

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590364

研究課題名(和文) 腫瘍幹細胞に立脚した腫瘍の性格付けに関する研究

研究課題名(英文) Characterization of tumors from the viewpoint of tumor stem cells

研究代表者

森井 英一 (MORII EIICHI)

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：10283772

研究成果の概要(和文)：腫瘍は単一クローンだが、構成する細胞の性格は異なる。化学療法など治療抵抗性の腫瘍幹細胞と呼ばれる一群の細胞は再発の原因となり、診断時にその存在量などを明らかにできれば適切な治療計画の一助となると考えられる。ところが、腫瘍幹細胞を病理診断時に評価する方法はこれまでなかった。そこで、本研究では腫瘍幹細胞マーカーを免疫組織化学的に検索することで、腫瘍幹細胞に立脚した腫瘍の性格付けが可能か検討した。その結果、種々の腫瘍で腫瘍幹細胞の多寡が予後に影響を与えることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Tumor is composed of a single clone, but the character of individual tumor cells is different one another. Tumor stem cells are resistant to various anti-tumor therapies, and are responsible for recurrence. The evaluation of the amount of tumor stem cells at diagnosis would be helpful for suitable plan of anti-cancer therapy. However, to date, no such evaluation system was established. Here, we evaluated the amount of tumor stem cells by immunohistochemistry, and revealed that cases with rich tumor stem cells showed poor prognosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：腫瘍幹細胞、病理診断、予後解析

1. 研究開始当初の背景

腫瘍は単一クローンで構成されることより均一な性格をもつものと考えられてきたが、詳細な解析より一つの腫瘍を構成する腫瘍細胞は各々異なる性質をもつことが明らかにされてきていた。化学療法や放射線療法などの抗腫瘍療法を行った際、大半の腫瘍細胞は死滅するが、治療に抵抗する特有の性格をもつ一群の細胞が生存し、いずれ腫瘍の再発

の原因になることがわかっていて、これらの治療抵抗性の細胞群を腫瘍を開始することのできる性格をもつ細胞という意味で、cancer initiating cell あるいは cancer stem cell (腫瘍幹細胞) と呼ぶ。しかし、具体的にそれらの細胞群を規定するマーカーはほとんど報告がなく、腫瘍幹細胞の観点にたつて腫瘍を個別化することはまだほとんど行われていなかった。

2. 研究の目的

腫瘍幹細胞を規定するマーカーを見出し、病理診断時に腫瘍幹細胞の多寡を明らかにすることで腫瘍の性格付けを行い、適切な治療に対する情報を与えることを目的とする。

3. 研究の方法

種々の腫瘍由来細胞株を用いて、腫瘍幹細胞が豊富に含まれていることがわかっている画分を単離する。次に、単離された画分に特異的、あるいは高レベルに発現する遺伝子を同定し、腫瘍幹細胞のマーカーを検索する。同定したマーカーが腫瘍幹細胞の描出に利用可能かどうか、このマーカーを高発現する細胞とほとんど発現しない細胞の腫瘍形成能や浸潤能を検討することで確認する。更に、このマーカーを免疫組織化学的に病理検体で描出し、腫瘍幹細胞の多寡が予後に与える影響を解析する。

4. 研究成果

解析対象として、食道癌（扁平上皮癌）、子宮内膜癌および肺癌（いずれも腺癌）、悪性リンパ腫（非上皮性腫瘍）を選んだ。これらの腫瘍は、上皮性腫瘍の代表的な組織型、および非上皮性腫瘍であり、解析対象の腫瘍の種類が著しく偏らないようにした。

(1) 食道癌について

食道癌検体を病理診断する際、リンパ管侵襲を検討するためにリンパ管を podoplanin 抗体にて染色することが多い。その際、podoplanin がリンパ管内皮のみならず、食道癌の一部にも発現していることを見出した。そこで、podoplanin 陽性腫瘍細胞と陰性腫瘍細胞の差異を検討した。その結果、podoplanin 陽性細胞は陰性細胞と比較して、抗がん剤に対する抵抗性があり、NOD/Scid マウスに移植した場合、大きな腫瘍を形成することがわかった。また、in vitro でもコロニー形成能が高かった。食道腫瘍細胞株で podoplanin 遺伝子をノックダウンして podoplanin の発現を低下させると、抗がん剤に対する抵抗性が減弱した。これらの結果は、podoplanin が食道癌における腫瘍幹細胞マーカーとなりうることを示唆している。そこで、食道癌臨床検体における podoplanin 発現を免疫組織化学的に検討したところ、podoplanin を高発現する症例ほど予後が悪いことが判明した。

(2) 子宮内膜癌について

① CDCP1 発現について

これまでの我々の研究より、肺腺癌においてはチロシンキナーゼ型レセプターである CDCP1 が腫瘍幹細胞マーカーとして使えるこ

とが判明していた。そこで、子宮内膜癌でも CDCP1 の発現を検討した。しかし、肺組織と異なり、子宮内膜組織では正常で CDCP1 を高発現しており、子宮内膜癌では CDCP1 の発現が低下していることが明らかとなった。予後解析を行ったところ、CDCP1 の発現が高いほど予後がよく、肺腺癌で得られたデータと全く逆であった。このことは、腫瘍幹細胞マーカーは、腫瘍の由来組織によって異なり、同じマーカーでもある組織由来腫瘍では腫瘍幹細胞を特徴づけることができるが、他の組織由来腫瘍では逆に分化マーカーであって腫瘍幹細胞マーカーとして利用できないことを示す。本研究の成果より、腫瘍の由来組織ごとに個別のマーカーを検索しないといけないことが明らかとなった。

② ALDH1 発現について

ALDH1 はアルデヒドをカルボン酸に酸化する酵素で、血液幹細胞や神経幹細胞など正常な幹細胞で高発現している。最近、ALDH1 活性の高い細胞を分離する方法が確立されたため、子宮内膜癌細胞株より、ALDH1 活性の高い細胞と低い細胞を単離し性質を検討した。その結果、ALDH1 活性の高い細胞では化学療法に対する抵抗性が高く、浸潤能、運動能ともに高いことがわかった。また、実際の臨床検体で ALDH1 陽性腫瘍細胞の多い症例ほど、リンパ節転移が多く、再発率も高く、予後も不良であった。

(3) 肺癌について

腫瘍幹細胞は薬物排泄能力が高い。このため、ヘキスト色素でラベルしても、腫瘍幹細胞は効率よく排泄してしまい、非腫瘍幹細胞と比較して細胞内のヘキスト色素の濃度が低下する。この性質を利用して、FACSにて色素濃度の低い分画(side population, SP)を単離する方法がある。肺腺癌の SP で高発現する蛋白として、核内レセプターの一つである NROB1 を見出した。NROB1 遺伝子の発現をノックダウンすると、in vitro でのコロニー形成能が低下し、NOD/Scid マウスにおける腫瘍形成能も低下する。さらに浸潤能や薬物抵抗性も減弱し、肺腺癌において NROB1 は腫瘍幹細胞マーカーとなりうることがわかった。実際の臨床検体でも、NROB1 の発現の高い腫瘍では再発率やステージが高い傾向があった。また、リンパ節への転移も高頻度にみられた。

(4) 悪性リンパ腫について

① 活性酸素除去能力を指標として

正常幹細胞では活性酸素を除去する能力が高い。腫瘍幹細胞でも活性酸素除去能力が高いことが報告されており、悪性リンパ腫のうち、ホジキンリンパ腫細胞株で、活性酸素の

低い細胞群を検討した。ホジキン細胞株は、小型単核の細胞とともに少数の大型多核細胞が存在する。検討した結果、活性酸素除去能力の高い細胞群は、小型細胞の一部で、増殖能、腫瘍形成能ともに高かった。

②ALDH1 発現について

子宮内膜癌で検討したのと同様の手法を用いて、瀰漫性大細胞性リンパ腫の腫瘍検体を用いてALDH1陽性細胞を検討した。その結果、リンパ腫そのものではなく、リンパ腫の腫瘍細胞とともに存在する炎症系の細胞でALDH1の発現が高いことがわかった。種々の二重染色で検討した結果、樹状細胞とマクロファージの一種でALDH1活性の高い分画があった。リンパ腫細胞そのものではALDH1活性の高い細胞は存在せず、瀰漫性大細胞性リンパ腫における腫瘍幹細胞マーカーの検討は今後の課題となった。

以上、種々の腫瘍における腫瘍幹細胞の多寡が腫瘍動態に与える影響を解析し、概ね腫瘍幹細胞が多い症例ほど予後不良という結果が得られた。本研究では、腫瘍幹細胞マーカーとして、細胞表面に発現する因子、ALDH1活性、SPといった色素排泄能活性、活性酸素除去能力など、複合的な因子を用いた。現在、腫瘍幹細胞のマーカーとして報告されているものは多数あり、種々の臓器によって各々異なる現状にある。様々な臓器由来の腫瘍を調べることにより、現在提唱されているマーカーの相互関係などが明らかにされるものとする。

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 14 件)

- ① ワン=イ、森井英一 (他 8 名、10 番目) Prognostic significance of elongator protein 3 (ELP3) expression in endometrioid adenocarcinoma. *Oncol Let*, in press, 査読有
- ② 藤田茂樹、森井英一 (他 5 名、2 番目) Significance of aldehyde dehydrogenase 1 expression in stromal cells of diffuse large B-cell lymphoma. *Exp Therap Med*, in press, 査読有
- ③ 小根山千歳、森井英一 (他 8 名、7 番目) MicroRNA-mediated downregulation of mTOR/FGFR3 controls tumor growth induced by Src-related oncogenic pathways. *Oncogene*, in press, 査読有
- ④ ザキ=モナ、森井英一 (他 10 名、11 番目) Presence of B-cell clones in T-cell lymphoma. *Eur J Haematol*, in press,

査読有

- ⑤ 千原剛、森井英一 (他 11 名、12 番目) Frequency of intravascular large B-cell lymphoma in Japan: study of the Osaka Lymphoma Study Group. *J Hematol Oncol*, 4;14, 2011
- ⑥ ラハディアン=ヌル、森井英一 (他 10 名、12 番目) Expression of aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) in endometrioid adenocarcinoma and its clinical implications. *Cancer Sci*, 2011;102:903-908, 査読有
- ⑦ 和田直樹、森井英一 (他 11 名、12 番目) Epstein-Barr virus in diffuse large B-cell lymphoma in immunocompetent patients in Japan is as low as in Western countries. *J Med Virol*, 2011;83:317-321, 査読有
- ⑧ 池田純一郎、森井英一 (他 6 名、8 番目) Tumorigenic potential of mononucleated small cells of Hodgkin lymphoma cell lines. *Am J Pathol* 2010;177:3081-3088, 査読有
- ⑨ 和田直樹、森井英一 (他 12 名、13 番目) Diffuse large B-cell lymphoma in the spinal epidural space: A study of the Osaka Lymphoma Study Group. *Pathol Res Pract* 2010;206:439-444, 査読有
- ⑩ ママト=スハナ、森井英一 (他 9 名、11 番目) Prognostic significance of CUB domain containing protein expression in endometrioid adenocarcinoma. *Oncol Rep* 2010;23:1221-1227, 査読有
- ⑪ ラハディアン=ヌル、森井英一 (他 8 名、10 番目) Tumorigenic role of podoplanin in esophageal squamous-cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2010;17:1311-1323, 査読有
- ⑫ 池田純一郎、森井英一 (他 5 名、7 番目) Peripheral T-cell lymphoma developing at ileocolonic anastomosis site after colectomy for adenocarcinoma. *Pathol Res Pract* 2010;206:376-378, 査読有
- ⑬ 和田直樹、森井英一 (他 9 名、11 番目) Diffuse large B-cell lymphoma with a high number of epithelioid histiocytes (lymphoepithelioid B-cell lymphoma): a study of Osaka Lymphoma Study Group. *Virchows Arch* 2009; 455:285-93, 査読有
- ⑭ 小田知文、森井英一 (他 6 名、8 番目) Tumorigenic role of orphan nuclear receptor NROB1 in lung adenocarcinoma. *Am J Pathol* 2009; 175:1235-45, 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① 小根山千歳、池田純一郎、鈴木慶、狩野

- 孝、奥崎大介、森井英一、青笹克之、岡田雅人、Srcによるがん形質発現のmicroRNAによる調節機構 第69回日本癌学会学術総会 2010年9月24日 大阪国際会議場
- ② 森井英一 腫瘍幹細胞の観点からみた腫瘍研究 第51回日本組織細胞化学会 2010年9月4日 秋葉原コンベンションホール
- ③ 森井英一、池田純一郎、青笹克之 炎症の腫瘍動態への影響—炎症細胞豊富なリンパ腫の腫瘍原性を求めて— 日本病理学会第7回病理学カンファレンス 2010年8月7日 岡山コンベンションセンター
- ④ 池田純一郎、森井英一、青笹克之 A role of small-sized cell population in tumorigenesis of Hodgkin lymphoma 英国病理学会 2010年6月29日 St. Andrews University
- ⑤ 森井英一 肺腺癌の腫瘍幹細胞：核内レセプター発現の関与 第99回日本病理学会総会 2010年4月29日 京王プラザホテル
- ⑥ 池田純一郎、森井英一、青笹克之 ホジキンリンパ腫の腫瘍形成能における小型細胞群の役割 第99回日本病理学会総会 2010年4月29日 京王プラザホテル
- ⑦ 森井英一 マーキング技術を利用した腫瘍幹細胞の同定 日本病理学会第9回病理技術講習会 2009年11月18日 グラントヒル市ヶ谷
- ⑧ 池田純一郎、森井英一、青笹克之 A role of small-sized cell population in tumorigenesis of Hodgkin lymphoma ホジキンリンパ腫の造腫瘍能における小型細胞集団の役割 第68回日本癌学会学術総会 2009年10月2日 パシフィコ横浜
- ⑨ 森井英一、池田純一郎、青笹克之 Tumorigenic role of orphan nuclear receptor NROB1 in lung adenocarcinoma 肺腺癌における核内レセプターNROB1の役割 第68回日本癌学会学術総会 2009年10月1日 パシフィコ横浜
- ⑩ 森井英一、池田純一郎、青笹克之 肺癌細胞株のside population分画に高発現する核内レセプター蛋白質に関する解析 第98回日本病理学会総会 2009年5月2日 京都国際会館
- ⑪ 池田純一郎、森井英一、奥村明之進、青笹克之 肺腺癌におけるCDCP1の発現と臨床病理学的特徴 第98回日本病理学会総会 2009年5月2日 京都国際会館

(1) 研究代表者
森井 英一 (MORII EIICHI)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：10283772

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

6. 研究組織