

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590425

研究課題名(和文) 各種腫瘍における腫瘍幹細胞動態を制御する因子に関する解析

研究課題名(英文) Regulatory mechanism for cancer stem cells in various tumors

研究代表者

森井 英一 (Eiichi, Morii)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10283772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍幹細胞は放射線療法や化学療法に耐性の一群の細胞で、腫瘍の転移や再発の原因になるとされている。本研究では、腫瘍幹細胞の動態を解明する目的で、様々な腫瘍における腫瘍幹細胞を解析した。悪性リンパ腫の一種であるホジキンリンパ腫では、小型単核の細胞の中に腫瘍幹細胞としての性格をもつものがあり、この一群の細胞では活性酸素除去能力が高かった。またリンパ球形質細胞性リンパ腫では、Bリンパ球、形質細胞いずれのマーカーも発現しない一群の細胞が腫瘍幹細胞としての性格をもつことを明らかにした。子宮内膜癌では、腫瘍幹細胞の数を制御する因子としてTGF-betaシグナルが重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells (CSCs) are supposed to cause metastasis and recurrence of tumors, because these are resistant to various therapies. Here, we analyzed CSCs in various tumors. In Hodgkin lymphoma, small cells with single nucleus were CSCs, which expelled efficiently reactive oxygen species (ROS). In lymphoplasmacytic lymphoma, tumor cells with no expression of B lymphocyte and plasma cell markers were CSCs, because these non-expressing cells yielded B lymphocyte marker-positive and plasma cell marker-positive cells. These non-expressing cells were resistant to anti-cancer drugs and eliminated ROS. Moreover, in endometrioid adenocarcinoma, aldehyde dehydrogenase (ALDH) high cells, which were revealed to be CSCs, were regulated by TGF-beta signal. The inhibition of signal increased ALDH-hi population, and the addition of TGF-beta stimulator reduced ALDH-hi. These results suggested that CSCs were present in various tumors, and their regulation will be necessary for anti-tumor therapies.

研究分野：人体病理学

科研費の分科・細目：分子病理

キーワード：腫瘍幹細胞 制御因子 腫瘍

1. 研究開始当初の背景

腫瘍幹細胞は、化学療法や放射線療法に耐性をもつ一群の腫瘍細胞で、腫瘍の再発や転移の原因となることが知られている。腫瘍幹細胞は、非腫瘍幹細胞を産生するが、非腫瘍幹細胞からは腫瘍幹細胞は生じないと、研究開始当初は考えられていた。また、腫瘍幹細胞は、急性白血病、脳腫瘍、乳癌、膵癌、大腸癌などでは報告されていたが、リンパ腫や肺癌、子宮内膜癌での確たる報告はなかった。さらに、腫瘍幹細胞を特徴づけるマーカーの発現制御に関与する因子についても、ほとんど知られていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、それまで腫瘍幹細胞の報告のある臓器由来の腫瘍以外で、腫瘍幹細胞的な性格をもつものがあるか、また、そのような性格をもつ細胞群があれば、その制御はどのようになっているか、腫瘍幹細胞を特徴づけるマーカーの発現制御はいかに行われているかを検討することを目的とした。

これまで、多くの抗腫瘍療法が開発されているが、完全に腫瘍を駆逐するには到らない療法が大変である。腫瘍の根源的な役割を果たす腫瘍幹細胞を解析し、その制御機構を解明することは、これまでにはなかった抗腫瘍療法の開発につながるものと考えられる。

3. 研究の方法

これまで、肺腺癌細胞株を用いて、核内レセプタータンパク質である NROB1 が、腫瘍幹細胞が濃縮される分画である side population で高発現していること、NROB1 陽性腫瘍細胞は抗癌剤に対する耐性をもつこと、NROB1 陽性腫瘍細胞の多い肺腺癌症例では予後不良であることを明らかにしていた。そこで、NROB1 を制御する因子として、PPAR γ を検討した。PPAR γ と NROB1 の相互作用を免疫沈降法で調べ、更に免疫染色にて、PPAR γ の発現を臨床検体で検討した。

アルデヒド脱水素酵素 (Aldehyde dehydrogenase, ALDH) 活性の高い一群の細胞が腫瘍幹細胞としての性格をもつことが、乳癌を中心に報告されていた。そこで、子宮内膜癌について、ALDH 活性の高い腫瘍細胞を多く含む症例の予後を検討し、さらに細胞株で ALDH 活性の高い分画の抗癌剤に対する耐性、浸潤能を調べた。また、ALDH をコードする遺伝子の発現調節機構を、プロモーター領域に対するルシフェラーゼアッセイで検討し、ALDH 遺伝子の発現を正に制御する転写因子を調べた。また、免疫染色にて、子宮内膜癌を検討し、ALDH 陽性腫瘍細胞と相反する発現パターンを示す因子についても調べた。

リンパ腫は、最も早く腫瘍幹細胞の存在が提唱された急性白血病と同じ血液系の腫

瘍であるにも関わらず、腫瘍幹細胞の存在が明らかにされていない腫瘍群である。そこで、まず最も多い組織型であるびまん性大細胞性リンパ腫について、ALDH 活性のある細胞が存在するか検討した。次に、比較的多い組織型であるホジキンリンパ腫について、腫瘍幹細胞的な性格をもつ細胞が存在するか、腫瘍細胞株を用いて検討した。具体的には、ホジキンリンパ腫細胞株には、大小様々な大きさの腫瘍細胞が含まれるため、限界希釈を行い、どの大きさの細胞が最も増殖力をもつか、また、どのような大きさの細胞を産生するか検討した。さらに、活性酸素除去能力について、ALDH 活性についても検討し、抗癌剤に対する耐性も調べた。また、比較的稀な組織型であるが、リンパ球形質細胞性リンパ腫について、FACS を用いて B リンパ球、形質細胞マーカーをもつ細胞と持たない細胞にわけ、どの細胞が腫瘍幹細胞としての性格を有するかも検討した。

4. 研究成果

肺腺癌細胞株において、NROB1 と PPAR γ は互いに相互作用することが、免疫沈降法により明らかとされた。また、NROB1 は PPAR γ の機能に対して、負に作用していた。実際、臨床検体において、NROB1 のみを高発現する症例と、NROB1 と PPAR γ をともに発現する症例を比較した場合、PPAR γ と NROB1 の両者を有する症例の方の予後が良好であった。この結果は、腫瘍幹細胞マーカーの一つである NROB1 と PPAR γ が相反することより、PPAR γ の作用を増強することで、腫瘍幹細胞が抑制される可能性を示唆する。

子宮内膜癌において、ALDH を免疫染色にて検討すると、一部の腫瘍細胞が陽性像を示した。細胞株では、ALDH 活性の高い一群の細胞があり、FACS にて単離して検討したところ、抗癌剤に対する耐性が高く、運動能も浸潤能も高いことがわかった。ALDH 活性の高い症例では、予後不良であり、リンパ節転移を示す症例が多かった。

ALDH 遺伝子のプロモーター領域の検討より、子宮内膜癌細胞株において、NF- κ B 転写因子が ALDH 転写活性を正に調節していることがわかった。NF- κ B は 3 個のサブユニットで形成されているが、その中でも機能制御ユニットである NF- κ B1 を調べたところ、2 個のアイソフォームがあることがわかった。短いアイソフォームが ALDH 活性の高い細胞では高頻度で発現しており、長いアイソフォームと比較して ALDH 遺伝子の転写活性化能が高かった。NF- κ B1 の alternative splicing により、アイソフォームの比率が変化し、それにより ALDH 遺伝子の発現調節が行われていることが示唆された。

子宮内膜癌において、ALDH 活性の高い領域と相反するパターンで、TGF- β シグナル刺激因子が発現していることがわかった。こ

の結果は、TGF-beta シグナルが子宮内膜癌では ALDH 活性を負に制御していることを示す。そこで、TGF-beta シグナルを伝達する因子である Smad2/3 を免疫染色すると、ALDH 活性の弱い部分で Smad2/3 が活性化していること、逆に ALDH 活性の高い部分では Smad2/3 の活性はほとんど見られないことが明らかとなった。ユビキチンの結合している ALDH を調べることで、TGF-beta シグナルは、ALDH タンパク質の分解を促進していることがわかった。上述のように、子宮内膜癌では転写レベルで ALDH 活性が制御されているが、それ以外にもタンパク質分解レベルでも制御されていることがわかった。

ホジキンリンパ腫は、大型の Reed Sternberg 細胞が存在することが特徴である。しかし、ホジキンリンパ腫細胞株を検討したところ、大型細胞ではなく、小型単核細胞が抗癌剤に対する耐性を持ち、活性酸素を除去する能力も高いことがわかった。これらの細胞では、活性酸素除去に関与する多くの遺伝子群の転写を制御する FoxO3a の発現が高いこともわかった。ホジキンリンパ腫臨床検体で、FoxO3a 陽性細胞は、単核の腫瘍細胞であり、実際の臨床検体で腫瘍幹細胞が描出できる可能性が示唆された。さらに、他のリンパ腫で FoxO3a 陽性腫瘍細胞を検討したが、びまん性大細胞性リンパ腫では、ほとんど FoxO3a 陽性細胞はみられなかった。これは多くのびまん性大細胞性リンパ腫で FoxO3a をコードする遺伝子の領域が欠失されているからで、リンパ腫でもそのサブタイプにより、腫瘍幹細胞のマーカーが異なることが示唆された。

比較的稀な組織型であるが、リンパ球性形質細胞性リンパ腫は、B リンパ球と形質細胞マーカーの両者が陽性となるリンパ腫として知られている。このリンパ腫の細胞株を用いて、B リンパ球マーカーと形質細胞マーカーの発現を調べたところ、全体の約 1 割で、両者のマーカーともに発現しない集団が存在することがわかった。そこで、この集団を FACS により単離し検討したところ、抗癌剤に対する耐性があり、活性酸素除去能も高く、他の B リンパ球マーカー陽性、形質細胞性マーカー陽性の腫瘍細胞を産生することがわかった。このことは、リンパ球性形質細胞性リンパ腫において、B リンパ球のマーカーも形質細胞のマーカーも持たない未熟な腫瘍集団があり、これが腫瘍幹細胞としての性格をもつことを示す。

以上の結果より、様々な腫瘍において、抗癌剤に対して耐性を持ち、放射線療法の実際のエフェクターである活性酸素を除去できる一群の腫瘍細胞が存在し、腫瘍の再発の一因となっていることがわかった。

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 22 件)

Rahadiani N, Ikeda JI, Mamat S, Matsuzaki S, Ueda Y, Umehara R, Tian T, Wang Y, Enomoto T, Kimura T, Aozasa K and Morii E. Expression of aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) in endometrioid adenocarcinoma and its clinical implications. **Cancer Sci**, 102:903-908, 2011 査読有

Zaki MA, Wada N, Kohara M, Ikeda JI, Hori Y, Fujita S, Ogawa H, Sugiyama H, Hino M, Kanakura Y, Morii E and Aozasa K. Presence of B-cell clones in T-cell lymphoma. **Eur J Haematol**, 86:412-419, 2011 査読有

Mabuchi S, Matsumoto Y, Isohashi F, Yoshioka Y, Ohashi H, Morii E, Hamasaki T, Aozasa K, Mutch DG and Kimura T. Pretreatment of leukocytosis is an indicator of poor prognosis in patients with cervical cancer. **Gynecol Oncol**, 122:25-32, 2011 査読有

Zaki MA, Wada N, Ikeda JI, Shibayama H, Hashimoto K, Yamagami T, Tatsumi Y, Tsukaguchi M, Take H, Tsudo M, Morii E and Aozasa K. Prognostic implication of types of tumor-associated macrophages in Hodgkin lymphoma. **Virchows Arch**, 459:361-366, 2011 査読有

Fujita S, Morii E, Rahadiani N, Wada N, Hori Y, Ikeda JI and Aozasa K. Significance of aldehyde dehydrogenase 1 expression in stromal cells of diffuse large B-cell lymphoma. **Exp Therap Med**, 2:591-594, 2011 査読有

Wang Y, Ikeda JI, Rahadiani N, Mamat S, Ueda Y, Tian T, Enomoto T, Kimura T, Aozasa K and Morii E. Prognostic significance of elongator protein 3 (ELP3) expression in endometrioid adenocarcinoma. **Oncol Lett**, 3:25-29, 2012 査読有

Wada N, Zaki MA, Hori Y, Hashimoto K, Tsukaguchi M, Tatsumi Y, Ishikawa J, Tominaga N, Sakoda H, Take H, Tsudo M, Kuwayama M, Morii E and Aozasa K. Tumor-associated macrophages in diffuse large B-cell lymphoma: a study of the Osaka Lymphoma Study Group. **Histopathology**, 60:313-319, 2012 査読有

Ikeda JI, Mamat S, Tian T, Wang Y, Luo W, Rahadiani N, Aozasa K and Morii E. Reactive oxygen species and

aldehyde dehydrogenase activity in Hodgkin lymphoma cells. **Lab Invest**, 92:606-614, 2012 査読有

Mamat S, Ikeda JI, Tian T, Wang Y, Luo W, Aozasa K and Morii E. Transcriptional regulation of aldehyde dehydrogenase 1A1 gene by alternative spliced forms of nuclear factor Y in tumorigenic population of endometrial adenocarcinoma. **Genes Cancer**, 2:979-984, 2011 査読有

Tian T, Ikeda JI, Wang Y, Mamat S, Luo W, Aozasa K and Morii E. Role of leucine-rich pentatricopeptide repeat motif-containing protein (LRPPRC) for anti-apoptosis and tumorigenesis in cancers. **Eur J Cancer**, 48:2462-2473, 2012 査読有

Wada N, Zaki MA, Kohara M, Ogawa H, Sugiyama H, Nomura S, Matsumura I, Hino M, Kanakura Y, Inagaki H, Morii E and Aozasa K. Diffuse large B cell lymphoma with an interfollicular pattern of proliferation shows a favorable prognosis: a study of the Osaka Lymphoma Study Group. **Histopathology**, 60:924-932, 2012 査読有

Qiu Y, Wang ZL, Jin SQ, Pu YF, Toyosawa S, Aozasa K and Morii E. Expression level of pre-B-cell leukemia transcription factor 2 (PBX2) as a prognostic marker for gingival squamous cell carcinoma. **J Zhenjiang Univ Sci B**, 13:168-175, 2012 査読有

Susaki Y, Inoue M, Minami M, Sawabata N, Shintani Y, Nakagiri T, Funaki S, Aozasa K, Okumura M and Morii E. Inhibitory effect of PPARγ on NR0B1 in tumorigenesis of lung adenocarcinoma. **Int J Oncol**, 41:1278-1284, 2012 査読有

Satoh S, Kidoya H, Naito H, Yamamoto M, Takemura N, Nakagawa K, Yoshioka Y, Morii E, Takakura N, Takeuchi O and Akira S. Critical role of Trib1 in differentiation of tissue-resident M2-like macrophages. **Nature**, 495:524-528, 2013

Ikeda JI, Tian T, Wang Y, Hori Y, Honma K, Wada N and Morii E. Expression of FoxO3a in clinical cases of malignant lymphoma. **Pathol Res Pract**, 209:716-720, 2013 査読有

Wang Y, Jiang Y, Tian T, Hori Y, Wada N, Ikeda JI and Morii E. Inhibitory effect of Nodal on the expression of aldehyde dehydrogenase 1 in endometrioid adenocarcinoma of uterus. **Biochem Biophys Res Comm**,

440; 731-736, 2013 査読有

Wada N, Zhan M, Hori Y, Honma K, Ikeda JI and Morii E. Characterization of subpopulation lacking B cell and plasma cell markers in Waldenstrom macroglobulinemia cell line. **Lab Invest**, 94:79-88, 2014 査読有

森井英一; がん幹細胞の動態 **顕微鏡** 46: 84, 2011

森井英一、池田純一郎: 腫瘍幹細胞マーカー **顕微鏡** 46: 85-88, 2011

森井英一: 腫瘍幹細胞の可視化を目指して **クリニシアン** 58: 1393-1398, 2011

21 森井英一: 病理組織における腫瘍幹細胞の可視化を目指して **生産と技術** 64, 85-89, 2012

22 森井英一: 腫瘍における多様な形態 **病理と臨床** 31: 1252-1254, 2013

〔学会発表〕(計9件)

「病理組織における腫瘍幹細胞の可視化を目指して」第32回日本小児病理研究会 2012年9月8日 大阪市総合医療センターさくらホール(大阪)

「腫瘍幹細胞の可視化を目指してーアルデヒド脱水素酵素を中心に」第40回和歌山悪性腫瘍研究会 特別講演 2012年12月15日 和歌山ビッグ愛 大ホール(和歌山)

「がん幹細胞の制御因子ーアルデヒド脱水素酵素の視点より」第102回日本病理学会総会 シンポジウム 2013年6月7日 ロイトン札幌(札幌)

「癌幹細胞に組織から迫ってみる」54回日本組織細胞化学会総会 ワークショップ 2013年9月28日 航空会館(東京)

Invasive ability of cancer initiating cells in endometrioid adenocarcinoma 第72回日本癌学会総会 シンポジウム 2013年10月4日 パシフィコ横浜(横浜)

「腫瘍幹細胞の動態ー病理の立場から」第64回はびきのオンコロジー研究会 2013年10月11日 大阪府呼吸器アレルギー総合医療センター(大阪)

「腫瘍幹細胞の可視化とその問題点」第52回日本臨床細胞学会秋期大会 要望講演 2013年11月2日 大阪国際会議場(大阪)

「アルデヒド脱水素酵素の腫瘍幹細胞における発現調節機構」第52回日本臨床細胞学会秋期大会 ワークショップ 2013年11月2日 大阪国際会議場(大阪)

「医療イノベーションの案内人・病理学－臨床・基礎研究で病理学が担うもの」第5回プラズマフォーラム 特別講演 2013年12月26日 産業総合技術研究所 (東京)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況

特になし

取得状況

特になし

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/molpath/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森井 英一 (MORII Eiichi)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10283772

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし