様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年　5 月　1 日現在

研究種目：若手研究(B)
研究期間：2007～2008
課題番号：19790258
研究課題名（和文）　悪性リンパ腫における腫瘍幹細胞の解析

研究課題名（英文）　Analysis of cancer stem cells in malignant lymphoma

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: 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，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.まず乳癌細胞株より CD55 を同定し，これが高発現する細胞を多く含む乳癌症例は予後不良であることを示した．また悪性リンパ腫細胞株において，Notch2 を高発現する細胞の方が，低発現ものより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.

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総　計	3,300,000	480,000	3,780,000

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

最近，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，白血

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全く不明である．そこで，本研究では，悪性リンパ腫における腫瘍幹細胞の存在を検討してそ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．

３．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．今回，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 画分を多く含む乳癌細胞株より side-population で高発現する遺伝子として同定した CD55 を用いて，その発現と予後との関係を乳癌臨床検体を用いて検討したところ,CD55 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)造血系や間葉系の幹細胞に発現が報告されている CDCP1 について，肺腺癌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，CDCP1 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．

(1)(2)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．

(3)悪性リンパ腫細胞株より，乳癌細胞株の side-population で高発現するマーカーを用いて検討した結果,Notch2 の発現が高いものの方が，低いもの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．また，side-population を有する悪性リンパ腫細胞株について side-population 画分をソートし,細胞を NOD/Scid マウスに移植した．すると，side-population 画分の方が，造腫瘍能が高かった．

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 小田知文，池田純一郎（他 4 名，4 番目）
Prognostic significance of heat shock protein 105 in lung adenocarcinoma.

Mol Med Reports, in press, 査読有

② 中道尚人, 池田純一郎（他６名, ３番目）Synergistic effect of interleukin-6 and endoplasmic reticulum stress inducers on the high level of ABCG2 expression in plasma cells. Lab Invest, 89:327-336, 2009, 査読有

③ 池田純一郎（他７名, １番目）Expression of CUB domain containing protein (CDCP1) is correlated with prognosis and survival of patients with adenocarcinoma of lung. Cancer Sci, 100:429-433, 2009, 査読有

④ 池田純一郎（他８名, １番目）Prognostic significance of CD55 expression in breast cancer. Clin Cancer Res, 14:4780-4786, 2008, 査読有

⑤ 山内周, 池田純一郎(他 9 名, 3 番目) Diffuse large B-cell lymphoma showing an interfollicular pattern of proliferation: a study of the Osaka Lymphoma Study Group. Histopathology, 52:731-737, 2008, 査読有

⑥ 河面聡, 池田純一郎（他 9 名, 9 番目）Multiple organ mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma presenting with lymphangitic pattern of spread in the lung. J Thorac Oncol, 2:1057-1059, 2007, 査読有

⑦ 池田純一郎(他７名, １番目) Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type developing in gonarthritis deformans. J Clin Oncol, 25:4310-4312, 2007, 査読有

⑧ 山内周, 池田純一郎(他 9 名, 3 番目) Diffuse large B-cell lymphoma in the young in Japan: a study by the Osaka Lymphoma Study Group. Am J Hematol, 82:893-897, 2007, 査読有

⑨ 徐静嫻, 池田純一郎（他 5 名, 5 番目）High tolerance to apoptotic stimuli induced by serum depletion and ceramide in side-population cells: high expression of CD55 as a novel character for side-population. Exp Cell Res, 313:1877-1885, 2007, 査読有

⑩ 星田義彦, 池田純一郎（他９名, ５番目）Lymphoproliferative disorders in rheumatoid arthritis: clinicopathological analysis of 76 cases in relation to methotrexate medication. J Rheumatol, 34: 322-331, 2007, 査読有

⑪ 池田純一郎(他８名, １番目) Mediastinal lymphangiomatosis coexisting with occult thymic carcinoma. Virchow Arch, 450: 211-214, 2007, 査読有

〔学会発表〕（計４件）

① 池田純一郎, 森井英一, 青笹克之, B 細胞性リンパ腫の腫瘍発生と Notch2 発現との関連, 第 67 回日本癌学会学術総会, 2008 年 10 月 28 日, 名古屋国際会議場

② 森井英一, 池田純一郎, 青笹克之, 敗戦癌における新規レセプターCDCP1 の発現意義, 第 67 回日本癌学会学術総会, 2008 年 10 月 28 日, 名古屋国際会議場

③ 森井英一, 池田純一郎, 青笹克之, 腫瘍幹細胞的な性格を有する CD55 高発現細胞の解析, 第 97 回日本病理学会学術総会, 2008 年 5 月 16 日, ホテル日航金沢

④ 池田純一郎, 変形性膝関節症から発生した MALT リンパ腫, 第 40 回日本病理学会近畿支部学術集会, 2008 年 2 月 2 日, 大阪市立大学

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：