様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成２３年　５月　２日現在

機関番号：１４４０１
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2009～2010
課題番号：21790350
研究課題名（和文）　腫瘍幹細胞に立脚した悪性リンパ腫の性格付けに関する解析

研究課題名（英文）　Characterization of malignant lymphoma from viewpoint of cancer stem cells

研究代表者
池田　純一郎（IKEDA JUNICHIRO）
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：20379176

研究成果の概要（和文）：悪性リンパ腫において腫瘍幹細胞としての役割をもつ細胞を同定するためには，リンパ腫細胞からマーカーを利用してソートされた細胞を NOD/SCID マウスに移植する必要がある．悪性リンパ腫の一組織型であるホジキンリンパ腫の細胞株において活性酸素のレベルが低い細胞が小型単核細胞群の一部にみられ，高い細胞は大型多核細胞群に多くみられた。これらの小型単核細胞は大型多核細胞に比べて腫瘍形成能が高いことが in vitro colony 形成能および NOD/SCID マウスへの移植により確認された．以上より悪性リンパ腫においても腫瘍内に腫瘍形成能を有する一群が存在することが示唆された．

研究成果の概要（英文）：
To identify cancer stem cells in malignant lymphoma, it is necessary that cells sorted as a candidate of cancer stem cells were injected into NOD/SCID mice. In Hodgkin lymphoma cell lines, concentration of intracellular reactive oxygen species was at a low level in a portion of single-nucleated small sized (S) cells. When cultured in methylcellulose or inoculated into NOD/SCID mice, the colony number and tumor size were larger in S than in multinucleated large-sized cells.
These findings suggest that small-sized cells might play an important role in tumorigenesis of Hodgkin lymphoma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総　計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：癌，悪性リンパ腫，腫瘍幹細胞，病理学

１．研究開始当初の背景

早期発見や治療法の開発などが進み，悪性腫瘍は治癒しうる疾患になりつつあるが，依然として死因の第一位である．また，罹患数も増加傾向にあり医療費高騰の一因となっている．医療費削減のためには腫瘍と診断された際に各々の腫瘍の個性に応じた治療法を選択する必要がある．そのためには，対象となる腫瘍の性格を精細に判定することが必要である．

２．研究の目的
近年，腫瘍は単一の性格をもつ細胞群のみで構成されるのではなく多彩な細胞で構成されており，腫瘍幹細胞という一群の細胞から腫瘍が恒常的に発生することが明らかにされてきている．腫瘍幹細胞の実在は，白血病において NOD/SCID マウスへ腫瘍細胞を継代移植することで証明された．ところが，白病と同様に解析がすすんでいる悪性リンパ腫においては腫瘍幹細胞の存在は明らかにはされていない．そこで，本研究では，腫瘍幹細胞の観点から悪性リンパ腫の性格を明らかにすることを目的とする．

３．研究の方法
(1)　母集団の数を増やすことが可能な悪性リンパ腫の腫瘍細胞株をヘキスト色素で染色後 FACS をかけ，色素を排出する細胞が存在する side-population 画分を単離する．同時にコントロールとして腫瘍細胞の大半が存在するが腫瘍幹細胞は存在しないと考えられている main-population 画分も単離する．

(2)　単離された細胞が腫瘍幹細胞であるか検討する．Side-population が幹細胞を含む画分であるという報告はあるが，腫瘍は由来する臓器ごとに多様性があるため，これまでの報告と異なる結果がでる可能性は否定できない．そこで，単離された細胞が腫瘍幹細胞としての性質をもつかを NOD/SCID マウスに移植し，腫瘍形成能を検討する．また，単離した細胞を培養し，再び side-population と main-population が出現するか，すなわち自己複製能と分化能の両者をもつか検討する．移植で腫瘍が形成された場合も，その腫瘍が side-population と main- population を有して，自己複製能をもつか調べる．

(3)　(2)と平行して,単離した細胞から mRNA を精製し cDNA を合成後，マイクロアレイにかけて,side-population と main-population で発現に差のある遺伝子を検索する．

(4)　単離された遺伝子が本当に腫瘍幹細胞に特異的かどうかを再び腫瘍細胞のうち，この遺伝子を高発現するものを FACS でソートし,ソートされた細胞が side-population に含まれるものであるか，さらに NOD/SCID マウスに移植することで本当に腫瘍を形成しうるのか，腫瘍が形成された場合に side-population と main-population が出現して自己複製能をもつか検討する．

(5)　実際の臨床検体でも腫瘍幹細胞に特異的に発現するか検討する．

４．研究成果
悪性リンパ腫において腫瘍幹細胞としての役割をもつ細胞を同定するためには，リンパ腫細胞からマーカーを利用してソートされた細胞を NOD/Scid マウスに移植する必要がある．そのためには腫瘍幹細胞マーカーを検索しなければならない．まず，腫瘍幹細胞が多く含まれていると考えられる side-population をソートし，その画分に高発現する遺伝子を調べることで腫瘍幹細胞マーカーを検討した．

(1) side-population 画分を多く含む肺腺癌細胞株より side-population で高発現する遺伝子として同定された NR0B1 を用いて，その発現と予後との関係を肺腺癌臨床検体を用いて検討したところ，NR0B1 を高発現する細胞を多く含む症例では予後不良であった．

(2) 外陰部扁平上皮癌の腫瘍幹細胞のマーカーの一つとして発現が報告されている podoplanin について，食道扁平上皮癌の臨床検体を用いてその発現と予後との関係について検討したところ，podoplanin の発現が高い症例の方が，低い症例に比較し有意に予後不良であった．

(3)腫瘍幹細胞を多く含むとされる ALDH1 発現と増殖能や浸潤能との関係を，子宮内膜癌細胞株について検討したところ，ALDH1 の発現が高い細胞群において低い細胞群と比較して増殖能や浸潤能が高く，薬剤抵抗性を示した．次に予後との関係を子宮内膜癌の臨床検体を用いて検討したところ，ALDH1 を高発現する細胞を多く含む症例では予後不良であった．
　(1)(2)(3)から腫瘍幹細胞の存在の多寡が予後を決定することが示唆された．

(4) 悪性リンパ腫の一組織型であるホジキ

ンリンパ腫の細胞株より，造血幹細胞や乳癌細胞の side-population において除去能が高い活性酸素をマーカーとして用いて検討した結果、活性酸素の発現が低い細胞が小型単核細胞群の一部にみられ，発現が高い細胞は大型多核細胞群に多くみられた。これらの小型単核細胞は大型多核細胞に比べて腫瘍形成能が高いことが in vitro colony 形成能および NOD/SCID マウスへの移植により確認された．さらにホジキンリンパ腫細胞株では ALDH1 を発現する細胞群が一部にみられ，それらは活性酸素が低い群の細胞と同様に腫瘍形成能が高いことが確認された．

以上より悪性リンパ腫においても腫瘍内に腫瘍形成能を有する一群が存在することが示唆された．

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 11 件）

① 小根山千歳，池田純一郎（他 8 名，2 番目）MicroRNA-mediated downregulation of mTOR/FGFR3 controls tumor growth induced by Src-related oncogenic pathways. Oncogene, in press, 査読有
② ザキ=モナ，池田純一郎（他 10 名，4 番目）Presence of B-cell clones in T-cell lymphoma. Eur J Haematol, in press, 査読有
③ ラハディアン=ヌル，池田純一郎（他 10 名，2 番目）Expression of aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) in endometrioid adenocarcinoma and its clinical implications. Cancer Sci, 2011;102:903-908, 査読有
④ 和田直樹，池田純一郎（他 11 名，2 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
⑤ 池田純一郎（他 6 名，1 番目）Tumorigenic potential of mononucleated small cells of Hodgkin lymphoma cell lines. Am J Pathol 2010;177:3081-3088, 査読有
⑥ 和田直樹，池田純一郎（他 12 名，3 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
⑦ ママト=スハナ，池田純一郎（他 9 名，2 番目）Prognostic significance of CUB domain containing protein expression in endometrioid adenocarcinoma. Oncol Rep 2010;23:1221-1227, 査読有
⑧ ラハディアン=ヌル，池田純一郎（他 8 名，2 番目）Tumorigenic role of podoplanin in esophageal squamous-cell carcinoma. Ann Surg Oncol 2010;17:1311-1323, 査読有
⑨ 池田純一郎（他 6 名，1 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
⑩ 和田直樹，池田純一郎（他 9 名，2 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
⑪ 小田知文，池田純一郎（他 6 名，4 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 8 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，池田純一郎，青笹克之　炎症の腫瘍動態への影響ー炎症細胞豊富なリンパ腫の腫瘍原性を求めてー　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
③ 池田純一郎，森井英一，青笹克之 A role of small-sized cell population in tumourigenesis of Hodgkin lymphoma 英国病理学会 2010 年 6 月 29 日　St. Andrews University
④ 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
⑤ 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
⑥ 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NR0B1 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

⑦ 池田純一郎　免疫不全関連リンパ増殖性疾患　第 45 回日本病理学会近畿支部学術集会　2009 年 5 月 23 日　関西医科大学

⑧ 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

６．研究組織

(1)研究代表者

池田　純一郎（IKEDA JUNICHIRO）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20379176

(2)研究分担者

(　　)

研究者番号：

(3)連携研究者

(　　)

研究者番号：