

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 24 日現在

機関番号：31201  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2011  
 課題番号：20790288  
 研究課題名（和文）濾胞性リンパ腫のがん幹細胞における miRNA の網羅的検討  
 研究課題名（英文）Global analysis for miRNA of cancer stem cells in follicular lymphoma.  
 研究代表者  
 阿保亜紀子（八嶋亜紀子）（Abo Akiko）  
 岩手医科大学・医学部・講師  
 研究者番号：80326686

研究成果の概要（和文）：

濾胞性リンパ腫の難治性治療戦略を考える上で、リンパ腫内のがん幹細胞（cancer stem cell）の存在を明らかにすることが求められる。我々は濾胞性リンパ腫における SP 細胞、non-SP 細胞を分離、回収し、microRNA (miRNA) の発現プロファイルを作成した。cell line (FL-218) を用いた検討では多能性幹細胞関連転写因子の発現抑制を示す miRNA の発現低下がみられた。また BCL6 などの BTB/POZ family を標的とした miRNA の発現増加も確認された。

研究成果の概要（英文）：

We investigated the differential expression of miRNA between SP cells and non-SP cells of human follicular lymphoma (FLs). This study demonstrates that down expression of microRNA contribute to the down regulation of multipotent stem cell transcription factor in SP cells, and that over expression of microRNA targeting BCL6.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	769,928	230,978	1,000,906
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
総計	3,869,928	1,160,978	5,030,906

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：濾胞性リンパ腫、がん幹細胞、microRNA SP細胞

1. 研究開始当初の背景

本邦における濾胞性リンパ腫の発生は年々、増加傾向にある。濾胞性リンパ腫は、組織学的には明瞭な濾胞様結節を形成し、結節内には CD10, CD20, bcl-2 陽性の異型リンパ球が浸潤し、診断の確立された疾患である。およそ

80%の症例で、t(14;18) 転座を有する。経過は緩やかで、初期には治療に良好な反応を示すが、再発を繰り返すのが特徴である。難治性の濾胞性リンパ腫の治療戦略を考える上で、リンパ腫内のがん幹細胞 (cancer stem cell) の存在を明らかにする必要がある。

## 2. 研究の目的

近年、タンパク質をコードしない non-coding RNA である miRNA が注目されている。miRNA は発生や細胞分化の研究分野で精力的に解析が進んでおり、がん関連遺伝子の発現制御に関わる miRNA も次々に特定されている。

我々は、濾胞性リンパ腫において SP 細胞および non-SP 細胞における microRNA (miRNA) の発現プロファイルを作成し、リンパ腫関連遺伝子および分化・成熟の発現制御に関わる miRNA を特定する。さらに、個々の miRNA の細胞生物学的意義を検証し、リンパ腫の発生・進展に関する生物学的意義を明らかにすることが期待される。

## 3. 研究の方法

STEP1: 濾胞性リンパ腫の cell line (FL-218) を用いた解析

a. FACSria を用いた SP 細胞, non-SP 細胞の分取  
腫瘍細胞株をヘキスト色素 33342 で染色後、FACSria に流し、色素を排出する細胞集団である SP 細胞分画を分取する。同時に幹細胞がないと考えられ、ヘキスト色素を排出しない non-SP 細胞分画を分取する。

b. SP 細胞および non-SP 細胞における miRNA array の網羅的な検討  
① Total RNA を miVena™ miRNA Isolation Kit (Applied Biosystems, ABI, Foster City, CA, USA) を用いて抽出する。

② DNA oligonucleotide probes from the miVena™ miRNA Probe Set (Ver. 1.01, ABI) を用いて miRNA microarray を行う。解析には GenPIX 4000B Array Scanner (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) および Array-Pro Analyzer Ver. 4.5 (Mettler Cybernetics, Inc., Silver Spring, MD, USA) あるいは ABI prism 7500 を用いる。

c. SP 細胞および non-SP 細胞をそれぞれヌードマウスの皮下へ移植し、腫瘍形成能の検討

STEP2: 濾胞性リンパ腫の患者リンパ節を用いた解析

a. FACSria を用いて患者リンパ腫細胞中の SP 細胞および non-SP 細胞を分取 → STEP1-a に準ずる。

b. SP 細胞および non-SP 細胞における miRNA array により、変化する miRNA を網羅的に検討する。→ STEP1-b に準ずる。

c. SP 細胞および non-SP 細胞をそれぞれヌードマウスの皮下へ移植し、腫瘍形成能をみる。→ STEP1-c に準ずる。

STEP3: 細胞株および患者リンパ節に共通して発現変動する miRNA の生物学的意義の検証する。

## 4. 研究成果

① cell line (FL-218) を用いた検討では FACS 解析の結果から SP 細胞 (0.05%, Figure 1-A) および non-SP 細胞を分取可能であった。コントロールとして Verapamil を添加した場合には SP 細胞分画は消失した (Figure 1-B)。

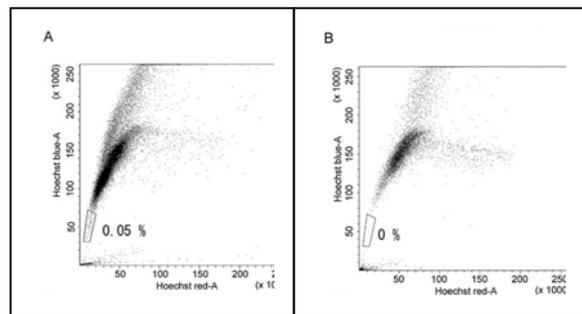


Figure 1.

② miRNA microarray の解析: SP 細胞と non-SP 細胞で異なる発現を示す miRNA を解析したところ、SP 細胞では多能性幹細胞関連転写因子の発現抑制を示す miRNA の発現低下がみられた。また BCL6 などの B/TB/POZ family を標的とした miRNA の発現増加も確認された。

③ SP 細胞および non-SP 細胞のヌードマウスへの移植: いずれの細胞分画も腫瘍形成能は見られなかった。

④ 濾胞性リンパ腫の患者リンパ節では十分な SP 細胞を採取することが出来ず、解析することができなかったが、今後、他の検索手段を用いて発展させるつもりである。

以上より濾胞性リンパ腫の cell line において SP 細胞分画にがん幹細胞が濃縮されている可能性がある。しかし SP 細胞には腫瘍形成能がみられなかったことから、濾胞性リンパ腫の場合、濾胞樹状細胞と考えられるニッチが腫瘍性増殖および組織構築に関与することが推測される。

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 5 件)

1. 河合萌子, 佐藤孝, 阿保重紀子, 松下翔子, 遠藤幹也, 山田友紀, 増田友之. 胸椎圧迫骨折で発見された小児結核の1例. 診断病理 査読有 28巻 3号 167-170(2011)
2. 吉田朋世, 江原茂, 古町克郎, 西田淳, 小谷康慈, 阿保重紀子. 画像診断と病理 Glomus腫瘍. 画像診断 査読有 30巻 14号 1398-1399 (2010)
3. 伊藤薫樹, 阿保重紀子, 石田陽治. 節外性B細胞リンパ腫診療の新たな展開- 精巣リンパ腫の特性と根治的な治療法. 血液・腫瘍科 査読無 61巻 3号 331-335 (2010)
4. Nagata Y, Maesawa C, Tada H, Takikawa Y, Yashima-Atsuo A, Masuda T. Differential microRNA expression between bone marrow stromal cells and hepatocytes in adult mice. Int J Med Biol. 査読有 2009;24:35-43.
5. Mito mo S, Maesawa C, Ogasawara S, Iwaya T, Shibasaki M, Yashima-Atsuo A, Kotani K, Okawa H, Sakurai E, Izutsu N, Kato K, Komatsu H, Ikeda K, Wakabayashi G, Masuda T. Cancer Sci. 査読有 2008;99:280-6

[学会発表] (計 13件)

1. 佐藤孝, 阿保重紀子, 増田友之. ヒト脾臓の組織発生. 第 51回日本リンパ網内系学会;2011;福岡.
2. 筑紫泰彦, 古和田周吾, 小宅達郎, 菅原健, 伊藤薫樹, 村井一範, 阿保重紀子, 佐藤孝, 石田陽治. 腫瘍随伴症候群として脳幹脳炎を伴ったAnaplastic large cell lymphoma, ALKnegative の一例. 第 51回日本リンパ網内系学会;2011;福岡.
3. 阿保重紀子, 青木有生, 阿保徹, 鈴木啓二郎, 佐藤孝, 石田陽治, 増田友之. CyclinD1陽性を示した非分泌型形質細胞腫瘍の二例. 第 51回日本リンパ網内系学会;2011;福岡.

4. 佐藤孝, 阿保重紀子, 増田友之. ヒト脾臓の組織発生について. 第 100回日本病理学会総会;2011;東京.
5. 阿保重紀子, 佐藤孝, 増田友之, 泉田亘, 小宅達郎, 石田陽治. B-ALLの経過中に発症した組織球肉腫の一例. 第 50回日本リンパ網内系学会;2010;新潟.
6. 佐藤雅之, 宮本章弘, 及川浩樹, 阿保重紀子, 増田友之, 前沢千早. 乳房外Paget病におけるHER2およびTUBB3蛋白質の発現解析. 第 99回日本病理学会総会;2010;東京.
7. 阿保重紀子, 佐藤孝, 菅井有, 増田友之. 胚中心進展性異形成(PTCC)に合併した古典的ホジキンリンパ腫の一例. 第 99回日本病理学会総会;2010;東京.
8. 館道芳徳, 及川浩樹, 小谷康慈, 阿保重紀子, 前沢千早, 佐藤孝, 佐多徹太郎, 増田友之. 尿道カルシクルの診断で切除された病変. 第 68回日本病理学会東北支部学術集会;2009;仙台.
9. 佐藤孝, 小谷康慈, 阿保重紀子, 増田友之, 小島勝. 脾臓、腹腔内リンパ節濾胞辺縁帯の比較解剖. 第 48回日本リンパ網内系学会;2008;札幌.
10. 佐藤孝, 小谷康慈, 阿保重紀子, 増田友之, 小島勝. 脾臓、腹腔内リンパ節濾胞辺縁帯の比較解剖について. 第 97回日本病理学会総会;2008;金沢.
11. 井筒直子, 阿保重紀子, 前沢千早, 増田友之. 卵巣癌における $\beta$ III-tubulin過剰発現に関わるエピジェネティックな制御機構. 第 97回日本病理学会総会;2008;金沢.
12. 加藤久仁之, 前沢千早, 小谷康慈, 阿保重紀子, 及川浩樹, 佐藤孝, 大塚幸喜, 若林剛, 増田友之. 大腸癌におけるL1 cell adhesion molecule(L1)の発現に関わるDNAメチル化状態の解析. 第 97回日本病理学会総会;2008;金沢.
13. 及川浩樹, 前沢千早, 小谷康慈, 館道芳徳, 多田広志, 加藤久仁之, 阿保重紀子, 佐藤孝, 増田友之. ヒト肝星細胞におけるAngiotensin IIによるEGFRの活性化とADAM7の関連の検討. 第 97回日本病理学会総会;2008;金沢.

14. 永田有希, 阿保亜紀子, 前沢千早, 増田友之. マウス造血幹細胞と肝細胞におけるmiRNA発現比較. 第97回日本病理学会総会;2008, 金沢.

〔図書〕(計1件)

1. 阿保亜紀子, 佐藤孝. へるす出版、脾臓－基礎と臨床(沖永功太編)、2011, 19-22

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

阿保 亜紀子 (ABO AKIKO)  
岩手医科大学・医学部・講師  
研究者番号：8032668

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：