

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590432

研究課題名(和文)ホジキンリンパ腫の癌幹細胞と分化の分子基盤の解析

研究課題名(英文)Analyses of molecular bases of cancer stem cells and their differentiation in Hodgkin lymphoma

研究代表者

渡邊 真理子(WATANABE, MARIKO)

北里大学・大学病院・研究技能員

研究者番号：90270701

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)：HL細胞株において幹細胞様集団と考えられているside population (SP) とその他の分化した細胞集団であるnon-side population (non-SP)を同定できること確認した。SPは小型の単核細胞からなり、non-SPでは大型の単核細胞やH-RS細胞様の大型細胞を認めた。HLのマーカーであるCD30はSP、non-SPいずれでも強く発現、転写因子NF- κ Bの活性化を伴っていた。マイクロアレイでの解析の結果、SP分画においてはnon-SP分画と比較して、抗酸化ストレスに関わる分子群の活性化を認めた。また多核細胞の形成には頓挫性有糸分裂が関与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We identified side population (SP fraction), which is thought to represent cancer stem cell like population and non-SP fraction, which is thought to represent differentiated cells in Hodgkin lymphoma cell lines, KMH2 and L428. SP consists of small cells, whereas non-SP contains relatively large mono nucleated cells and Hodgkin, Reed-Sternberg (H-RS) cells. CD30, a marker for HL is strongly expressed on both SP and non-SP. Both fractions also revealed strong activation of NF- κ B. We sorted SP and non-SP and examined expression of mRNA using microarray analyses. The results indicated that molecules related to anti-oxidative stress are more frequently expressed in SP than non-SP. We also found that multi-nucleated cells are generated by abortive mitosis.

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：ホジキンリンパ腫 癌幹細胞 ニッチ 細胞分化 分子標的療法

1. 研究開始当初の背景

従来の Hodgkin リンパ腫(HL)研究が HL に特徴的な Hodgkin, Reed-Sternberg(H-RS)細胞により代表される比較的均一な細胞集団とする理解に立脚したものであるのに対し、本研究は近年の癌幹細胞の概念や HL 細胞が H-RS を含んだヘテロな腫瘍集団であることに立脚した新しい視点から、不明である「HL の癌幹細胞と分化の分子基盤」の解明に挑戦する特色をもった研究である。

2. 研究の目的

本研究は「HL 細胞の分化と H-RS 細胞の形成の機序」について HL 細胞を支える微小環境をも含め俯瞰的に明らかにし、得られた知見にもとづき、ニッチにおける HL 幹細胞の維持、そこからの分化と H-RS 細胞の形成という一連の分化のメカニズムを明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

Verapamil 有無の Hoechst 染色性を FACS により解析することで side population(SP) という分画に癌幹細胞分画が濃縮されることが報告され、癌幹細胞集団の同定の一つの方法として広く用いられている。予備実験により HL 細胞株 KMH2 および L428 において SP とその他の細胞集団である non-side population (non-SP) を同定することにすでに成功している。FACS Ariaにてソーティングしサイトスピン後、ギムザ染色を行い KMH2 および L428 について SP と non-SP の細胞の形態を解析する。さらに SP 分画から non-SP 分画を含むオリジナルの細胞集団の再構成を確認する

予備実験では KMH2 および L428 とも SP 分画は約 0.5%程度含まれることが明らかとなっているため、 1×10^8 個の細胞をそれぞれについて FACS Aria を使い、 1×10^5 個の SP 分画と non-SP 分画をソーティングにより得る。得られた細胞はサイトスピン後、ギムザ染色を行い両者の細胞の形態を確認する。統計的解析とデータの再現性の確認のために KMH2 および L428 の SP 分画と non-SP 分画のソーティングは各細胞につき 3 回、計 12 個のサンプルを準備する。SP 分画と non-SP 分画の細胞は RNAzol B にて処理、Agilent マイクロアレイ用のプロトコールに従いラベリングを行う。

FACS Aria を使い、 1×10^5 個の SP 分画と non-SP 分画をソーティングにより得る。解析は ProQ および SYPRO によるリン酸化状態の変化、蛋白質発現量の変化の検討により行

う。HL 細胞株 KMH2 および L428 を用いる。タンパク質の発現量、あるいはリン酸化の変化を指標にして解析をすすめ、リン酸化状態の変化、蛋白質発現量の変化の検討により行う。

SP と non-SP のマイクロアレイの結果により、発現あるいはリン酸化状態が両者間で有意に差がありかつ KMH2 および L428 に共通である分子群を抽出する。この中からより重要と考えられる分子を選び、KMH2 および L428 から抽出した mRNA を用いてリアルタイム PCR あるいはウエスタンブロットを施行して validation を行う。

4. 研究成果

HL 細胞株 KMH2 および L428 において幹細胞様集団と考えられている side population (SP 分画) とその他の分化した細胞集団である non-side population (non-SP 分画) を同定できること確認した (図 1、Cancer Sci. 101(11):2490-6. 2011.)。

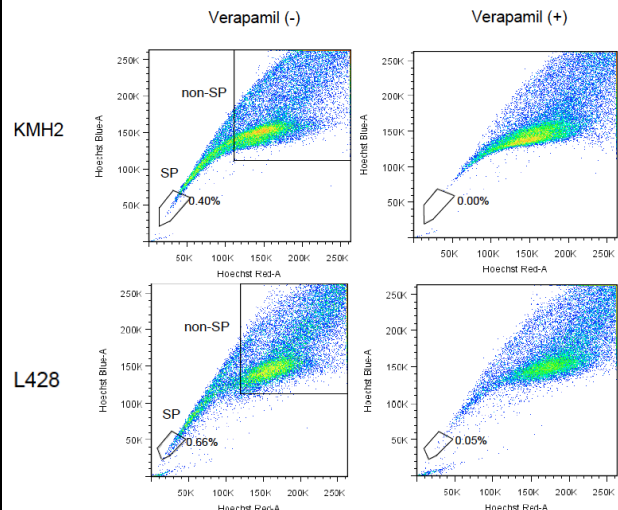


図 1 SP 分画と non-SP 分画の同定

SP は小型の単核細胞からなり、non-SP では大型の単核細胞や H-RS 細胞用の大型細胞を認めた (図 Cancer Sci. 101(11):2490-6. 2011.)。

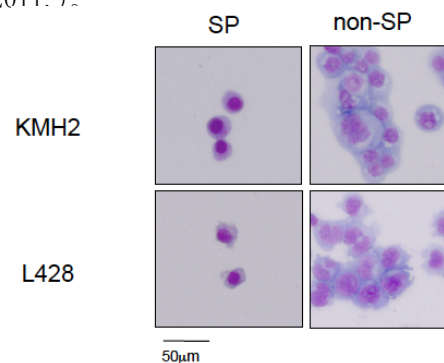


図 2 SP 細胞と non-SP 細胞の形態

HL のマーカーである CD30 は SP、non-SP いずれにおいても強く発現、転写因子 NF- κ B の活性化を伴っていた (図 3、Cancer Sci. 101(11):2490-6. 2011.)。

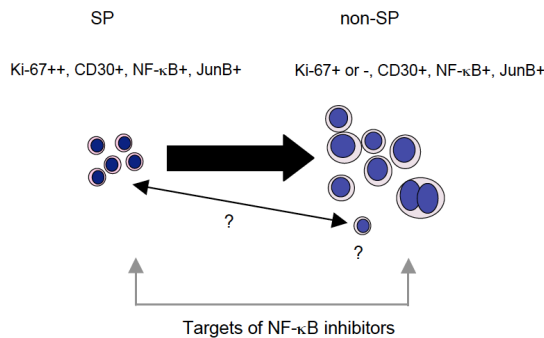


図 3 HL 細胞の分化と分子生物学的特徴

この系を用いて HL 細胞株の SP 分画と non-SP 分画をそれぞれソーティングし、それぞれの分画における mRNA 発現をマイクロアレイの系で解析を行った。その結果 SP 分画においては non-SP 分画と比較して、抗酸化ストレスに関わる分子群の活性化を認めた。

抗酸化ストレスに関わる分子群と HL 細胞の分化制御との関係を示唆する結果を得た。また多核細胞の形成には頓挫性有糸分裂 (abortive mitosis) が関与していると考えられた。HL 細胞のニッチの存在は抗酸化ストレスに関わる分子群の免疫染色による検討で示唆されたが、同定まではいたらなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 16 件)

- ① 堀江良一. ホジキンリンパ腫と未分化大細胞型リンパ腫における CD30 過剰発現機構 血液内科 査読無 2014 印刷中
- ② Watanabe M, Umezawa K, Higashihara M, Horie R. Combined inhibition of NF- κ B and Bcl-2 triggers synergistic reduction of viability and induces apoptosis in melanoma cells. *Oncol Res.* 査読有 2014;21(4):173-80. doi: 10.3727/096504014X13887748696707
- ③ Togano T, Watanabe M, Itoh K, Umezawa K, Masuda N, Higashihara M, Horie R. Activation of Akt involves resistance to NF- κ B inhibition and abrogation of both triggers synergistic apoptosis in lung adenocarcinoma cells. *Lung Cancer.* 査読有 83: 139-145. 2014 doi: 10.1016/j.lungcan.2013.10.018.
- ④ 堀江良一. Hodgkin リンパ腫の発症・維持に

おける炎症の役割 査読無 血液内科 67: 460-466. 2013

<http://www.kahyo.com/item/KS201310-674>

- ⑤ Horie R. Molecularly-targeted strategy and NF- κ B in lymphoid malignancies. *J Clin Exp Hematop.* 査読有 53(3):185-95. 2013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24369220>
- ⑥ Horie R. Current Molecular Targets of Lymphomas. *Forum Immun Dis Ther.* 査読無 4(1): 11-23. 2013. doi: 10.1615/ForumImmunDisTher.2013008322
- ⑦ Suzuki Y, Yoshida T, Wang G, Aoki T, Katayama T, Miyamoto S, Miyazaki K, Iwabuchi K, Danbara M, Nakayama M, Horie R, Nakamine H, Sato Y, Nakamura N, Niitsu N. Incidence and Clinical Significance of Aberrant T-Cell Marker Expression on Diffuse Large B-Cell Lymphoma Cells. *Acta Haematol.* 査読有 130: 230-237. 2013. doi: 10.1159/000348550.
- ⑧ Togano T, Nakashima M, Watanabe M, Umezawa K, Watanabe T, Higashihara M, Horie R. Synergistic effect of 5-azacytidine and NF- κ B inhibitor DHMEQ on apoptosis induction in myeloid leukemia cells. *Oncol Res.* 査読有 20(12):571-7. 2012 doi: 10.3727/096504013X13775486749371.
- ⑨ Aoki T, Miyazaki K, Katayama T, Watanabe M, Horie R, Danbara M, Higashihara M. Surface CD3 expression proceeds through both myosin regulatory light chain 9 (MYL9)-dependent and MYL9-independent pathways in Jurkat cells. *J Smooth Muscle Res.* 査読有 48(5-6):137-47. 2012 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23538510>
- ⑩ Takeiri M, Horie K, Takahashi D, Watanabe M, Horie R, Simizu S, Umezawa K. Involvement of DNA binding domain in the cellular stability and importin affinity of NF- κ B component RelB. *Org Biomol Chem.* 査読有 10(15):3053-9. 2012 doi: 10.1039/c2ob07104e.
- ⑪ Watanabe M, Nakano K, Togano T, Nakashima M, Higashihara M, Kadin M.E., Watanabe T, Horie R. Targeted Repression of Overexpressed CD30 Downregulates NF- κ B and ERK1/2 Pathway in Hodgkin Lymphoma Cell Lines. *Oncol Res.* 査読有 19(10-11):463-9. 2012 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22715589>

- ⑫ Suzuki Y, Yoshida T, Wang G, Togano T, Miyamoto S, Miyazaki K, Iwabuchi K, Nakayama M, Horie R, Niitsu N, Sato Y, Nakamura N. Association of CD20 levels with clinicopathological parameters and its prognostic significance for patients with DLBCL. *Ann Hematol*. 査読有 91(7):997-1005. 2012
doi: 10.1007/s00277-012-1407-4.
- ⑬ Watanabe M, Itoh K, Togano T, Kadin ME, Watanabe T, Higashihara M, Horie R. Ets-1 activates overexpression of JunB and CD30 in Hodgkin's lymphoma and anaplastic large-cell lymphoma. *Am J Pathol*. 査読有 180(2):831-8. 2012 doi: 10.1016/j.ajpath.2011.10.007.
- ⑭ Suzuki Y, Shichishima T, Yamashiro Y, Kimura H, Ishii R, Miyazaki K, Horie R, Moriya T, Hattori Y. A patient with acute lymphoblastic leukaemia presenting with an extremely high level (21.0%) of HbA(1c). *Ann Clin Biochem*. 査読有 48(Pt 5):474-7. 2011. doi: 10.1258/acb.2011.010121.
- ⑮ Watanabe M, Shibuya A, Tsunoda Y, Danbara M, Ishii R, Ohsaka M, Takada J, Tanaka Y, Okuwaki Y, Minamino T, Hidaka H, Nakazawa T, Horie R, Higashihara M, Koizumi W. Re-appearance of hepatitis B virus following therapy with rituximab for lymphoma is not rare in Japanese patients with past hepatitis B virus infection. *Liver Int*. 査読有 31(3):340-7. 2011. doi:10.1111/j.1478-3231.2010.02417.x.
- ⑯ Nakashima M, Ishii Y, Watanabe M, Togano T, Umezawa K, Higashihara M, Watanabe T, Horie R. The side population, as a precursor of Hodgkin and Reed-Sternberg cells and a target for nuclear factor- κ B inhibitors in Hodgkin's lymphoma. *Cancer Sci*. 査読有 101(11):2490-6. 2011. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01693.x.

[学会発表] (計 8 件)

- ① 堀江良一、渡邊真理子、伊藤金次、梅野富輝、KADIN Marshall E、渡邊俊樹、東原正明: Hodgkin リンパ腫と未分化大細胞型リンパ腫における CD30 過剰発現機構の解析. 第 53 回日本リンパ網内系学会総会 2013. 5. 17-18 京都
- ② 堀江良一、渡邊真理子、中野和民、梅野富輝、Marshall E. Kadin、渡邊俊樹、東原

正明 : CD30 repression triggers global gene responses and anti-proliferative effects in Hodgkin lymphoma. 第 75 回日本血液学会学術集会、2013. 10. 12 札幌

- ③ 山川奈津子、横山和明、Jun Lu、今留謙一、渡邊俊樹、堀江良一、穂積勝人、八幡崇、安藤潔、中村直哉、幸谷愛 : The regulation of 'inflammatory niche' with tumor derived small RNAs. 第 75 回日本血液学会学術集会、2013. 10. 11 札幌
- ④ 堀江良一、渡邊真理子、伊藤金次、梅野富輝、Kdin E Marshall、渡邊俊樹、東原正明: Hodgkin リンパ腫と未分化大細胞性リンパ腫における CD30 過剰発現機構の解析. 第 74 回日本血液学会学術集会 2012. 10. 21 京都
- ⑤ Ai Kotani, Jen Lu, Toshiki Watanabe, Ryoichi Horie, Kiyoshi Ando, Naoya Nakamura. The function of small RNAs conjugated in exosome in inflammatory niche of EBV positive lymphoma. 第 74 回日本血液学会学術集会 2012. 10. 20 京都
- ⑥ 堀江良一、中島誠、渡邊真理子、梅野富輝、梅澤一夫、渡邊俊樹、東原正明 : Hodgkin リンパ腫の前駆細胞における分子基盤の解析と分子標的療法の基礎的検討. 第 73 回日本血液学会学術集会、2011. 10. 15 名古屋
- ⑦ 堀江良一、中島誠、石井有実子、渡邊真理子、梅野富輝、渡邊俊樹、梅澤一夫、東原正明: Side population は Hodgkin, Reed - Sternberg 細胞の前駆細胞集団で NF - κ B 阻害薬 DHMEQ の標的となる. 第 51 回日本リンパ網内系学会総会 2011. 7. 1-2 福岡
- ⑧ 井上優希、中村直哉、阿部幸一郎、豊嶋孝恵、堀江良一、渡邊俊樹、安藤潔、幸谷愛 : EBV 陽性リンパ腫微小環境における分泌性 EBV コード miRNA. 第 73 回日本血液学会学術集会、2011. 10. 15 名古屋

[図書] (計 2 件)

- ① 堀江良一 他. 羊土社 実験医学増刊 Vol. 30 No. 5 2012 224(212-218)
- ② 堀江良一 他. 文光社 病理と臨床 Vol. 29 2011 年臨時増刊号 2011 545 (138-141)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 真理子 (WATANABE MARIKO)
北里大学病院・研究技能員
研究者番号 : 90270701

(2) 研究分担者

堀江 良一 (HORIE RYOUICHI)

北里大学・医学部・准教授
研究者番号：80229228