

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月14日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790397

研究課題名（和文） 腫瘍幹細胞を規定する因子に基づく悪性リンパ腫の解析

研究課題名（英文） Characterization of malignant lymphoma based on factors that define cancer initiating cells

研究代表者

池田 純一郎 (IKEDA JUNICHIRO)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：20379176

研究成果の概要（和文）：悪性リンパ腫における腫瘍幹細胞としての役割をもつ細胞を同定するために、ホジキンリンパ腫の細胞株について、種々の腫瘍で腫瘍幹細胞を多く含むとされている、アルデヒド脱水素酵素(ALDH)活性や活性酸素(ROS)除去能について検討した。高いROS除去能をもつ小型単核細胞群においては、ALDH活性も高く、高いin vitro colony形成能、造腫瘍能を示すことが明らかとなり、またROS除去には転写因子であるFoxO3aが関与していることを示した。以上よりこれらの細胞がホジキンリンパ腫の腫瘍形成において腫瘍幹細胞としての役割を担っている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To identify cancer initiating cells (CICs) in malignant lymphoma, aldehyde dehydrogenase (ALDH) activities and degradation capability of reactive oxygen species (ROS), which have been reported to contain many CICs in several cancers, was examined in Hodgkin lymphoma cell lines. ROS-low and ALDH-high single-nucleated small sized cells formed colonies and tumors more efficiently than ROS-high and ALDH-low cells, respectively. The expression of FoxO3a, a transcription factor regulating ROS-degrading enzymes, was higher in both ROS-low and ALDH-high populations than in ROS-high and ALDH-low populations. These findings suggest that such cells might play an important role in tumorigenesis of Hodgkin lymphoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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によって、悪性腫瘍は治癒す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

近年、腫瘍には腫瘍幹細胞という自己複製能を有する少数の集団があり、再発や転移の原因となることが明らかとされてきている。白血病をはじめとしたいくつかの腫瘍において腫瘍幹細胞の存在が証明されてきているが、悪性リンパ腫において腫瘍幹細胞の存在

は明らかではない。そこで、悪性リンパ腫において臨床検体および種々の悪性リンパ腫細胞株の中から腫瘍幹細胞を多く含む画分を単離し、それを NOD/SCID マウスへ移植することで腫瘍幹細胞を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 悪性リンパ腫細胞株を用いて、FACS にて腫瘍幹細胞を多く含む画分を単離する。同時に腫瘍幹細胞は存在しないと考えられている画分もコントロールとして単離する。具体的には、腫瘍細胞株を用いて腫瘍幹細胞マーカーの候補として報告されている活性酸素 (ROS) 除去能やアルデヒド脱水素酵素 (ALDH) 活性などについて DCF-DA 蛍光試薬あるいは ALDEFLUOR で染色を行い、発現レベルの高い画分、低い画分を単離する。

(2) 単離された細胞が腫瘍幹細胞であるか検討する。ROS-low あるいは ALDH-high 画分が幹細胞を多く含むということがいくつかの腫瘍で報告されているが、腫瘍は由来する臓器ごとに多様性があるため、これまでの報告と異なる結果がでる可能性は否定できない。そこで、単離した細胞の腫瘍形成能を検討するため、NOD/SCID マウスに移植する。同時に *in vitro* コロニー形成能も検討する。また、単離した細胞を培養し、再び ROS-low と high あるいは ALDH-high と low 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を検討する。さらに形成された腫瘍及びコロニーの性状を解析し、自己複製能と分化能をもつか調べる。

(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、ROS-low 画分と high 画分あるいは ALDH-high 画分と low 画分で発現に差のある遺伝子を検索する。

(4) ROS-low 画分あるいは ALDH-high 画分に特異的に発現する蛋白を指標に、再び腫瘍細胞株を FACS でソートして単離する。ソートされた細胞が ROS-low 画分や ALDH-high 画分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 ROS-low 画分と high 画分および ALDH-high 画分と low 画分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。

4. 研究成果

(1) 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。まず、腫瘍幹細胞が多く含まれていると考えられる ROS 除去能の高い細胞や ALDH 活性の高い細胞をソートし、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悪性リンパ腫の一組織型であるホジキンリンパ腫の細胞株について、ALDH 活性や ROS 除去能について検討した。これまでにホジキンリンパ腫細胞において、小型単核細胞が大型多核細胞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ているが、小型単核細胞群は大型多核細胞群と比較して高い ROS 除去能を示すほか、高い ROS 除去能を示す細胞群では、低い群と比較して *in vitro* colony 形成能が高く、高い造腫瘍能を示すこと、また、ROS 除去には転写因子である FoxO3a が関与していることを示した。

②高い ROS 除去能をもつ細胞群では ALDH 活性も高いことがわかり、ALDH 活性が高い細胞群は低い細胞群と比較して高い *in vitro* colony 形成能、造腫瘍能を示すことが明らかとなった (図)。

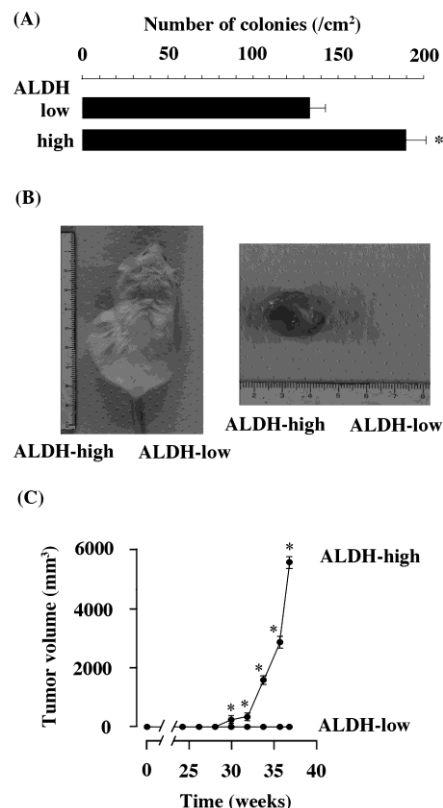


図 ALDH 活性の違いにおける *in vitro* colony 形成能 (A) および造腫瘍能 (B, C)

以上から、ホジキンリンパ腫の腫瘍形成において ROS 除去能力が高く、ALDH 活性の高い一群の小型単核細胞が腫瘍幹細胞としての役割を担っている可能性を示した。これらのことより、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の細胞が存在することが示唆された。

(2) ROS 除去に関与している転写因子である FoxO3a の発現について悪性リンパ腫の臨床検体を用いて病理組織学的に検討を行った。

①ホジキンリンパ腫症例では非ホジキンリンパ腫症例に比べて、腫瘍細胞における FoxO3a の発現が高頻度にみられることがわかり、ホジキンリンパ腫において腫瘍幹細胞の維持に寄与している可能性が示唆された。

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 7 件)

- ① 池田純一郎 (他 7 名, 1 番目) Reactive oxygen species and aldehyde dehydrogenase activity in Hodgkin lymphoma cells. *Lab Invest*, 2012;92:606-614, 査読有
- ② 田田, 池田純一郎 (他 5 名, 2 番目) Role of leucine-rich pentatricopeptide repeat motif-containing protein (LRPPRC) for anti-apoptosis and tumorigenesis in cancers. *Eur J Cancer*, 2012;48:2462-2473, 査読有
- ③ 小根山千歳, 池田純一郎 (他 9 名, 5 番目) MicroRNA-mediated upregulation of integrin-linked kinase promotes Src-induced tumor progression. *Oncogene*, 2012;31:1623-1635, 査読有
- ④ 王怡, 池田純一郎 (他 8 名, 2 番目) Prognostic significance of elongator protein 3 expression in endometrioid adenocarcinoma. *Oncol Lett*, 2012;3:25-29, 査読有
- ⑤ ママト=スハナ, 池田純一郎 (他 5 名, 2 番目) Transcriptional regulation of aldehyde dehydrogenase 1A1 gene by alternative spliced forms of nuclear factor Y in tumorigenic population of endometrial adenocarcinoma. *Genes and Cancer*, 2011;2:979-984, 査読有
- ⑥ 藤田茂樹, 池田純一郎 (他 5 名, 6 番目) Significance of aldehyde dehydrogenase 1 expression in stromal cells of diffuse large B-cell lymphoma.

Exp Therapeut Med, 2011;2:591-594, 査読有

- ⑦ 千原剛, 池田純一郎 (他 11 名, 3 番目) Frequency of intravascular large B-cell lymphoma in Japan: Study of the Osaka Lymphoma Study Group. *J Hematol Oncol*, 2011;4:14, 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① 池田純一郎 悪性リンパ腫を中心としたヒト腫瘍における腫瘍幹細胞の探索 第 58 回日本病理学会秋期特別総会 2012 年 11 月 23 日 ウィンクあいち
- ② 前野悦子, 吉村英雄, 堀由美子, 和田直樹, 池田純一郎, 森井英一 尿材料における集細胞法の検討 —遠心すり合わせ法, フィルター法, TACAS 法の比較— 第 51 回日本臨床細胞学会秋期大会 2012 年 11 月 9 日 朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター
- ③ 二瓶恵, 吉村英雄, 堀由美子, 和田直樹, 池田純一郎, 森井英一 気管支擦過細胞診標本における良性異型細胞と腺癌細胞との鑑別 第 51 回日本臨床細胞学会秋期大会 2012 年 11 月 9 日 朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター
- ④ Nozomi Yamairi, Go Eguchi, Shinya Rai, Tamotsu Yamagami, Takayuki Iwanaga, Naoki Wada, Junichiro Ikeda, Katsuyuki Aozasa, Itaru Matsumura, Mitsuhiro Matsuda Richter syndrome with a long-term survival treated with auto-SCT and Rituximab maintenance therapy 第 74 回日本血液学会学術集会 2012 年 10 月 19 日 国立京都国際会館
- ⑤ 小根山千歳, 鬼頭頼子, 浅井麗伊, 角元恭子, 奥崎大介, 池田純一郎, 森井英一, 岡田雅人 Src がん形質発現における microRNA を介した mTORC2 制御 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 20 日 ロイトン札幌, さっぽろ芸文館, 札幌市教育文化会館
- ⑥ 浅井麗伊, 奥崎大介, 池田純一郎, 森井英一, 岡田雅人, 小根山千歳 マイクロ RNA は ARFGEF1 を標的とすることで, Src によるがん悪性化を制御する 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 20 日 ロイトン札幌, さっぽろ芸文館, 札幌市教育文化会館
- ⑦ 池田純一郎, 森井英一 シンポジウム 3 「癌幹細胞: 造血腫瘍」ホジキンリンパ腫における小型腫瘍細胞と造腫瘍能 第 22 回日本サイトメトリー学会学術集会 2012 年 6 月 29 日 千里ライフサイエンスセンター
- ⑧ 前野悦子, 吉村英雄, 堀由美子, 池田純一郎, 和田直樹, 森井英一 膝腫瘍性病

変に対する超音波内視鏡下穿刺吸引細胞
診における判定困難症例の検討 第 53
回日本臨床細胞学会総会 2012 年 6 月 2
日 幕張メッセ国際会議場

- ⑨ 池田純一郎, 森井英一, 青笹克之 ホジ
キンリンパ腫の造腫瘍能における活性酸
素およびアルデヒド脱水素酵素の意義
第 101 回日本病理学会総会 2012 年 4 月
28 日 京王プラザホテル
- ⑩ 池田純一郎, 森井英一, 青笹克之 活性酸
素およびアルデヒド脱水素酵素の観点か
らみたホジキンリンパ腫の造腫瘍能の性
格付け 第 70 回日本癌学会学術総会
2011 年 10 月 3 日 名古屋国際会議場
- ⑪ 池田純一郎, 森井英一, 青笹克之 ホジ
キンリンパ腫の腫瘍形成における活性酸
素およびアルデヒド脱水素酵素の役割
第 100 回日本病理学会総会 2011 年 4 月
29 日 パシフィコ横浜

[図書] (計 1 件)

- ① 池田純一郎, 中山書店, 癌診療指針のた
めの病理診断プラクティス 脳腫瘍,
pp259-265, pp325-326, 2012

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・准教授
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 :