

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790350

研究課題名(和文)濾胞性リンパ腫における幹細胞の探索と分子病理学的解析

研究課題名(英文)Molecular pathological approach to follicular lymphoma stem-like cells

## 研究代表者

高田 尚良(Takata, Katsuyoshi)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：90580259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：濾胞性リンパ腫において、複数の幹細胞マーカーを染色すると、少数であるが幹細胞マーカーが陽性になる細胞集団が病理組織学的に確認され、それらは血管周囲に分布する、いわゆるniche的な像をとっていた。また、これらの細胞はt(14;18)転座を有する腫瘍細胞であった。ヒト由来リンパ腫細胞株においても同様の幹細胞マーカー陽性の集団が存在し、これらは薬剤抵抗性と強い腫瘍形成能を有することがin vitro, in vivoの実験で確認された。

研究成果の概要(英文)：We investigated several stem-like phenotype markers in follicular lymphoma patient samples, and some minor population was positive for these stem-like markers. These cells harbored t(14;18) by microdissection study. Furthermore, some minor stem-like positive cells presented in human derived B-cell lymphoma cell lines and these minor populations had treatment resistance and strong tumorigenic potential by in vitro and in vivo assay.

研究分野：人体病理学

キーワード：悪性リンパ腫

## 1. 研究開始当初の背景

近年、分子標的薬の開発により肺がん、乳がん、白血病細胞などで特異的分子を target とした先進医療が進んでいる。しかし、先端医療を以てしても難治性悪性腫瘍は今なお存在し、喫緊の解決課題となっている。この治療抵抗性・再燃の要因の一つとして、いわゆる cancer stem cell の残存が重要視され、疾患克服のための腫瘍内における存在の探索や細胞形質(マーカー探索)さらに分子生物学的特徴の解析が全世界的に大きな注目を浴びる研究領域となっている。全悪性リンパ腫の約 20% を占める濾胞性リンパ腫でも中長期的には依然として難治性である。このような難治性リンパ腫群において具体的な癌幹細胞の性質を有する細胞群の同定は行われていない。

## 2. 研究の目的

難治性リンパ腫の代表とされる濾胞性リンパ腫において癌幹細胞の性質を有する細胞群を同定する。また、その同定した細胞群においてどのような細胞生物学的性質を有するかを検証する。

## 3. 研究の方法

(1) 患者組織検体において幹細胞のマーカーとして使用される複数のマーカーを用いて、免疫組織学的手法を用いた多重染色法を行う。陽性細胞の局在について検討する。  
(2) 幹細胞マーカーが陽性となった集団についてそれらが腫瘍性であるか否かについて濾胞性リンパ腫で key となる t(14;18) の検索を PCR 法により検討する。  
(3) 複数回生検されている患者検体においてこれらの幹細胞マーカーがどのような性状を示すかを検討する。  
(4) ヒト由来リンパ腫細胞株で幹細胞マーカーが陽性となった細胞集団について、セルソーターによる細胞の純化を行い、それらについて薬剤耐性の存在、in vivo での腫瘍形成能を確認する。  
(5) 幹細胞マーカー陽性の細胞集団について、どのような遺伝子が重要であるかを real-time PCR 法により検討する。

## 4. 研究成果

濾胞性リンパ腫において、複数の幹細胞マーカーを染色すると、少数であるが幹細胞マーカーが陽性になる細胞集団が病理組織学的に確認され、それらは血管周囲に分布する、いわゆる niche 的な像をとっていた。また、この幹細胞マーカー陽性の集団は細胞増殖能のマーカーとして知られる Ki-67 との二重染色で、いずれも cell cycle に入っていない G0 期にある細胞であることが判明した。次に、これらの細胞が腫瘍であるか否かを確認するため、microdissection 法により幹細胞マーカー陽性の細胞を single cell で切り出し、PCR 法により確認を行うと、5 検体い

ずれの検体で濾胞性リンパ腫に特徴的な染色体転座が確認され、幹細胞マーカー陽性の集団でも染色体転座が存在することが判明した。さらにヒト由来リンパ腫細胞株においてこれらの幹細胞マーカー陽性の集団を検討したところ、患者組織と同程度の少数の集団に陽性所見が確認され、幹細胞といえる頻度の集団であった。これらについて FACS Aria を用いて陽性集団を純化し、in vivo での腫瘍形成能を確認したところ、陰性集団と比較して陽性集団で明らかに強い腫瘍形成能が確認された。また、これらの陽性集団では、既存の抗がん剤による治療抵抗性のある集団であることも確認された。これらの結果をまとめて現在論文投稿準備中である。

## 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 20 件)

1. Takata K, Noujima-Harada M, Miyata-Takata T, Ichimura K, Sato Y, Miyata T, Naruse K, Iwamoto T, Tari A, Masunari T, Sonobe H, Okada H, Iwamuro M, Mizobuchi K, Gion Y, Yoshino T. Clinicopathologic Analysis of 6 Lymphomatoid Gastropathy Cases: Expanding the Disease Spectrum to CD4-CD8+ Cases. **Am J Surg Pathol** 2015 [Epub ahead of print] (査読あり)
2. Murakami I, Matsushita M, Iwasaki T, Kuwamoto S, Kato M, Nagata K, Horie Y, Hayashi K, Imamura T, Morimoto A, Imashuku S, Gogusev J, Jaubert F, Takata K, Oka T, Yoshino T. Interleukin-1 loop model for pathogenesis of Langerhans cell histiocytosis. **Cell Commun Signal**. 2015, 22: 13 (査読あり)
3. Kato S, Asano N, Miyata-Takata T, Takata K, Elsayed AA, Satou A, Takahashi E, Kinoshita T, Nakamura S. T-cell receptor (TCR) phenotype of nodal Epstein-Barr virus (EBV)-positive cytotoxic T-cell lymphoma (CTL): a clinicopathologic study of 39 cases. **Am J Surg Pathol**. 2015 39: 462-471. (査読あり)
4. Takeuchi M, Ohno K, Takata K, Gion Y, Tachibana T, Orita Y, Yoshino T, Sato Y. Interleukin 13-positive mast cells are increased in immunoglobulin G4-related sialadenitis. **Sci Rep**. 2015, 5: 7696 (査読あり)
5. Murakami I, Takata K, Matsushita M, Nonaka D, Iwasaki T, Kuwamoto

- S, Kato M, Mohri T, Nagata K, Kitamura Y, Yoshino T, Hayashi K. Immunoglobulin expressions are only associated with MCPyV-positive Merkel cell carcinomas but not with MCPyV-negative ones: comparison of prognosis. **Am J Surg Pathol.** 2014, 38: 1627-1635. (査読あり)
6. Takata K, Hong ME, Sitthinamsuwan P, Loong F, Tan SY, Liau JY, Hsieh PP, Ng SB, Yang SF, Pongpruttipan T, Sukpanichnant S, Kwong YL, Hyeh Ko Y, Cho YT, Chng WJ, Matsushita T, Yoshino T, Chuang SS. Primary cutaneous NK/T-cell lymphoma, nasal type and CD56-positive peripheral T-cell lymphoma: a cellular lineage and clinicopathologic study of 60 patients from Asia. **Am J Surg Pathol.** 2015, 39: 1-12. (査読あり)
  7. Yamaguchi M, Takata K, Yoshino T, Ishizuka N, Oguchi M, Kobayashi Y, Isobe Y, Ishizawa K, Kubota N, Itoh K, Usui N, Miyazaki K, Wasada I, Nakamura S, Matsuno Y, Oshimi K, Kinoshita T, Tsukasaki K, Tobinai K. Prognostic biomarkers in patients with localized natural killer/T-cell lymphoma treated with concurrent chemoradiotherapy. **Cancer Sci.** 2014, 105: 1435-1441. (査読あり)
  8. Takata K, Miyata-Takata T, Sato Y, Yoshino T. Pathology of follicular lymphoma. **J Clin Exp Hematop.** 2014;54:3-9. Review. (査読あり)
  9. Takahashi Y, Takata K, Kato S, Sato Y, Asano N, Ogino T, Hashimoto K, Tashiro Y, Takeuchi S, Masunari T, Hiramatsu Y, Maeda Y, Tanimoto M, Yoshino T. Clinicopathological analysis of 17 primary cutaneous T-cell lymphoma of the  $\gamma\delta$  phenotype from Japan. **Cancer Sci.** 2014, 105: 912-923. (査読あり)
  10. Iwatani K, Takata K, Sato Y, Miyata-Takata T, Iwaki N, Cui W, Sawada-Kitamura S, Sonobe H, Tamura M, Saito K, Miyatani K, Yamasaki R, Yamadori I, Fujii N, Terasaki Y, Maeda Y, Tanimoto M, Nakamura N, Yoshino T. Low-grade B-cell lymphoma presenting primarily in the bone marrow. **Hum Pathol.** 2014, 45: 1379-1387. (査読あり)
  11. Takeuchi M, Sato Y, Yasui H, Ozawa H, Ohno K, Takata K, Gion Y, Orita Y, Tachibana T, Itoh T, Asano N, Nakamura S, Swerdlow SH, Yoshino T. Epstein-Barr virus-infected cells in IgG4-related lymphadenopathy with comparison with extranodal IgG4-related disease. **Am J Surg Pathol.** 2014, 38: 946-955. (査読あり)
  12. Takata K, Tanino M, Ennishi D, Tari A, Sato Y, Okada H, Maeda Y, Goto N, Araki H, Harada M, Ando M, Iwamuro M, Tanimoto M, Yamamoto K, Gascoyne RD, Yoshino T. Duodenal follicular lymphoma: comprehensive gene expression analysis with insights into pathogenesis. **Cancer Sci.** 2014, 105: 608-615. (査読あり)
  13. Takeuchi M, Sato Y, Ohno K, Tanaka S, Takata K, Gion Y, Orita Y, Ito T, Tachibana T, Yoshino T. T helper 2 and regulatory T-cell cytokine production by mast cells: a key factor in the pathogenesis of IgG4-related disease. **Mod Pathol.** 2014, 27: 1126-1136. (査読あり)
  14. Miyata-Takata T, Takata K, Yamanouchi S, Sato Y, Harada M, Oka T, Tanaka T, Maeda Y, Tanimoto M, Yoshino T. Detection of T-cell receptor  $\gamma$  gene rearrangement in paraffin-embedded T or natural killer/T-cell lymphoma samples using the BIOMED-2 protocol. **Leuk Lymphoma** 2014, 55: 2161-2164. (査読あり)
  15. Abd Al Kader L, Oka T, Takata K, Sun X, Sato H, Murakami I, Toji T, Manabe A, Kimura H, Yoshino T. In aggressive variants of non-Hodgkin lymphomas, Ezh2 is strongly expressed and polycomb repressive complex PRC1.4 dominates over PRC1.2. **Virchows Arch.** 2013, 463: 697-711. (査読あり)
  16. Hayashi E, Takata K, Sato Y, Tashiro Y, Tachiyama Y, Sawada-Kitamura S, Hiramatsu Y, Sugiguchi S, Nose S, Hirokawa M, Ando M, Abd Alkader L, Maeda Y, Tanimoto M, Yoshino T. Distinct morphologic, phenotypic, and clinical-course characteristics of indolent peripheral T-cell lymphoma. **Hum Pathol.** 2013, 44: 1927-1936. (査読あり)
  17. Toda H, Sato Y, Takata K, Orita Y, Asano N, Yoshino T. Clinicopathologic analysis of localized nasal/paranasal diffuse large B-cell lymphoma. **PLoS One** 2013, 8: e57677. (査読あり)
  18. Ando M, Sato Y, Takata K, Nomoto J,

- Nakamura S, Ohshima K, Takeuchi T, Orita Y, Kobayashi Y, Yoshino T. A20 (TNFAIP3) deletion in Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders/lymphomas. **PLoS One** 2013, 8: e56741. (査読あり)
19. Sato Y, Takeuchi M, Takata K, Ohno K, Iwaki N, Orita Y, Goto N, Hida AI, Iwamoto T, Asano N, Ito T, Hanakawa H, Yanai H, Yoshino T. Clinicopathologic analysis of IgG4-related skin disease. **Mod Pathol.** 2013, 26: 523-532. (査読あり)
20. Takata K, Sato Y, Nakamura N, Tokunaka M, Miki Y, Yukie Kikuti Y, Igarashi K, Ito E, Harigae H, Kato S, Hayashi E, Oka T, Hoshii Y, Tari A, Okada H, Al-Kader LA, Maeda Y, Tanimoto M, Kinoshita T, Yoshino T. Duodenal follicular lymphoma lacks AID but expresses BACH2 and has memory B-cell characteristics. **Mod Pathol.** 2013, 26: 22-31. (査読あり)

〔学会発表〕(計9件)

1. 高田尚良、吉野 正 Intestinal follicular lymphoma. 第54回リンパ網内系学会 シンポジウム1 2014年6月19-21日、山形
2. 高田尚良 腸管悪性リンパ腫の特徴および病理診断 第54回リンパ網内系学会血液病理研究会 2014年6月19-21日、山形
3. Takata K, Yamaguchi M, Yoshino T, Ishizuka N, Oguchi M, Kobayashi Y, Isobe Y, Ishizawa K, Kubota N, Itoh K, Usui N, Miyazaki K 1. Prognostic biomarkers in patients with localized NK/T-cell lymphoma treated with RT-DeVIC 第76回日本血液学会学術集会 2014年10月31日-11月2日、大阪
4. Katsuyoshi Takata Challenges in diagnostic lymph node pathology 2014 IAP congress, Thailand slide seminar invited speaker
5. 高田尚良 消化管 DLBCL の病理診断 第53回日本リンパ網内系学会シンポジウム 2013年5月16-18日、京都
6. 高田尚良、吉野 正 消化管濾胞性リンパ腫の最新知見 第102回日本病理学会総会 2013年6月6-8日、札幌
7. 高田尚良、高橋友香、加藤省一、谷本光音、吉野 正 皮膚原発 T細胞リンパ腫の臨床病理学的解析 第72回日本癌学会 2013年10月3-5日
8. 高田尚良、岡 剛史、安藤 翠、都地

- 友紘、佐藤康晴、中村直哉、吉野 正 十二指腸濾胞性リンパ腫の発症機構とエビジェネティクス解析, 2012年4月26-28日、日本病理学会、東京
9. 吉野 正、高田尚良 悪性リンパ腫の病理形態と分子形態 第71回日本癌学会シンポジウム、2012年9月19-22日  
〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.okayama-u.ac.jp/user/path/>

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
高田 尚良 (Takata Katsuyoshi)岡山大学大学院医歯薬学総合研究科、講師  
研究者番号：90580259