集状態、増殖状態を検定した。

結果

(1) SMCH-12細胞株の基本的特性

増殖と形態：細胞塊を形成しつつ増殖する(図1-A)。細胞形態は、細胞質が広く、細胞辺縁および核は不整形を示した(図1-B)。なおEBV感染は陰性であった。細胞表面マーカー：CD19, CD20, κ 鎖, CD5陽性であった。接着因子としてはCD29(β 1-integrin), CD54(ICAM-1), CD11a, CD18(β 2-integrin)の発現が認められた。免疫グロブリン遺伝子、重鎖、軽鎖 κ の再構成を認めた。染色体解析：t(9;19)(q13;q11;q22), t(11;13)(q21;q21), などの多彩な異常を認めた。

(2) 細胞接着阻害実験

CD29抗体を最小0.5%量から最大16%量まで添加したが、細胞凝集状態、細胞増殖状態に差異は認められなかった。

考察

SMCH-12においてCD29(β 1-integrin)を介した細胞接着を抗体で阻害しても凝集塊は形成されず、増殖状態にも影響は無かったことより、血管内増殖にCD29は大きな関与は無いと考えられる。今後、マイクロRNAを用いてCD29発現を抑制する実験を計画中である。また、CD54を介する接着を阻害する実験も予定している。

本研究について今後はGFPやLacZを恒常的に発現

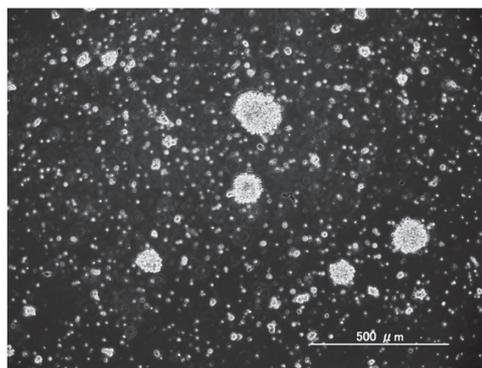


図1-A. SMCH-12の増殖像。位相差顕微鏡を用いて観察。SMCH-12は凝集塊を形成しながら増殖していた。

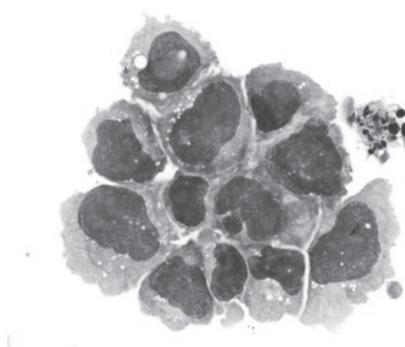


図1-B. SMCH-12の形態像。サイトスピン標本。May-Giemsa染色。細胞質が広く、細胞辺縁および核は不整形を示した。

するIVL細胞株の作成を行う予定で、現在SMCH-12へのGFP発現ベクター遺伝子導入のための基礎的実験を行っている。このマーカーを発現する細胞株を用いて、マウスモデルの作製を試みて、IVLモデルマウスを用いて血管内増殖を阻害する薬剤の検定を行う計画である。

謝辞

本研究に対して多大な御支援、御協力をいただいた総合医療センター血液内科、大学病院血液内科の先生方に深謝いたします。

参考文献

- 1) Dolcetti R, et al. Establishment and characterization of a leukemic murine cell line derived from MCF 247 MuLV-induced T-cell lymphoma. *Int J Cancer* 1990 May 15;45(5):928-34.
- 2) Ponzoni M, et al. Lack of CD 29 (beta1 integrin) and CD 54 (ICAM-1) adhesion molecules in intravascular lymphomatosis. *Hum Pathol* 2000 Feb;31(2):220-6.