

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 13 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860268

研究課題名(和文) Lymphoplasmacytic lymphomaでの腫瘍幹細胞動態解析

研究課題名(英文) Dynamic analyses of tumor-initiating cells in lymphoplasmacytic lymphoma (LPL)

研究代表者

和田 直樹 (WADA, NAOKI)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80521731

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：MWCL-1(LPLの細胞株)は、CD20及びCD138抗体を用いたフローサイトメトリーで、主にCD20⁻CD138⁻、CD20⁺CD138⁻、CD20⁺CD138⁺の3分画に分けられる。これらのうちCD20⁻CD138⁻は自己複製能・多分化能を有し、他の分画に比べ活性酸素除去能・in vitroコロニー形成能ともに高く、アポトーシスにも抵抗性であった。そして、CD20⁻CD138⁻は、低酸素が有利な微小環境条件であり、他の分画に比べCXCR7のmRNA/蛋白発現が高かった。更に、MWCL-1をCXCL12(CXCR7のリガンド)で刺激するとCD20⁻CD138⁻の割合が有意に増加した。

研究成果の概要(英文)：MWCL-1 was established as LPL cell line. MWCL-1 cells were classified into three subpopulations using a flow cytometer with anti-CD20 and anti-CD138 antibodies: CD20⁻CD138⁻, CD20⁺CD138⁻, and CD20⁺CD138⁺. When cultured, CD20⁻CD138⁻ cells yielded all three subpopulations. Compared to the other subpopulations, CD20⁻CD138⁻ cells possessed the efficient ROS expelling and in vitro colony formation activities, and were resistant to apoptosis. These results suggested that CD20⁻CD138⁻ cells might be a candidate for tumor-initiating cells in LPL. Low oxygen culture of MWCL-1 induced the production of CD20⁻CD138⁻ cells, and this result suggested that hypoxia was an advantageous microenvironment for CD20⁻CD138⁻ cells. CXCR7 mRNA/protein expression was the highest in CD20⁻CD138⁻ cells. When CXCL12, a ligand of CXCR7, was added, the proportion of CD20⁻CD138⁻ cells significantly increased. CXCL12-CXCR7 signaling might exert a great influence on CD20⁻CD138⁻ cells.

研究分野：悪性リンパ腫

キーワード：腫瘍幹細胞 悪性リンパ腫

1. 研究開始当初の背景

腫瘍は単一クローンであるが、その表現型・機能は多様である。腫瘍の中で腫瘍幹細胞と呼ばれる治療抵抗性の細胞群が腫瘍集団の維持に重要であり、腫瘍進展・再発・転移の主因と考えられている。腫瘍幹細胞は白血病で最初にその存在が明らかとされ、その後、乳癌や前立腺癌、膵臓癌など多くの腫瘍で報告されている。リンパ腫は、白血病とならび詳細に解析されている血液系の腫瘍であるが、これまでのところ腫瘍幹細胞の観点からの解析はほとんど行われていない。その理由は、白血病と異なり固形腫瘍であることによる解析の困難さ以外にも、腫瘍の表面マーカーの発現が腫瘍細胞間で比較的均一であり、腫瘍細胞を分画して解析することが困難なことがあげられる。

lymphoplasmacytic lymphoma (LPL) は稀なリンパ腫であるが、表面マーカーが比較的多彩であり、lymphoplasmacytic の形容詞が表すように、腫瘍細胞は B リンパ球の性格と形質細胞の性格をもつ腫瘍細胞から構成されている。近年、細胞株 [MWCL-1] も樹立されたので、このリンパ腫では腫瘍を様々な分画に分けて解析することができ、リンパ腫における腫瘍幹細胞の研究に適している。

骨髄造血幹細胞の維持にその周囲の微小環境が重要であることと同様に、腫瘍幹細胞でも微小環境の重要性が言われている。例えば、造血幹細胞は骨髄の低酸素ニッチに局在しており、低酸素に対する細胞の適応応答で中心的な役割を果たす転写因子である HIF が幹細胞の維持や分化の制御に重要な役割を担っている (Parmar K et al, Proc Natl Acad Sci USA, 2007; Suda T et al, Cell Stem Cell, 2011; Miharada K et al, Ann NY Acad Sci, 2012)。また、CXCL12-CXCR4 ケモカインシグナリングが造血幹細胞の骨髄へのホーミング、造血幹細胞と骨髄の接着、骨髄造血幹細胞の増殖・維持に重要であることが分かっている (Broxmeyer HE, Curr Opin Hematol, 2008)。そして、CXCR4 と CXCR7 に密接な関連があることも分かっており、CXCL12-CXCR4/CXCR7 ケモカインシグナリングの詳細が近年明らかとなりつつある (Puchert M et al, Cell Tissue Res, 2014)。LPL の病変の主座は骨髄であるので、この腫瘍幹細胞も低酸素や CXCL12-CXCR4/CXCR7 ケモカインシグナリングとの関連が予想される。

2. 研究の目的

リンパ腫における腫瘍幹細胞の同定とその動態解析を目的として、LPL を対象とした研究を行う。

3. 研究の方法

(1) LPL の細胞株である MWCL-1 を用いてフローサイトメトリーによる B 細胞性 [CD20 抗体で検出]、形質細胞性 [CD138

抗体で検出] 表面マーカーの解析を行った。

ソーティング・培養を行った。

H₂O₂ 添加後に活性酸素マーカーである CM-H₂DCFDA が陰性の細胞割合 [活性酸素除去能を反映] を測定した。

5x10⁴ 個、1x10⁵ 個の細胞を 15% FCS を加えたメチルセルロース含有 Dulbecco 's Modified Eagle 's Medium (DMEM) 1~2mL に播き込み、それぞれ 35 日後、23 日後に形成されたコロニーの数を数え、in vitro コロニー形成能を評価した。

血清飢餓、抗がん剤によるアポトーシス試験を行った。アポトーシス細胞はフローサイトメトリーを用いて Annexin V で検出した。

(2) LPL の臨床検体で CD20, CD138, cleaved-caspase 3 [cleaved-caspase 3 陽性細胞はアポトーシス細胞を反映] の免疫染色を行った。

(3) 腫瘍幹細胞に有利な微小環境条件や非腫瘍幹細胞から腫瘍幹細胞が可塑的に産生される条件を検討するため MWCL-1 を低酸素で培養した。

(4) LPL の腫瘍幹細胞の候補と非腫瘍幹細胞で遺伝子発現マイクロアレイ解析・ウエスタンブロット解析を行った。

(5) LPL の腫瘍幹細胞と CXCL12-CXCR4/CXCR7 ケモカインシグナリングとの関連が予想されるので、MWCL-1 を CXCL12 で刺激して細胞分画の変化を調べた。

4. 研究成果

「3. 研究の方法」の(1), (2), (3), (4), (5)に対応するかたちで結果を述べ、最後に今後の展望を記載する。(1), (2)は学会および論文で発表した成果であり、(3), (4), (5)は学会で発表した成果である。(3), (4), (5)は図を併用して結果を述べる。

(1) CD20(+)CD138(-) に比べ、CD20(-)CD138(-), CD20(+)CD138(+)は量的に少数であり、CD20(-)CD138(+)は極少数であった。よって、CD20(-)CD138(-), CD20(+)CD138(-), CD20(+)CD138(+)に着目して(1)以降の解析を行った。

(1) CD20(-)CD138(-), CD20(+)CD138(-), CD20(+)CD138(+)をソーティングして培養したところ、CD20(-)CD138(-) から CD20(+)CD138(-)および CD20(+)CD138(+) が産生され original MWCL-1 とほぼ同様の

細胞集団になったが、CD20(+)CD138(-), CD20(+)CD138(+)からは CD20(-)CD138(-)が産生されなかった。

(1) CD20(-)CD138(-), CD20(+)CD138(-), CD20(+)CD138(+)のうち CD20(-)CD138(-)の活性酸素除去能が最も高かった。

(1) CD20(-)CD138(-), CD20(+)CD138(-), CD20(+)CD138(+)のうち CD20(-)CD138(-)の in vitro コロニー形成能が最も高かった。

(1) CD20(-)CD138(-), CD20(+)CD138(-), CD20(+)CD138(+)のうち CD20(-)CD138(-)のアポトーシス抵抗性が最も高かった。そして、CD20(+)CD138(+)のアポトーシス抵抗性が最も低かった。

(2) LPL の臨床検体でも cleaved-caspase 3 陽性のアポトーシス細胞は大部分 CD20(+)CD138(+)であり、細胞株の結果と同様であった。

以上より MWCL-1 を用いた解析上、B 細胞性マーカーおよび形質細胞性マーカーの両方とも発現しない CD20(-)CD138(-)が少数存在し、その細胞群は自己複製能・多分化能を有し、活性酸素除去能・コロニー形成能が高く、アポトーシス抵抗性であった。よって、CD20(-)CD138(-)は腫瘍幹細胞の候補と考えられる。

(3) MWCL-1 で低酸素培養 (O₂: 1%) を行ったところ、時間の経過とともに CD20(-)CD138(-)の割合が増加した (図 1)。

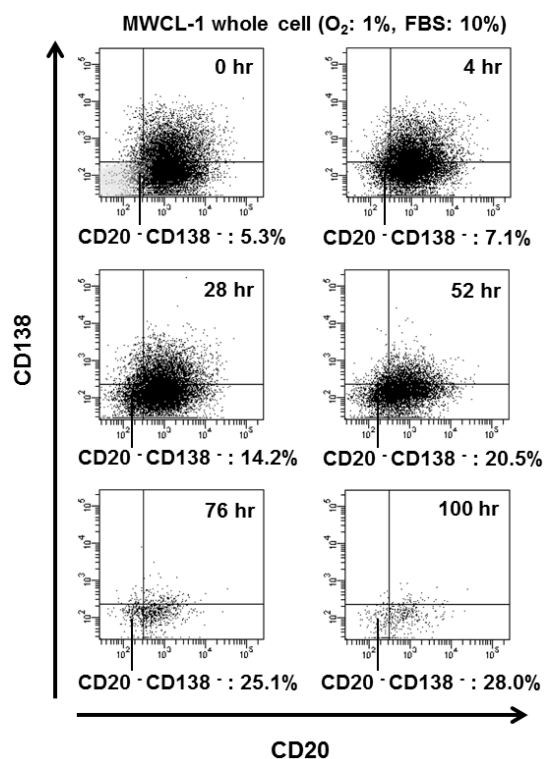


図 1

また、CD20(+)CD138(-)をソーティングして低酸素培養 (O₂: 1%) を行ったところ、時間の経過とともに CD20(-)CD138(-)が産生され、172 時間後に CD20(-)CD138(-)の割合が 14.7%になった (図 2)。

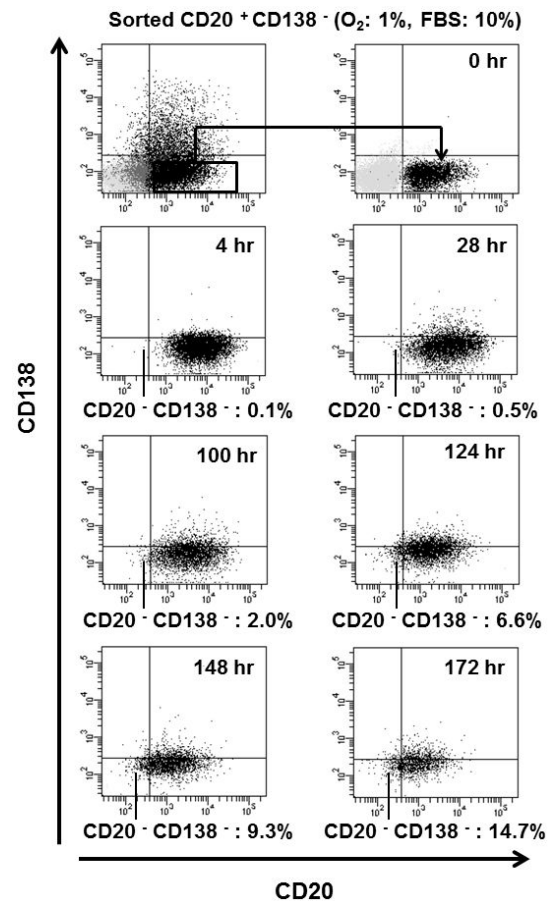
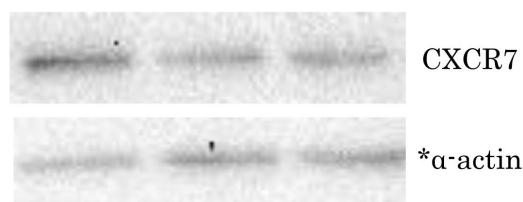


図 2

なお、(1) で述べたように通常条件の培養 (O₂: 20%) では、CD20(+)CD138(-)から CD20(-)CD138(-)は産生されなかった。LPL の腫瘍幹細胞の候補と考えられる CD20(-)CD138(-)にとって低酸素が有利な微小環境条件であることが示唆される。

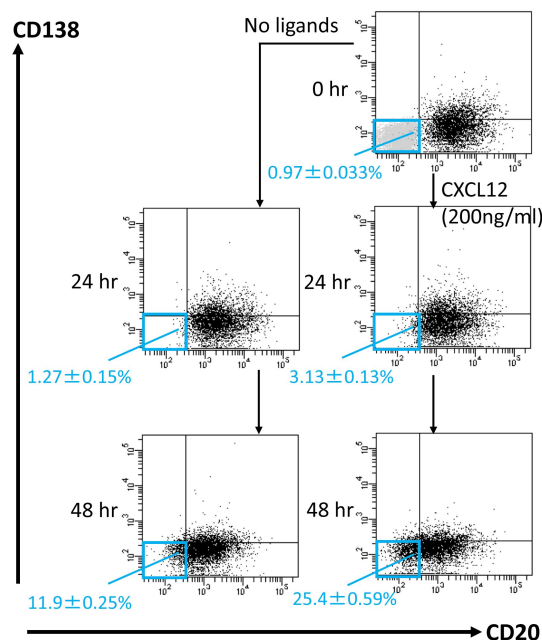
(4) LPL の腫瘍幹細胞の候補と考えられる CD20(-)CD138(-)と非腫瘍幹細胞と考えられる CD20(+)CD138(+)とを比較した遺伝子発現マイクロアレイ解析において、CD20(-)CD138(-)で mRNA 発現が有意に高かったケモカインレセプター CXCR7 に着目した。ソーティングした CD20(-)CD138(-), CD20(+)CD138(-), CD20(+)CD138(+)でウェスタンブロット解析を行ったところ、CXCR7 の蛋白発現も CD20(-)CD138(-)で最も高かった (図 3)。

CD20(-) CD20(+) CD20(+)
CD138(-) CD138(-) CD138(+) 図 3



*α-actin (re-blot) of the same sample set

(5) MWCL-1 を CXCL12 で刺激して細胞分画の変化を調べたところ、CXCL12 で刺激した MWCL-1 は、刺激していない MWCL-1 に比べ、CD20(-)CD138(-)の割合が有意に高くなった(図4)。



*CD20(-)CD138(-)の割合は3回調べた結果の平均±SEである。

図4

(4)の結果と合わせ、LPLの腫瘍幹細胞の候補と考えられるCD20(-)CD138(-)にとってCXCL12-CXCR7ケモカインシグナリングが重要であることが示唆される。

今後、低酸素条件とCXCL12-CXCR7ケモカインシグナリングとの関係などを調べる予定である。

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1件)

Wada N, Zhan M, Hori Y, Honma K, Ikeda J, Morii E、Characterization of subpopulation lacking both B-cell and plasma cell markers in Waldenstrom macroglobulinemia cell line、Lab Invest、査読有、94巻、2014、pp. 79-88. DOI: 10.1038/labinvest.2013.129.

[学会発表](計3件)

Wada N(代表者)、Clinicopathological analysis and study on the population with stem cell feature in malignant lymphoma、第104回日本病理学会総会、平成27年(2015年)4月30日~5月2日、名古屋国際会議場

和田 直樹(代表者) 他、リンパ形質細胞性リンパ腫におけるCD20陰性CD138陰性細胞群、第104回日本病理学会総会、平成

27年(2015年)4月30日~5月2日、名古屋国際会議場

和田 直樹(代表者) 他、ワルデンストローム・マクログロブリン血症(WM)におけるCD20(-)CD138(-)細胞の意義、第103回日本病理学会総会、平成26年(2014年)4月24日~4月26日、広島国際会議場/ANAクラウンプラザホテル広島

[その他]

ホームページ等

大阪大学大学院医学系研究科病態病理学教室・大阪大学医学部附属病院病理部ホームページ

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/molpath/works.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

和田 直樹(WADA, NAOKI)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 80521731