

氏名	笠井 慎
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	医工博4甲 第240号
学位授与年月日	平成30年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
専攻名	先進医療科学専攻
学位論文題名	Inflammatory mediator ultra-low-molecular-weight hyaluronan triggers necrosis of B-precursor leukemia cells with high surface CD44 expression (炎症メディエーター超低分子量ヒアルロン酸は CD44 高発現 B 前駆型白血病細胞にネクロシスを誘導する)
論文審査委員	委員長 教授 小田 賢幸 委員 准教授 新藤 和雅 委員 講師 古屋 文彦

学位論文内容の要旨

(研究の目的)

MLL遺伝子再構成陽性急性リンパ性白血病 (*MLL*+*ALL*)は化学療法に抵抗性を示し、依然として予後不良である。特異的な遺伝子発現を示し、高発現遺伝子としてCD44やFMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3)などが知られている。CD44は細胞内domainを持つ1回膜貫通型糖蛋白質でリンパ球のホーミング、細胞凝集、細胞-細胞間接着、Hyaluronan (HA)の細胞内への取り込みと分解、癌細胞の増殖・転移などに関与している。標準型CD44 (CD44s)はヒト細胞のほぼ全ての細胞膜に発現しており、発現量は組織により異なる。CD44 variant isoforms (CD44v)はある種の癌細胞で高発現している。HAはCD44のligandであり、分子量は最大で 2.0×10^7 Daに及ぶ高分子glycosaminoglycanである。HAは分子量により作用が異なる。我々は*MLL*+*ALL*に高発現しているCD44を様々な分子量のHAで刺激することによる生物学的特性について検討した。

(方法) ①*MLL*+*ALL*細胞株8株を用いて細胞表面のCD44発現をflow cytometry法で検討した。CD44高発現*MLL*+*ALL*細胞株を様々な分子量のHAで刺激しthymidine uptake法で検討した。② CD44 高発現 *MLL*+*ALL* 細胞株を CRISPR/CAS9 を用いて CD44 knock down させ、ultra-low-molecular-weight HA (ULMW-HA) 刺激後に thymidine uptake 法で検討した。③ B-precursor ALL細胞株及びT-cell ALL細胞株でも同様の結果が得られるかflow cytometry法によるCD44の発現量とthymidine uptakeとの関連を解析した。④RT-PCRを用いてALL細胞株のCD44 splice variants mRNAを解析した。CD44v8-10 mRNA高発現細胞株の細胞表面

CD44v8-10の発現を確認するために抗CD44v9抗体を用いてflow cytometry法で検討した。⑤ CD44高発現*MLL*+ALL細胞株にULMW-HA刺激による細胞回転への影響をflow cytometry法で解析した。⑥ CD44高発現*MLL*+ALL細胞株でULMW-HA刺激による細胞数とviabilityの変化をdye exclusion法を用いて解析した。また、細胞死をAnnexinV/PI法を用いて検討した。⑦ ULMW-HA刺激による細胞死がapoptosisによる可能性を除外するためにanti-cleaved caspase-3抗体を用いてflow cytometry法で検討した。また、pan caspase inhibitorであるZ-VAD-FMKを用いてthymidine uptake法で検討した。⑧ CD44高発現*MLL*+ALL細胞株をULMW-HA刺激後にnecrosis inhibitorであるnecrostatin-1及びautophagy inhibitorである3-methyladenine (3-MA)を添加しthymidine uptake法で検討した。⑨ necrosis markerであり炎症性サイトカインでもあるhigh-mobility group box 1 protein (HMGB1)を確認するために、CD44高発現*MLL*+ALL細胞株をULMW-HA刺激3日後に染色した。また、定量解析するためにELISA法を用いて検討した。⑩ CD44高発現*MLL*+ALL細胞株をULMW-HA刺激3日後に電子顕微鏡を用いて検討した。⑪ western blot法を用いてULMW-HA刺激後のシグナル解析を行った。⑫ 細胞死の過程で産生されるreactive oxygen species (ROS)をflow cytometry法で解析した。⑬ 新鮮ALL細胞を用いて*MLL*+ALL細胞株と同様に細胞死が誘導されるかCD44の発現量とULMW-HA刺激後のviabilityをflow cytometry法で解析した。またthymidine uptake法及びAnnexinV/PI法で検討した。

(結果) ① *MLL*+ALL細胞8株のうち6株でCD44は高発現していた。CD44高発現*MLL*+ALL細胞株をULMW-HAで刺激したところthymidine uptakeは抑制された。しかし、high-molecular-weight HA (HMW-HA)及びlow-molecular-weight HA (LMW-HA)では抑制されなかった。② CD44KD細胞株でthymidine uptake抑制は解除された。ULMW-HA刺激によるthymidine uptake抑制はCD44を介していることが判明した。③ B-precursor ALL細胞株でCD44発現とthymidine uptake抑制に正の相関を認めた。一方、T-cell ALLではCD44を発現していても細胞死は誘導されなかった。④ 全ての細胞株で標準型CD44 (CD44s) mRNAは発現していた。*MLL*+ALL細胞株2株とT-cell ALL細胞株1株でCD44v8-10 mRNAは発現していた。しかし細胞表面CD44v9の発現とthymidine uptake抑制に相関は認められなかった。⑤ ULMW-HA刺激による細胞回転に変化はなく、subdiploid分画の増加も軽度であり、ULMW-HA刺激によるthymidine uptake抑制は細胞回転の停止によるものではなく、apoptosis以外の細胞死誘導によるものと考えられた。⑥ ULMW-HA刺激により徐々に細胞数とviabilityは低下し4日目で10%以下となった。AnnexinV/PIではULMW-HA刺激により4日目で死細胞は70%程度まで上昇した。⑦ 4日目でanti-cleaved caspase-3抗体により染色された細胞は認められなかった。Z-VAD-FMK添加によりthymidine uptakeに大きな変化は認められなかった。細胞死にapoptosisは関与していないことが判明した。⑧ necrostatin-1添加によりULMW-HA刺激によるthymidine uptake抑制は解除された。一方、3-MAの添加でthymidine uptake抑制はやや増強した。従ってULMW-HA刺激による細胞死はnecrosisによるものであることが示唆される。⑨ ULMW-HA刺激後3日目で細胞質内にHMGB1は蓄積されていた。定量により細胞外へ放出されたHMGB1は徐々に増加し、4日目でpositive controlである熱処理後のHMGB1レベルを上回った。⑩ 全細胞の約30%でnecrosisに特徴的な細胞死を認めた。生細胞の約30%は小胞体ストレス (ER stress)を示唆する形態変化を、約10%はautophagyを示唆す

る autophagosome と lysosome が融合した autophagosome を認めた。⑪ ULMW-HA 刺激 30min 後に MAPK と Akt は著明にリン酸化されており、CD44-ULMW-HA interaction によるシグナル活性によるものと考えられる。⑫ ULMW-HA 刺激により ROS レベルは徐々に増加し 4 日目で ULMW-HA 刺激前のおよそ 5 倍まで増加した。ULMW-HA 刺激による necrosis 誘導に ROS 産生が関与していると考えられる。⑬ CD44 高発現新鮮 ALL 細胞において 1 例を除く 5 例で CD44 は高発現し、ULMW-HA 添加で有意に viability は減少した。CD44 高発現新鮮 ALL 細胞においても ULMW-HA 刺激により thymidine uptake は抑制され、AnnexinV/PI で生細胞は減少した。

(考察) CD44 高発現 B-precursor ALL 細胞において ULMW-HA 刺激は necrosis を誘導することが判明した。CD44 高発現白血病細胞は ULMW-HA により刺激を受けると necrosis が誘導され HMGB1 が放出される。放出された HMGB1 は炎症性サイトカインとして機能するとともに、その他のサイトカインを誘導する。炎症部位では、このサイトカイン刺激により間葉系細胞は ULMW-HA を大量に放出し、CD44-HA 相互作用はより増強される。このように ULMW-HA 刺激に始まる positive feedback loop が形成されることで白血病細胞が necrosis へ誘導されることが示唆される。発熱を伴う感染症や炎症を機に白血病を含む悪性腫瘍が一時的に退縮する症例が多数報告されている。その過程に ULMW-HA loop による necrosis 誘導が関与している可能性がある。ULMW-HA の機能を模した小分子化合物や抗 CD44 抗体の開発により CD44 を標的とした CD44 高発現癌細胞への治療が可能となるかもしれない。

(結論) CD44 高発現 B-precursor ALL 細胞は ULMW-HA 刺激により necrosis が誘導される。

論文審査結果の要旨

Acute lymphoblastic leukemia with Mixed lineage leukemia gene rearrangements (*MLL+ALL*) は予後不良の白血病として知られ、通常の ALL や AML と比較して、遺伝子発現パターンも異なる。笠井氏は、*MLL+ALL* 細胞で特に高く発現している CD44 に注目し、そのリガンドであるヒアルロン酸刺激による *MLL+ALL* 細胞の応答を解析した。その結果、高濃度の ultra-low molecular weight hyaluronan (ULMW-HA) により、*MLL+ALL* 細胞は necrosis 様の細胞死が誘導され、これが CD44 依存的な応答であることが示された。

新藤委員

質問 1 *MLL+ALL* が予後不良な理由は何か。

回答 1 *MLL+ALL* は他の ALL と比較して遺伝子発現が異なり、病態の相違性も大きい可能性が高いため、従来の治療に対し抵抗性を示していると思われる。

質問 2 ULMW-HA よりも分子量の大きい HA に対する反応性は調べたか。

回答 2 High molecular weight-HA, low molecular weight-HA 共に、*MLL+ALL* 細胞は反応しなかった。

質問 3 炎症に対する HA の効果はどのようなものか。

回答 3 ULMW-HA は炎症を促進するが、HMW-HA は炎症を抑制する。

質問4 Table 1において、症例によって ULMW-HA の応答にばらつきがあるのはなぜか。

回答4 患者から採取した細胞なので培養直後に死ぬものが多く、生き残った少数の細胞で比較しているのではばらつきが大きくなる。

質問5 *MLL+*以外の ALL でも HA による応答は期待されるか。

回答5 CD44 発現量が高ければ期待される。

古屋委員

質問1 KOPN1 などの細胞株は monoclonal なのか。CD44 の発現量は株内で一様なのか。

回答1 Monoclonal ではあるが、CD44 の発現量にはばらつきがある株も存在する。

質問2 T-cell 系では ULMW-HA に対する応答が見られなかったのはなぜか。

回答2 T-cell 系と B-cell 系では signal transduction の機構が異なることが知られている。

質問3 CD44 variants の HA に対する親和性は、標準型 CD44 と異なるのか。

回答3 親和性を定量はしていないが、CD44 variants は標準型にドメインが付加されたものなので親和性に大きな差は無いと期待される。

質問4 株によって CD44 の発現量にばらつきがあるが、necrosis の誘導の効率と CD44 発現量に相関はあるか。

回答4 Necrosis 誘導と CD44 発現量には正の相関がある。

質問5 Akt にリン酸化が見られたということだが、リン酸化 Akt は cell proliferation に関係するのではないか。30 分後ではなく、long-term で観察するとリン酸化に違う変化が起こるのではないか。

回答5 今回観察してるリン酸化の signal transduction は signaling cascade の最初の部分であるから、刺激直後の変化が最も重要である。

小田委員

質問1 Tumor において HA 分泌亢進の意義は何か。

回答1 組織中の HMW-HA を取り込んで ULMW-HA に分解する過程を利用して、ROS の還元を行っている。

質問2 ULMW-HA の濃度を 1.0mg/ml 以下にした場合、thymidine uptake inhibition が enhancement に反転する可能性は無いか。

回答2 ULMW-HA 1.0mg/ml に対する細胞の応答は対照群とほとんど変わらないため、濃度を低下させても反応は見られないと思われる。

質問3 ROS が necrosis の原因ならば、apoptosis ではなく necrosis を起こさせる factor は何か。

回答3 RIP kinase を軸として、apoptosis と necroptosis を相互に阻害する仕組みが存在すると考えられている。

以上、審査員の質問に対して的確な回答を得た。