

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 5 月 21 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700884

研究課題名（和文） 成熟リンパ系腫瘍の“がん幹細胞”の同定

研究課題名（英文）

Identification of “cancer stem cell” of mature lymphoid malignancy

研究代表者

伊藤 旭 (ITO ASAHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：00571762

研究成果の概要（和文）：

悪性リンパ腫幹細胞の探索・同定のため、患者検体を用いてNOGマウスでの悪性リンパ腫モデルの作製を行った。マンツル細胞リンパ腫の腫瘍細胞は肝臓・脾臓・骨髄など全身の臓器に浸潤し、腹腔内にも巨大な腫瘍を形成した。またその腫瘍から得られた細胞は新たなNOGマウスへの継代が可能であった。また、血管免疫芽球性T細胞性リンパ腫のNOGマウスモデルについては、継代移植したマウス体内において形成された腫瘍と患者の腫瘍につき分析の結果、患者の腫瘍と初代から4代目までのNOGマウスでの腫瘍はみな同一のクローンであることが示された。そして2代目以降は初代のマウスでみられたようなB細胞や形質細胞、 γ グロブリンの産生など、反応性の要素が消失しており、NOGマウス体内で腫瘍細胞が造腫瘍能を徐々に増強していったと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

For a search and the identification of malignant lymphoma stem cells, we made the malignant lymphoma model with the NOG mouse using patient samples. The tumor cells of the mantle cell lymphoma invaded the systemic organ including liver, spleen, bone marrow and formed a bulky mass in the abdominal cavity. The cells obtained from the tumor were available for the passage to new NOG mouse. And about the model of the angioimmunoblastic T-cell lymphoma, it was shown that all tumors of the patients and NOG mice from the first to the fourth generation were the same clones as a result of analysis. And B cells, plasma cells and the production of the gamma globulin the reactive component seen with the first generation disappeared the second generation later, and tumor cells were thought to gradually reinforce the tumorigenesis in the NOG mouse in vivo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：NOG マウス, 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

近年の幹細胞生物学の進歩に伴い、発がん過程を正常組織と同様に幹細胞システムという観点からとらえようという考え方が脚光を浴びており、がん細胞の源となる“がん幹細胞”(Cancer Stem Cell: CSC)の存在が多くのがん種で証明されつつあった。この概念は1997年に急性骨髄性白血病(acute myeloid leukemia: AML)において白血病幹細胞(leukemia stem cell: LSC)として最初に証明された。すなわち AML 細胞中にはごく少数の LSC が存在し、自己複製をしながら大多数の白血病芽球を供給する“白血病幹細胞システム”により白血病が構成されており、AML の LSC は、正常造血幹細胞(hematopoietic stem cell: HSC)と同様のフェノタイプを示す CD34 陽性 CD38 陰性分画に存在することが明らかになった。AML における CSC(LSC)の探索は、AML の LSC が HSC レベルの未分化な細胞であること、AML のヒエラルキーが正常造血システムの未分化な細胞群と同様のヒエラルキーを構成していることから、比較的アプローチが容易であったといえる。上記のごとく AML の幹細胞システムが明らかになってきたのに対し、成熟リンパ系腫瘍の悪性リンパ腫幹細胞(lymphoma stem cell: LSC)システムは、解明の糸口さえ得られていなかった。成熟リンパ系腫瘍細胞は、正常造血システムのリンパ球分化の比較的后半の細胞と同様のフェノタイプを有しており、分化したリンパ球が腫瘍化し LSC として機能していることが推定される。故に、これまでによく解析されている HSC 周辺細胞の正常造血システムの分化ヒエラルキーと、成熟リンパ系腫瘍の LSC システムが大きく異なるであろうことが推定され、そのことが成熟リンパ系腫瘍の LSC の探索・同定を困難にしている最大の要因と考えられる。

2. 研究の目的

申請者らのグループは難治性成熟 T 細胞性腫瘍に対する分子標的治療の開発研究を行ってきた。この難治性成熟 T 細胞性腫瘍に対する新規抗体療法開発のトランスレーショナルリサーチの過程で、抗体薬の前臨床 in vivo 評価システム確立のため、申請者らは、重度複合免疫不全マウス、NOD/Shi-*scid*, IL-2R γ ^{null}(NOG)マウスを用いて複数のヒト免疫担当細胞移入、成熟リンパ系腫瘍モデルを作成した。これらの成熟リンパ系腫瘍モデルから得られた腫瘍細胞を 2 次移植、3 次移

植しモデルマウスを再現する実験の過程で、成熟リンパ系腫瘍においても、腫瘍細胞のフェノタイプは heterogeneous であり、各臓器由来の腫瘍細胞毎に造腫瘍能に著しい差異があることを見いだした。この所見は成熟リンパ系腫瘍においても、AML 同様に LSC を頂点とするヒエラルキーが存在することを示唆する。LSC(CSC)の同定には、Hoechst 染色により SP 分画、MP 分画に isolation する方法も含め、様々な実験手法が報告されていたが、『LSC(CSC)は免疫不全マウスに腫瘍細胞を移植した際に、移植マウスにおいて再度元の腫瘍と同じ組織学的・細胞生化学的特徴を有する腫瘍をつくる能力を有する細胞である』とする実験手法が AML の LSC 同定にも用いられ、最も実績があると考えられた。したがって申請者らは NOG マウスを用いた、移植継代を基盤実験手法として、未だ明らかになっていない成熟リンパ系腫瘍の LSC を同定することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 悪性リンパ腫モデルマウスの作製

本研究の第一段階は免疫不全マウスでの成熟リンパ系腫瘍(悪性リンパ腫)モデルの作製である。申請者らの研究では、患者由来の悪性リンパ腫腫瘍細胞を用いた。具体的にはマントル細胞リンパ腫の患者細胞と血管免疫芽球形 T 細胞リンパ腫の患者細胞を用いた。従来までの免疫不全マウス(SCID マウス、NOD/SCID マウス)では、患者由来の悪性リンパ腫細胞を生着させ、そのモデルを作製するのは極めて困難であった。故に、患者由来の腫瘍細胞を用いた LSC の探索・同定研究には限界があった。しかしながら、より免疫不全の強い NOD/Shi-*scid*, IL-2R γ ^{null} マウス(NOG マウス)マウスの開発が、それを比較的高率に可能とした。NOG マウスは、従来までの免疫不全マウスと比較して、多様なヒト細胞が分化、増殖することが可能である。上記のように第一段階として、NOG マウスを用いて、患者の腫瘍細胞由来の様々な悪性リンパ腫モデル作製を試みた。

(2) 長期間にわたる造腫瘍能の高い悪性リンパ腫腫瘍細胞集団の同定、単離

これまでの NOG/患者由来悪性リンパ腫モデルマウス作製の経験から、NOG マウスにおけるヒト悪性リンパ腫細胞の浸潤臓器には、悪性リンパ腫の組織型毎の、あるいは患者の臨床像毎での、特定の傾向が示唆されている。

我々は、『がん幹細胞』を維持する生物学的適所であるニッチに注目し、NOG マウス体内での悪性リンパ腫細胞の浸潤臓器に焦点をあて、悪性リンパ腫細胞を分離することとした。すなわち、NOG 体内の悪性リンパ腫細胞を、リンパ組織、骨髄、末梢血、その他の臓器、など存在臓器別細胞群に分離する。これらの細胞群を NOG マウスに移植し、造腫瘍能を評価する。この際、造腫瘍能の強い細胞群のなかにより多くの LSC が存在すると考えられる。次に造腫瘍能の強い細胞群と造腫瘍能の弱い細胞群において、複数のリンパ球関連抗原の発現プロファイルをフローサイトメトリー法で解析、比較する。この際、より造腫瘍能の強い細胞群で強く発現し、また健常リンパ球の分化抗原と対比し、より未熟な細胞群で発現の強い抗原を選定する。そして、先の移植実験で同定した『造腫瘍能の強い細胞群』をさらに選定した表面抗原の発現の強弱あるいは有無により群分けし、NOG マウスで継代実験を行い、造腫瘍能を評価する。すなわち長期間にわたる造腫瘍能の高い悪性リンパ腫腫瘍細胞集団を同定、単離することとした。

4. 研究成果

(1) 悪性リンパ腫モデルマウスの作製

まず成熟リンパ系腫瘍(悪性リンパ腫)モデルの作製を行った。研究計画のとおり、細胞株ではなく悪性リンパ腫の患者検体を用いて、免疫不全マウスである NOG マウスへの生着実験を行った。

第一に、血管免疫芽球性 T 細胞性リンパ腫(AITL)の患者検体を NOG マウスに移植した。AITL 細胞は NOG マウスの肝臓、脾臓、骨髄など全身の臓器に浸潤し、その病変から得られた細胞は新たな NOG マウスへの継代が可能であった。病理組織像では血管新生を伴い、また血清中にヒト免疫グロブリンの産生がみられるなど、患者の臨床・病理像と類似していた。

第二に、EB ウイルス関連 T 細胞性悪性リンパ腫の患者検体を NOG マウスに移植した。腫瘍細胞は NOG マウスの肝臓、脾臓、腎臓などに浸潤し、その病変から得られた細胞はやはり新たな NOG マウスへの継代が可能であった。病理組織像では腫瘍細胞は T 細胞マーカーのほか EBER が陽性であり、また血清中の AST/ALT の肝酵素の上昇がみられるなど、患者と類似した臨床・病理像を示した。

第三に、マントル細胞リンパ腫の患者検体を NOG マウスに移植し、腫瘍細胞は肝臓・脾臓・骨髄など全身の臓器に浸潤し、腹腔内にも巨大な腫瘍を形成した。またその腫瘍から得られた細胞は新たな NOG マウスへの継代が可能であった。

このように、NOG マウスに患者由来の腫瘍細胞を移植することにより、患者の臨床像、病理像に近い形で悪性リンパ腫のモデルマウスを作成することができた。

(2) 長期間にわたる造腫瘍能の高い悪性リンパ腫腫瘍細胞集団の同定、単離

まず、血管免疫芽球性 T 細胞性リンパ腫の NOG マウスモデルについて、継代移植したマウス体内において形成された腫瘍と患者の腫瘍につき TCR クロナリティアッセイを施行した。その結果、患者の腫瘍と初代から 4 代目までの NOG マウスでの腫瘍はみな同一のクローンであることが示された。そして 2 代目以降は初代のマウスでみられたような B 細胞や形質細胞、 γ グロブリンの産生など、反応性の要素は消失しており、NOG マウス体内で腫瘍細胞が造腫瘍能を徐々に増強していったと考えられた。

また、マントル細胞リンパ腫の NOG マウスモデルについて、我々はこの腫瘍細胞における CD9 の発現に幅があることに着目し、磁気ビーズを用いて腫瘍を CD9 陽性の細胞分画と CD9 陰性の細胞分画にわけ、それぞれ細胞数を同じにして NOG マウスへ移植し、造腫瘍能に差異があるか実験を行った。その結果、CD9 陽性腫瘍細胞を移植した群と、CD9 陰性腫瘍細胞を移植した群で、造腫瘍能に差異はみとめなかった。

したがって NOG マウスにおいて長期間にわたる造腫瘍能の高い悪性リンパ腫腫瘍細胞集団とそれ以外の集団を見出だし、それぞれの genetic な相違を cDNA micro array で比較・解析するという当初の研究実施計画を完遂することはできなかった。しかし今後も NOG マウスにおいて長期間にわたる造腫瘍能の高い悪性リンパ腫腫瘍細胞集団とそれ以外の集団の genetic な相違を解析していく予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

①伊藤旭
Establishment of an angioimmunoblastic T-cell lymphoma(AITL) model in the NOG mouse

第 73 回日本血液学会学術集会
プレナリーセッション

2011 年 10 月 15 日 名古屋

②伊藤旭
NOG マウスモデルによる

T細胞性リンパ腫の病態解明
第51回日本リンパ網内系学会総会
シンポジウム「T/NK細胞腫瘍：診療と研究の
新たな展開」
2011年7月2日 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 旭 (ITO ASAHI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科
・研究員
研究者番号：00571762

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし