

論文内容の要旨

論文題目

リンパ腫増殖における線維素溶解系の役割の解明と新規治療法の開発(**Role of fibrinolytic system in lymphoma progression; implication for new molecular targets**)

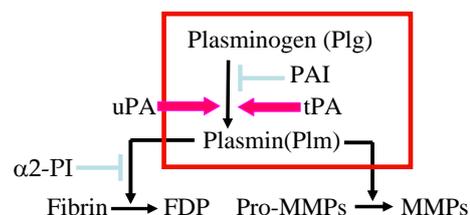
氏名

石原誠人

【研究背景】

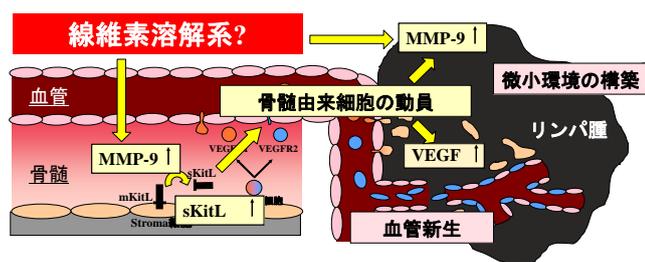
悪性リンパ腫はリンパ球に由来する悪性腫瘍であり、ホジキンリンパ腫と非ホジキンリンパ腫に大別される。悪性リンパ腫は年に 21,000 人ほどの発症報告があり、うち 9,200 人ほどが亡くなっている(2003 年、2006 年 国立がんセンターがん対策情報センター)。悪性リンパ腫の病態と治療に関する知見は徐々に集まりつつあるもののすべての患者を治癒できるとい

うレベルには程遠く、さらなる治療法の改善が望まれている。近年ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫患者に於いて金属要求性メタロプロテアーゼ(MMPs)の血中濃度の上昇が報告され、悪性リンパ腫と MMP の関連が示唆されている。MMPs は 24 種類以上のサブタイプが存在し、癌増殖において増殖、転移など様々なプロセスに関与していることが明らかとなっており、リンパ腫を含めた癌治療に有用な標的因子と考えられてきた。しかし現在までに開発されてきた MMP 阻害剤はその非特異性に依存すると考えられる副作用により治療効果が得られる投与量での治療が難しく、新規の MMP 制御機構の開発が急務とされている。血液線維素溶解系(線溶系：図 1)は血液中における血栓溶解作用が主に知られている一方、線溶系因子の一つであるプラスミノゲン(Plg)/プラスミン(Plm)は MMPs の生理学的な制御因子であることが近年 *in vitro* で明らかにされている。また、臨床レベルでもリンパ腫患者において血液中での線溶系亢進を示唆する臨床報告が数多くなされ、MMP の上流に位置する線溶系のリンパ腫増殖における意義が注目され始めている。発表者及び共同研究者らのグループはこれまでの研究で MMPs、特に血管基底膜の主に構成するIV型コラーゲンを基質とする MMP-9 の活性化によって末梢組織中に動員される骨髓由来細胞が VEGF の供給を介して血管新生を促進し、組織再生を促進すること(Heissig et. al. Cell Stem Cell 2007, Ohki et. al. Faseb J. 2005)を報告してきた。さらに MMPs の活性化が、こうした骨髓由来細胞群の増殖因子として機能する Kit-ligand(KitL)のプロセシ



(図 1)線維素溶解系

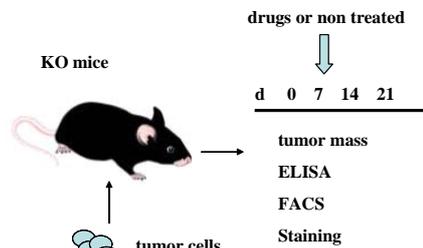
ングを促進する事実を明らかにしてきた(Heissig et. al. Cell 2002)。1970年代より Folkman らによって癌増殖における血管新生の重要性が提唱され、リンパ腫を始めとした癌増殖において血管新生の阻害は癌治療の重要な標的とされてきた。VEGF は血管新生因子の一つとして知られ、骨髄由来細胞は近年 VEGF を初めとした癌増殖性サイトカインの放出を介して癌増殖を促進し、癌細胞に有利な「癌微小環境」を提供していることが報告されてきている。そこで発表者は生体内線溶系亢進を MMP 活性化を介したリンパ腫細胞の浸潤あるいは転移、増殖の開始点と捕らえ、本研究においては Plg/Plm による MMP 活性化を介した骨髄由来細胞群のリンパ腫組織への浸潤とリンパ腫増殖ないしリンパ腫微小環境形成との関連性の解明(図2)、さらにこれらの知見を基礎とした、線溶系因子群を標的とした新規の分子療法開発を目的とした。



(図2)本研究の仮説

【研究方法】

マウス悪性リンパ腫細胞である B6RV2、EL4 を Plg(Plg^{-/-}), MMP-9(MMP-9^{-/-})遺伝子欠損マウス及びこれらの野生型の背部皮下へ移植し、担癌モデルを作製した。リンパ腫増殖、進展の状況を YO-2、トランサミンなどの線溶系阻害剤の薬効と照らし合わせながらその腫瘍径の測定及び線溶系、MMP-9 リンパ腫増殖の関係を観察した。またこれらのリンパ腫モデルから一週間毎に血漿を採取し ELISA の手法を用いて KitL、VEGF などのサイトカインのレベルを測定した。なお組織染色に関しては各種骨髄由来細胞の染色を行いリンパ腫組織内における骨髄由来細胞の浸潤を評価した。

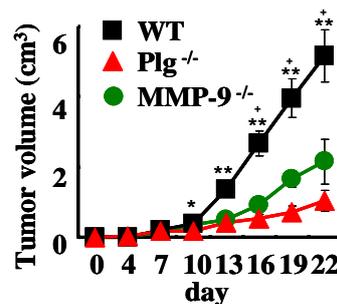


(図3)研究方法

【結果】

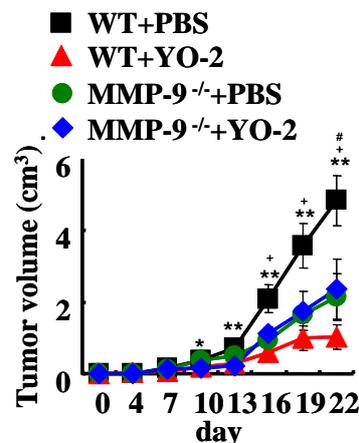
1. リンパ腫増殖は Plg/MMP-9 経路によって制御される。

WT と Plg^{-/-}、MMP-9^{-/-}でマウスリンパ腫の一種である B6RV2 の担癌マウスを作成し、その増殖を観察したところ、WT に比べ Plg^{-/-}、MMP-9^{-/-}では B6RV2 の増殖が抑制されることが確認された(図4)。この結果から Plm 及び MMP-9 が B6RV2 の増殖を促進していることが確認された。発表者は次に Plm によるリンパ腫増殖制御が MMP-9 を介して起こるものと考えた。そこで発表者は WT と MMP-9^{-/-}で同様



(図4)リンパ腫の増殖 1

に B6RV2 の担癌マウスを作成し、Plm 阻害剤(YO-2)によるリンパ腫増殖抑制効果を観察した。その結果 WT では YO-2 によるリンパ腫増殖の抑制効果が見られたものの、MMP-9^{-/-}では見られなかった(図 5)。また、WT と Plg^{-/-}の担癌マウスの末梢血中の活性化 MMP-9 を ELISA を用いて測定した所、WT ではリンパ腫細胞移植後 7 日目をピークに MMP-9 のレベル増加が観察されるのに対し、Plg^{-/-}ではこの増加が観察されなかった。また野生型の担癌マウスに YO-2 を投与したモデルでは Plg^{-/-}同様に血漿中の MMP-9 のレベルの上昇が観察されなかった。当初、仮説では Plm による MMP-9 の活性化がリンパ腫の増殖をコントロールしているものと考えていたが、これら ELISA の結果やマウス胎児性繊維芽細胞は Plm による刺激で MMP-9 の産生量が増加することなどから Plm は直接 MMP-9 の産生量を増加させているものと考えられる。これらの結果から発表者は Plm が MMP-9 の産生増加を通じてリンパ腫増殖に関与していることを示唆した。また EL4 リンパ腫細胞を用いたモデルでは WT と Plg^{-/-}のモデル間で優位な差はなかった。

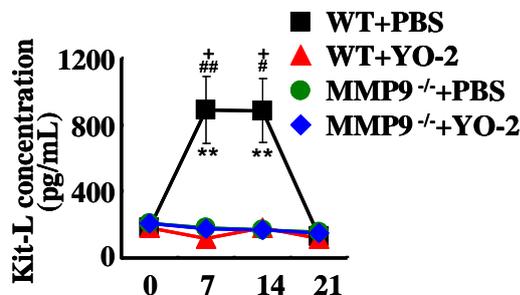
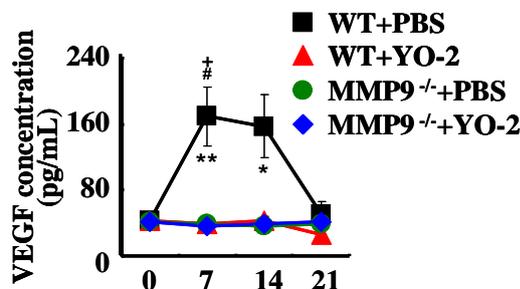


(図 5)リンパ腫の増殖 2

2. サイトカイン産生及びリンパ腫組織中への CD11b⁺F4/80⁺細胞の浸潤は Plg/MMP-9 経路によって制御される。

発表者は前章において用いたリンパ腫モデルを使い、KitL や VEGF などの血漿中のサイトカインの濃度測定を行った。この結果、

KitL や VEGF は野生型ではリンパ腫細胞移植後 14 日前後をピークに血漿中のレベルが上昇するのに対して Plg^{-/-}、MMP-9^{-/-}及び野生型、MMP-9^{-/-}リンパ腫モデルを YO-2 で治療したものはこの上昇が観察されなかった(図 6)。これらの結果は、リンパ腫増殖と同様に KitL や VEGF の血漿中の濃度は Plg/MMP-9 経路によって制御されていることが明らかとなった。次に発表者は CD45⁺VEGF-R1⁺CXCR4⁺ (hemangiocytes), CD45⁺VEGF-R1⁺Gr-1⁺ (neutrophils), CD45⁺VEGF-R1⁺CD11b⁺ (monocytes), CD45⁺CD11b⁺Gr-1⁺ (myelomonocytic cells) and CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺ (macrophages and eosinophils) cells などの骨髓由来細胞のリ



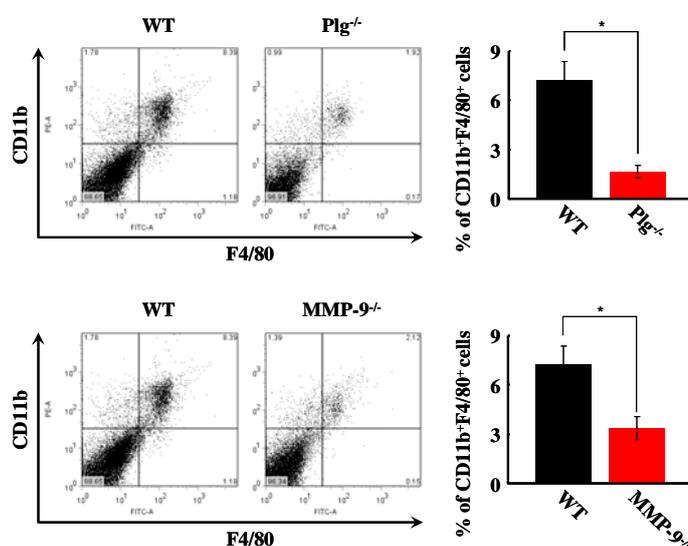
(図 6)血漿中のサイトカイン

リンパ腫組織への浸潤の相違に注目した。発表者は WT と *Plg^{-/-}*、*MMP-9^{-/-}* を使い B6RV2 リンパ腫モデルを作製し、リンパ腫移植後 7 日目にリンパ腫組織を破碎し、リンパ腫組織中に各種骨髄由来細胞の量をフローサイトメトリーを用いて計測した。その結果、 $CD45^+CD11b^+F4/80^+$ の細胞群のリンパ腫組織内への浸潤が野生型において顕著に観察され、野生型と比較し *Plg^{-/-}*、*MMP-9^{-/-}* におけるリンパ腫内への浸潤が有意に減少することが観察された(図 7)。リンパ腫増殖同様これらの細胞群の浸潤が *Plg/MMP-9* の経路によって制御されている可能性を考え、WT と *MMP-9^{-/-}* のリンパ腫モデルにおける YO-2 の $CD45^+CD11b^+F4/80^+$ 浸潤阻害効果をみた。この結果 WT においてはこれらの細胞群の浸潤が YO-2 によって阻害されるのに対し、*MMP-9^{-/-}* のリンパ腫モデルではこれらの細胞群の浸潤を抑えることはできなかった。免疫組織染色においてもリンパ腫細胞移植後 7 日目のリンパ腫組織への $F4/80^+$ 細胞の浸潤が同様の傾向をしめしており、これらの結果から、骨髄由来細胞のリンパ腫組織への浸潤はリンパ腫増殖同様、*Plg/MMP-9* 経路によって制御されている可能性が示唆された。

【結論】

本博士論文によって発表者は①リンパ腫増殖が *Plg/MMP-9* 経路によって制御されること、②リンパ腫組織中に浸潤している $CD11b^+F4/80^+$ 細胞の数は *Plg/MMP-9* 経路によって

制御されることを明らかにした。今後はリンパ腫増殖と $CD11b^+F4/80^+$ 細胞のリンパ腫組織への浸潤の関連性の解明、ならびに転移・悪性化への *Plg/MMP-9* 経路の寄与の解明、及び各癌種の *Plg/MMP-9* 経路の寄与の大きさの検討を行っていきたい。本研究はリンパ腫細胞動態・増殖機構に関連性が高い MMP の活性を線溶系因子群によって制御することができる可能性に注目して始められた。トラネキサム酸に代表される線溶系阻害剤は従来から止血剤として一部臨床でも使用され、副作用が少ないという点で安全性が確認されている。これら線溶系活性を標的する薬剤を止血剤としての本来の利用方法から視点を変え、MMP 制御を介したリンパ腫を始めとする癌治療へと応用を試みた本研究の着想は非常に独創的なものであり、本研究によって得られた結果は次世代型癌治療法開発と基礎研究として、さらに癌の病態解明の点でも多くの意義を持っていると考えられる。



(図 7) $CD45^+CD11b^+F4/80^+$ 細胞の浸潤