

平成 30 年 5 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08363

研究課題名(和文)リンパ形質細胞性リンパ腫での腫瘍幹細胞の陽性マーカー同定及びその動態解析

研究課題名(英文)The positive marker identification of tumor-initiating cells and the dynamic analyses of them 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・助教

研究者番号：80521731

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：MWCL-1(LPL細胞株)は、CD20及びCD138抗体を用いたFCM解析で、CD20-CD138-、CD20+CD138-、CD20+CD138+に分けられる。MWCL-1のCD20-CD138-(LPLの腫瘍幹細胞候補)で発現する陽性マーカーと、それらが増加する微小環境を検討すると、CXCR7が陽性マーカーであり、低酸素およびCXCL12-CXCR7シグナルでそれらが増加することが分かった。また、プラズマ照射培養液(PAM)のLPL細胞株への効果を検討すると、PAMによりPRDM1(形質細胞分化を誘導する転写因子)を介して形質細胞(CD138陽性)分化が促進されることが分かった。

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 by flow cytometric analyses using anti-CD20 and anti-CD138 antibodies: CD20-CD138-, CD20+CD138-, and CD20+CD138+ cells. We searched for markers preferentially expressed in CD20-CD138- cells of MWCL-1 (the candidates for tumor-initiating cells of LPL), and the chemokine receptor CXCR7 was isolated. We also searched for favorable microenvironments for their proliferation, and we found that hypoxia and CXCL12-CXCR7 signaling appeared to be favorable microenvironments. We then examined the effect of plasma-activated medium (PAM) on LPL cell line, and we found that PAM induced plasma cell (CD138 positive) differentiation, which appeared to be mediated by PRDM1 (the transcription factor promoting plasma cell differentiation).

研究分野：悪性リンパ腫

キーワード：血液 リンパ腫 低酸素 ケモカインレセプター 形質細胞分化

## 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、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、その腫瘍幹細胞の実態は明らかではない。応募者は、Bリンパ球 (CD20 陽性) と形質細胞 (CD138 陽性) の性質を併せ持つリンパ形質細胞性リンパ腫 (LPL) において、LPL の細胞株 [MWCL-1] を用いて、Bリンパ球と形質細胞の何れの性質も持たない未熟細胞群 (CD20 陰性 CD138 陰性) が腫瘍幹細胞の性格を持ちアポトーシス抵抗性であることを明らかにした (Lab Invest, 2014)。そして、CD138 陽性の分化細胞群が他の細胞群よりアポトーシス試験に脆弱で、LPL 臨床検体でも CD138 陽性細胞がアポトーシスマーカー陽性を伴うことを報告した (Lab Invest, 2014)。

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明らかとなりつつある (Puchert M et al, Cell Tissue Res, 2014)。

応募者が絞り込んだ LPL の腫瘍幹細胞候補は CD20 陰性 CD138 陰性であるので、腫瘍幹細胞の陽性マーカーを明らかにすれば、その陽性マーカーを標的とした治療法の開発につながる可能性がある。LPL の病変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ので、先ず、これらに着目して研究を開始した。

## 2. 研究の目的

リンパ腫における腫瘍幹細胞の動態を解明する。リンパ腫の中でも LPL は表面マーカーが比較的多彩なリンパ腫なので、LPL の細胞株を活用することにより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動態解析に適している。LPL の腫瘍幹細胞候補である未熟な CD20 陰性 CD138 陰性細胞群に発現する陽性マーカーを

同定し、この細胞群に有利な微小環境条件を明らかにする。

研究期間の途中からは、LPL における腫瘍幹細胞の動態解析として、未熟な腫瘍幹細胞から CD138 陽性細胞への分化を促進する因子についても検討した。

## 3. 研究の方法

(1) 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。

(2) LPL の腫瘍幹細胞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。

(3) 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) MWCL-1 を低酸素で培養し、各細胞分画での細胞内 CXCL12 産生量を調べた。

(5) プラズマ照射による傷病組織の治癒・再生、細胞分化に関する有用な効果が近年報告されているので、LPL の細胞株をプラズマ照射培養液 (PAM) で培養して、その細胞分化に対する効果を検討した。

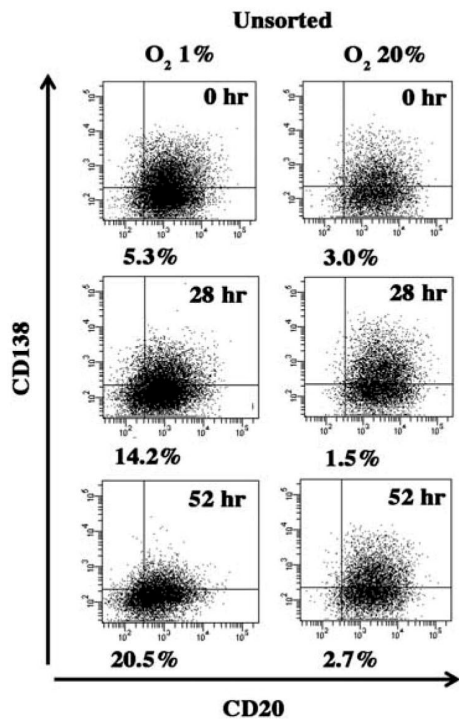
(6) LPL の未熟細胞と分化細胞で遺伝子発現マイクロアレイ解析を行い、分化細胞で高発現している遺伝子のうち形質細胞分化に関わる遺伝子を調べた。

(7) (6) で調べた遺伝子の PAM 培養による発現変化を MWCL-1 で調べた。PAM 培養により発現が高くなった遺伝子については蛋白発現変化も調べた。

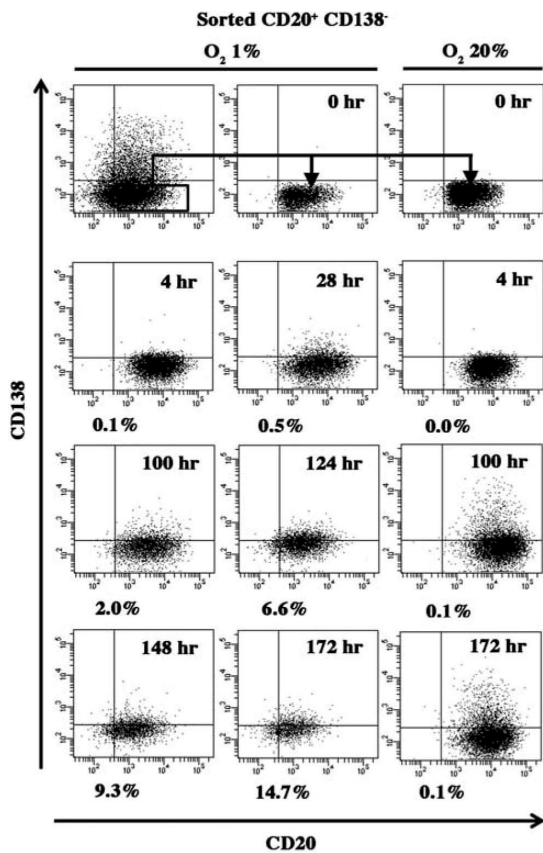
## 4. 研究成果

(0) 「3. 研究の方法」の (1) ~ (7) に対応するかたちで結果を述べ、最後に (8) で本研究成果の展望を記載する。(1) ~ (4) は「5. 主な発表論文等」の〔雑誌論文〕で発表した成果であり、(5) ~ (7) は「5. 主な発表論文等」の〔雑誌論文〕で発表した成果である。

(1) MWCL-1 で低酸素培養 ( $O_2$  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)。また、CD20(+)CD138(-) をソーティングして低酸素培養 ( $O_2$  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)。一方、通常条件の培養 ( $O_2$  20%) では、CD20(+)CD138(-) から CD20(-)CD138(-) は産生されなかった (図 2)。



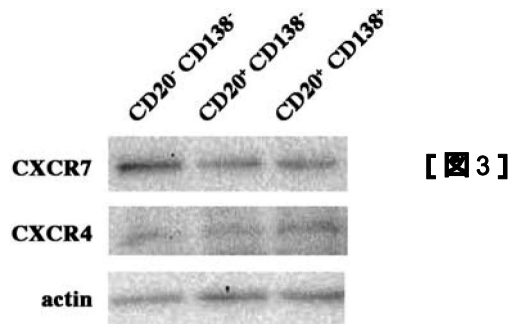
【図1】 CD20(-)CD138(-)の割合



【図2】 CD20(-)CD138(-)の割合

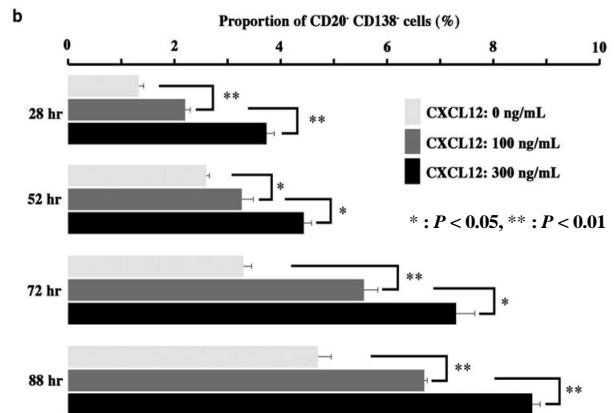
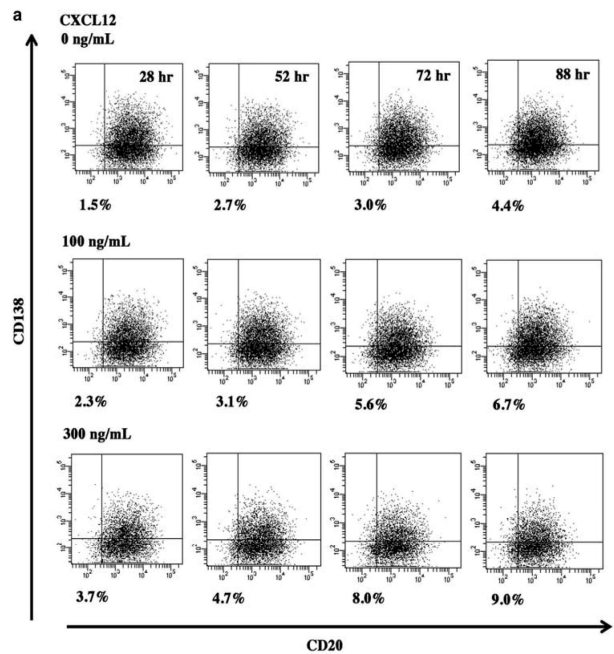
(2) LPL の腫瘍幹細胞候補と考えられる CD20(-)CD138(-) と非腫瘍幹細胞と考えられる CD20(+)CD138(+) とを比較した遺伝子発現マイクロアレイ解析において、CD20(-)CD138(-) で mRNA 発現が有意に高かったケモカインレセプター CXCR7 に着目した。ソーティングした CD20(-)CD138(-), CD20(+)CD138(-), CD20(+)CD138(+) でウエス

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)。なお、「1. 研究開始当初の背景」で述べたように CXCR7 と CXCR4 には密接な関連があるので、CXCR4 の蛋白発現も調べたが、CD20(-)CD138(-), CD20(+)CD138(-), CD20(+)CD138(+) いずれにおいても同様に CXCR4 蛋白発現は低かった (図 3)。



【図3】

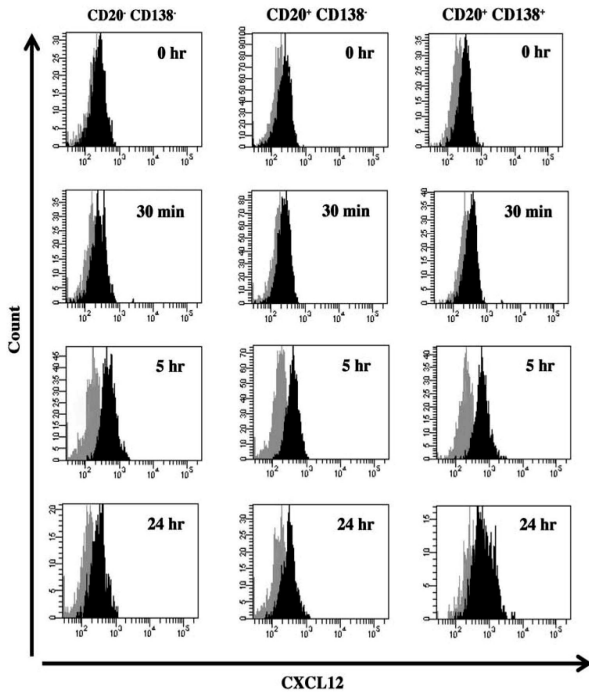
(3) MWCL-1 を CXCL12 で刺激して細胞分画の変化を調べると、CXCL12 で刺激した MWCL-1 は、刺激していない MWCL-1 に比べ、時間の経過とともに濃度依存性に CD20(-)CD138(-) の割合が有意に高くなった (図 4)。



【図4】 CD20(-)CD138(-)の割合

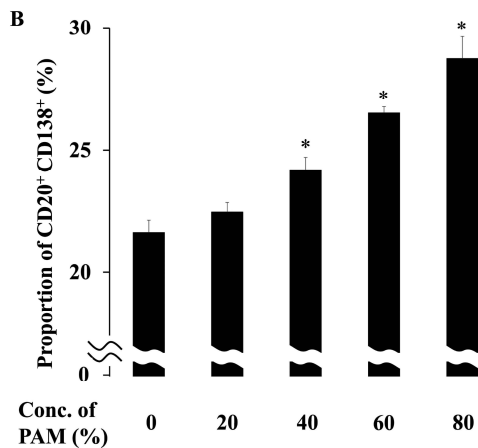
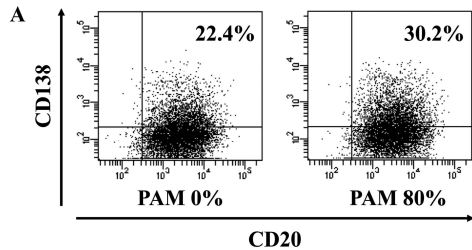
\* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$

(4) MWCL-1 を低酸素で培養すると、CXCL12 の細胞内産生量が高まり、特に CD20(+)CD138(+) で低酸素培養 5 時間後および 24 時間後に顕著な高まりを認めた (図 5)。

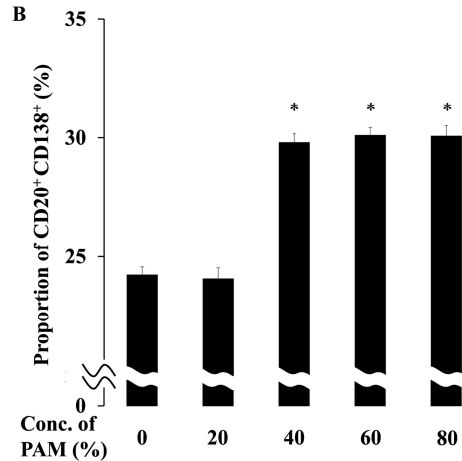
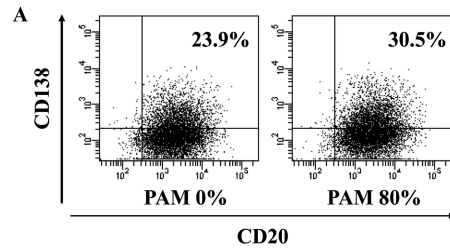


【図 5】灰色領域は陰性コントロール

(5) PAM で 24 時間 MWCL-1 を培養すると CD20(+)CD138(+) の割合が PAM 濃度依存性に高くなった。そして、PAM のこの効果は PAM 濃度 40%以上、培養時間 48 時間でプラトーに達した (図 6: 24 時間後、図 7: 48 時間後)。



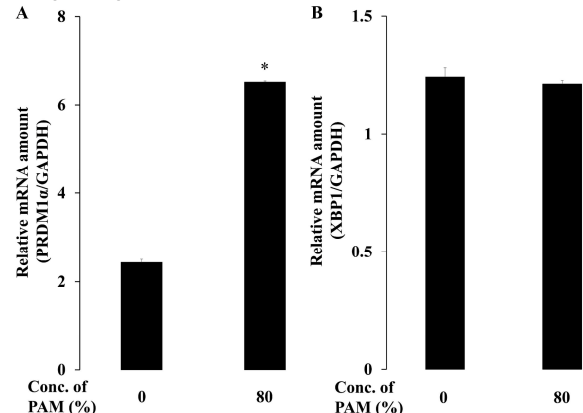
【図 6 (24 時間後)] CD20(+)CD138(+) の割合  
\* p < 0.05 (0% PAM と比較)



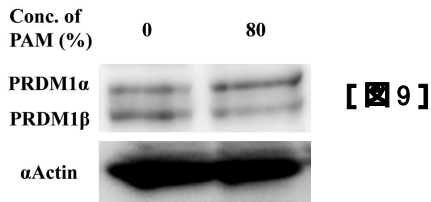
【図 7 (48 時間後)] CD20(+)CD138(+) の割合  
\* p < 0.05 (0% PAM と比較)

(6) 遺伝子発現マイクロアレイ解析により MWCL-1 の未熟細胞 [ CD20(-)CD138(-) ] と分化細胞 [ CD20(+)CD138(+) ] を比較検討したところ、分化細胞 [ CD20(+)CD138(+) ] で発現レベルが高かった遺伝子に形質細胞分化を誘導する転写因子である PRDM1, XBP1 が含まれていた。なお、PRDM1 には 2 つの主なアイソフォームがあり、PRDM1 が形質細胞分化の誘導に関与しており、PRDM1 は PRDM1 のドミナントネガティブフォームである可能性が考えられている。

(7) PAM 培養による PRDM1, XBP1 の mRNA 発現レベルの変化を MWCL-1 で調べると、XBP1 の mRNA 発現レベルに有意な変化はなかったが、PRDM1 の mRNA 発現レベルは有意に高くなった (図 8)。そして、PAM 培養による PRDM1 の蛋白発現レベルの変化を MWCL-1 で調べると、PRDM1 の蛋白発現レベルは高くなり、逆に、PRDM1 の蛋白発現レベルは低くなった (図 9)。



【図 8】\* p < 0.05 (0% PAM と比較)



(8) LPL 細胞株である MWCL-1 の CD20 陰性 CD138 陰性細胞群 (LPL の腫瘍幹細胞候補) で発現する陽性マーカーと、どのような条件下で CD20 陰性 CD138 陰性細胞群が増加するかを検討したところ、CXCR7 が CD20 陰性 CD138 陰性細胞群で発現する陽性マーカーの候補であり、低酸素条件および CXCL12-CXCR7 シグナル下で CD20 陰性 CD138 陰性細胞群が増加することが分かった。一方、PAM の LPL への効果を検討したところ、LPL 細胞株で PAM 培養により PRDM1 (形質細胞分化を誘導する転写因子) を介して CD138 陽性の形質細胞分化が促進されることが分かった。これらの結果は、CXCR7 を標的とした LPL 治療法や、プラズマ照射による LPL 分化誘導療法の開発につながる可能性がある。

#### 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2件)

Wada N, Ikeda JI, Tanaka H, Sakakita H, Horii M, Ikehara Y, Morii E. Effect of plasma-activated medium on the decrease of tumorigenic population in lymphoma. *Pathol Res Pract* 2017;213:773-777. doi: 10.1016/j.prp.2017.04.003.

Wada N, Ikeda J, Nojima S, Tahara S, Ohshima K, Okuzaki D, Morii E. Requirement of CXCL12-CXCR7 signaling for CD20<sup>-</sup> CD138<sup>-</sup> double-negative population in lymphoplasmacytic lymphoma. *Lab Invest* 2016;96:517-525. doi: 10.1038/labinvest.2016.28.

〔学会発表〕(計4件)

和田 直樹(発表代表者) 他、プラズマ照射培養液のリンパ形質細胞性リンパ腫への効果、第106回日本病理学会総会、京王プラザホテル(東京都)、2017年

和田 直樹(発表代表者) 他、Significance of hypoxia and CXCL12-CXCR7 signaling in lymphoplasmacytic lymphoma、第78回日本血液学会学術集会、パシフィコ横浜、2016年

和田 直樹(発表代表者) 他、CXCL12-CXCR7 signaling in lymphoplasmacytic lymphoma、第75回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、2016年

和田 直樹(発表代表者) 他、リンパ形質細胞性リンパ腫(LPL)におけるCXCL12-CXCR7シグナルの意義、第105回日本病理学会総会、仙台国際センター会議棟・展示棟、2016年

〔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講座・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/research.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