

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08323

研究課題名（和文）リンパ節間葉系間質細胞の生物学的特性解明と濾胞性リンパ腫薬物治療への応用

研究課題名（英文）Elucidation of the biological characteristics of lymph node stromal cells and the application to drug therapy

研究代表者

三浦 康生（MIURA, YASUO）

藤田医科大学・医学部・教授

研究者番号：70605146

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

## 研究成果の概要（和文）：

リンパ腫病変の主座となるリンパ節組織には様々な免疫系細胞が存在している。本研究では、リンパ節組織に制御性免疫細胞と認識される間葉系間質細胞が存在し、骨髄間葉系間質細胞と異なる生物学的特性を有していることを、細胞培養と免疫表現解析法や遺伝子発現解析を組み合わせることで明らかにした。さらに、薬物で刺激することで、間葉系間質細胞のリンパ腫細胞の増殖支持能を抑制することを示した。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性腫瘍であるリンパ腫において腫瘍微小環境を標的とした薬物治療が有効であることの概念実証を示したことに学術的意義がある。わが国のガン統計によると、リンパ腫死亡者数は年間1万人以上で増加の一途をたどっており、薬物療法の基盤開発を通じたがん対策の観点から社会的意義がある。

## 研究成果の概要（英文）：

Various immune cells exist in the lymph node tissue, which is the main site of lymphoma lesions. In this study, we demonstrated the presence of mesenchymal stromal cells, which are recognized as one of the regulatory immune cells, in lymph node tissue. They have distinct biological characteristics from bone marrow-derived mesenchymal stromal cells, using a combination of cell culture and immunohistochemical and gene expression analyses. Furthermore, we showed that pharmacological stimulation can suppress the growth-supportive ability of lymphoma cells by mesenchymal stromal cells.

研究分野：血液・腫瘍学

キーワード：造血器腫瘍 間葉系間質細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

わが国のガン統計によると、リンパ腫死亡者数は年間約 12,000 人で部位別死亡数の上位 9 位に位置し、罹患率は 10 年前の約 2 倍、30 年前の約 3 倍と増加の一途をたどっている (国立がん研究センターガン対策情報センター資料 2015 年)。

リンパ腫病変の主座となるリンパ節組織には細胞障害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL), 制御性 T 細胞 (regulatory T cell, TREG), 濾胞性ヘルパー T 細胞 (T follicular helper cell, Tfh), 濾胞性樹状細胞 (follicular dendritic cell, FDC) など様々な免疫系細胞が存在している。

これまでの研究によって、リンパ腫細胞はこれらの細胞から生存や抗がん剤抵抗性に有利な分子シグナルを受け取っていることが示されている (J Clin Invest. 2012 Oct;122(10):3424-31. doi: 10.1172/JCI63186)。つまり、リンパ腫の病態には、リンパ腫細胞のジェネティクス・エピジェネティクス異常に加えて、リンパ腫細胞の腫瘍微小環境 (tumor microenvironment) が外部から及ぼす影響が関与している。

### 2. 研究の目的

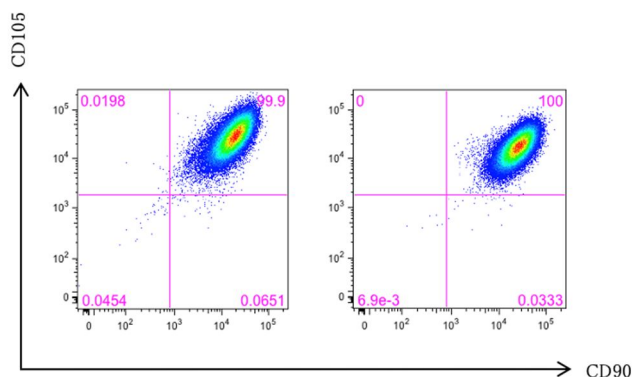
本研究課題では、制御性免疫細胞と認識される間葉系間質細胞に着目し、リンパ腫由来リンパ節組織に存在する間葉系間質細胞の特性を解析する。間葉系間質細胞がリンパ腫細胞に及ぼす生物学的影響を明らかにし、間葉系間質細胞を標的としたリンパ腫薬物治療の rationale を得る。本研究は新たなリンパ腫治療戦略の基盤開発を視野においたものであるが、悪性腫瘍治療において tumor microenvironment を標的とした薬物治療が有効であることの proof of concept を示すことに意義がある。

### 3. 研究の方法

リンパ腫細胞と間葉系間質細胞の蛋白分子発現はフローサイトメトリー法またはウエスタンブロッティング法で検討した。遺伝子発現の網羅的な解析はマイクロアレイ法を用いて行い、特定の遺伝子発現は定量的 PCR 法で検討した。間葉系間質細胞の分化誘導実験は我々の既報に記載された方法に基づいて行った (Int J Hematol. 2015 Aug;102(2):218-29. doi: 10.1007/s12185-015-1828-7)。リンパ腫細胞と間葉系間質細胞の相互作用は共培養系で評価し、一部の実験は液性分子と細胞接着分子の効果を分離する目的にセルカルチャーインサートを用いて行った。

### 4. 研究成果

リンパ腫由来リンパ節組織から単離した細胞の中には、CD90 などの間葉系間質細胞に発現する表面マーカーを有する細胞集団が存在することをフローサイトメトリー法で確認した。これ



リンパ腫由来リンパ節組織から単離した細胞を培養し、ディッシュに接着した細胞を拡大培養してフローサイトメトリー検査に供した。右図はCD90 (横軸)とCD105(縦軸)が陽性の細胞集団を示す。左図は骨髄由来間葉系間質細胞のCD90およびCD105の発現を示す。

らの細胞を in vitro で拡大培養しさらなる解析に供した。特殊な培養条件下で分化誘導をすると、骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞が特徴的に有する物質の発現が誘導され、中胚葉系細胞に分化能を示すことを観察した。さらに、これらの細胞は in vitro でコロニー形成能を示した。以上の結果より、リンパ腫由来リンパ節組織には間葉系間質細胞が存在することを示した。

リンパ腫由来リンパ節組織に由来する間葉系間質細胞からメッセンジャーRNAを抽出し、マイクロアレイ法を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、対照細胞集団と比較して異なる遺伝子発現プロファイルを示し、いくつかの遺伝子ファミリーの発現レベルが極端に変化していることが明らかとなった。それらのうちの一つの分子に焦点を絞り、定量的PCR法とウエスタンブロットング法を行って遺伝子レベルおよび蛋白レベルでの低発現を確認した。本遺伝子を間葉系間質細胞に強制発現したところ、population doublingの回数が減少し、telomerase reverse transcriptaseの発現が低下した。

リンパ腫由来リンパ節組織からリンパ腫細胞を含むCD19陽性細胞集団をソーティングした。また、CD19陰性細胞集団をソーティングし、接着法を用いて間葉系間質細胞を分離・拡大培養した。このようにして得た2種類の細胞集団をin vitroで共培養を行うと、単独培養と比べてCD19陽性細胞の増幅が促進した。ウエスタンブロットング法やフローサイトメトリー法を用いて、増幅したCD19陽性細胞集団の解析を行ったところ、生存に有利な分子シグナルに変化が観察された。以上の結果より、リンパ腫由来リンパ節組織に存在する間葉系間質細胞は特徴的な性質を有し、リンパ腫細胞の生存を支持することが示された。

化合物ライブラリーを応用したスクリーニングで得られた候補物質を用い、薬物的に間葉系間質細胞を刺激し同様の共培養実験を行うとリンパ腫細胞の増幅が抑制された。この効果は共培養実験系にセルカルチャーインサートをを用いるとキャンセルされた。以上のことから、この候補化合物は間葉系間質細胞の細胞表面分子の発現に影響を及ぼし、リンパ腫細胞との直接的な細胞・細胞間作用を制御することでリンパ腫細胞の増幅を抑制することが示唆された。すなわち、リンパ腫細胞の生存制御において、リンパ腫細胞の周囲環境を構成する間葉系間質細胞を標的とした薬物療法が有効である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Researchmap  
<https://researchmap.jp/7000009040/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	藤井 紀恵  (Fujii Sumie)  (50834058)	藤田医科大学・医学部・講師    (33916)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関