

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460435

研究課題名(和文) 腫瘍幹細胞の観点からみた新たな悪性リンパ腫の層別化

研究課題名(英文) New stratification of malignant lymphoma from the point of view of the 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(研究院)・准教授

研究者番号：20379176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ホジキンリンパ腫における腫瘍幹細胞的性格をもつ細胞は、活性酸素除去酵素を制御する転写因子FoxO3aの発現が高く、種々の悪性リンパ腫症例における検討ではFoxO3aの発現はホジキンリンパ腫・結節硬化型に多くみられ、inhibitor of DNA binding (ID) protein 1の発現と逆相関があり、それはEpstein-Barr virus(EBV)がコードするlatent membrane protein 1を介して制御されている可能性を示した。以上の結果から、EBV感染を介したFoxO3aとID1の関係がホジキンリンパ腫の腫瘍形成に重要な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)：Cells with cancer initiating cell character in Hodgkin lymphoma have a high expression of the transcription factor FoxO3a which regulate enzymes to degrade reactive oxygen species. We examined the expression of FoxO3a in malignant lymphoma cases. FoxO3a expression was often observed in nodular sclerosis classical Hodgkin lymphoma, and FoxO3a expression was inversely correlated with the inhibitor of DNA binding (ID) protein 1 expression. The expression of FoxO3a and ID1 could be regulated by Epstein-Barr virus (EBV)-encoded latent membrane protein 1. These results suggested that the relationship between FoxO3a and ID1 through EBV infection might play an important role in tumorigenesis of Hodgkin lymphoma.

研究分野：医歯薬学

キーワード：癌 悪性リンパ腫 腫瘍幹細胞 病理学 アルデヒド脱水素酵素 活性酸素 FoxO3a ID1

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍は、早期発見や治療法の開発などによって治癒しう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

腫瘍には腫瘍幹細胞という自己複製能、多分化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、悪性リンパ腫における腫瘍幹細胞の存在はまだ明らかではない。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 FACS にて腫瘍幹細胞を多く含むと考えられる画分を単離する。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 法を用いて染色を行い、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得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。また、マイクロアレイと並行してタンパク質の精製により質量分析を行い、タンパク質レベルでの発現の差も調

べる。

(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し、予後との関係や組織学的な存在部位を確認する。

4. 研究成果

これまでに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おいて、Hodgkin 細胞類似の小型単核細胞群は同様の小型単核細胞を生み出すとともに Reed-Sternberg 細胞類似の大型多核細胞群を生み出すことを示し、小型単核細胞は腫瘍幹細胞のマーカーとして知られている ALDH 活性が高いこと、また ROS 除去能力が高く、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。これらの結果を用いて以下の検討を行った。

(1) ホジキンリンパ腫におけるマイクロアレイを用いた小型単核細胞と大型多核細胞の遺伝子発現の差の検討

腫瘍幹細胞の性質を持つ小型単核細胞に比べ大型多核細胞で胎盤に発現するタンパク質である pregnancy specific glycoprotein 1 (PSG1) の発現が有意に高く、インスリンを加えることによって非腫瘍幹細胞と考えられる大型多核細胞の割合を増加させると PSG1 の発現が高くなることがわかり、腫瘍幹細胞の制御に関与している可能性が示唆された。

(2) 臨床検体における ROS 除去能を制御する転写因子 FoxO3a の発現とそのメカニズムの検討

種々の悪性リンパ腫症例における FoxO3a の発現を検討した。腫瘍細胞に FoxO3a の発現がみられる組織型はホジキンリンパ腫、特に結節硬化型に多く、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫をはじめとした B 細胞リンパ腫や T/NK 細胞リンパ腫ではほとんどみられなかった。

腫瘍幹細胞の制御に関与していることが報告されている inhibitor of DNA binding (ID) protein の発現が小型単核

細胞に比べ大型多核細胞において高いことに注目し, FoxO3a との関係についてホジキンリンパ腫症例を用いて検討した。その結果, 腫瘍細胞に FoxO3a の発現がみられる症例では ID1 の発現が有意に低く, FoxO3a の発現がみられない症例では ID1 の発現が高いという逆相関が認められた。さらに Epstein-Barr virus (EBV)陽性の腫瘍細胞が, そのコードする latent membrane protein 1 (LMP1) を介して FoxO3a をリン酸化することによってその発現を抑制し, それによって ID1 の発現を誘導するメカニズムが働いている可能性を示した。

以上の結果から, 腫瘍幹細胞のマーカーの候補と考えられる FoxO3a と ID1 の相互関係がホジキンリンパ腫における腫瘍形成に重要な役割を担っている可能性があり, EBV 感染の有無がそれを左右す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 17 件)

- (1) 池田純一郎 (他 6 名, 1 番目) ID1 upregulation and FoxO3a downregulation by Epstein-Barr virus-encoded LMP1 in Hodgkin lymphoma. *Molecular and Clinical Oncology*, in press, 査読有
- (2) 宮本健司, 池田純一郎 (他 13 名, 8 番目) Blood Cell Coagulation Induced by Low-temperature Plasma Treatment. *Arch Biochem Biophys*, in press, 査読有
doi: 10.1016/j.abb.2016.03.023.
- (3) 和田直樹, 池田純一郎 (他 6 名, 2 番目) Requirement of CXCL12-CXCR7 signaling for CD20- CD138- double negative population in lymphoplasmacytic lymphoma. *Lab Invest*, 2016;96:517-525, 査読有
doi: 10.1038/labinvest.2016.28.
- (4) 池原早苗, 池田純一郎 (他 9 名, 7 番目) Plasma blood coagulation without involving the activation of platelets and coagulation factors. *Plasma Process Polym*, 2015;12:1348-1353, 査読有
DOI: 10.1002/ppap.201500132
- (5) 池田純一郎 (他 5 名, 1 番目) Anti-cancer effects of nonequilibrium atmospheric pressure plasma on cancer-initiating cells in human endometrioid adenocarcinoma cells. *Plasma Process Polym*, 2015;12:1370-1376, 査読有
DOI: 10.1002/ppap.201500097
- (6) 城光寺龍, 池田純一郎 (他 2 名, 2 番目) Epithelioid Rhabdomyosarcoma; A case report with immunohistochemical and molecular study. *Diagn Pathol*, 2015;10:124, 査読有
doi: 10.1186/s13000-015-0349-2.
- (7) 戦茂生, 池田純一郎 (他 8 名, 2 番目) Prognostic significance of a component of Hippo pathway, TAZ, in human endometrioid adenocarcinoma of uterus. *Oncol Lett*, in press, 査読有
- (8) 松井崇浩, 池田純一郎 (他 8 名, 8 番目) Poorly differentiated hepatocellular carcinoma accompanied by anti-Hu antibody-positive paraneoplastic peripheral neuropathy. *Pathol Int*, 2015;65:388-392, 査読有
doi: 10.1111/pin.12304.
- (9) 角元恭子, 池田純一郎 (他 3 名, 2 番目) mLST8 promotes mTOR-mediated tumor progression. *PLoS ONE*, 2015;10:e0119015, 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0119015.
- (10) 西林章光, 池田純一郎 (他 3 名, 4 番目) Ronchogenic cyst in the chin region. *J Dermatol*, 2015;42:544-545, 査読有
doi: 10.1111/1346-8138.12816.
- (11) 池田純一郎 Effect of non-equilibrium atmospheric pressure plasma on cancer initiating cells. *Plasma Medicine*, 2014;4:49-56, 査読有
DOI: 10.1615/PlasmaMed.2014011935.
- (12) 王怡, 池田純一郎 (他 5 名, 3 番目) Roles of histamine on the expression of aldehyde dehydrogenase 1 in endometrioid adenocarcinoma cell line. *Cancer Medicine*, 2014;3:1126-1135, 査読有
doi: 10.1002/cam4.296.
- (13) 小根山千歳, 池田純一郎 (他 10 名, 4 番目) MiR-424/503-mediated Rictor upregulation promotes tumor progression. *PLoS ONE*, 2013;8:e80300, 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0080300.
- (14) 和田直樹, 池田純一郎 (他 4 名, 5 番目) Characterization of subpopulation lacking both B-cell and plasma cell markers in Waldenstrom macroglobulinemia cell line. *Lab Invest*, 2014;94:79-88, 査読有
- (15) 王怡, 池田純一郎 (他 5 名, 6 番目) Inhibitory effect of Nodal on the expression of aldehyde dehydrogenase 1 in endometrioid adenocarcinoma of uterus. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013;440:731-736, 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2013.09.139.
- (16) 池田純一郎 (他 6 名, 1 番目) Expression

of FoxO3a in clinical cases of malignant lymphoma. *Pathol Res Pract*, 2013;209:716-720, 査読有
doi: 10.1016/j.prp.2013.08.003.

- (17) 池田純一郎, 森井英一 ホジキンリンパ腫における小型腫瘍細胞と造腫瘍能. *Cytometry Research* 2013;23:11-14.

〔学会発表〕(計 28 件)

- (1) 池田純一郎 (他 4 名, 1 番目) 悪性リンパ腫における未分化状態を維持する因子の検討 第 104 回日本病理学会総会 2015 年 4 月 30 日 名古屋国際会議場
- (2) 和田直樹, 池田純一郎 (他 6 名, 7 番目) リンパ形質細胞リンパ腫における CD20 陰性 CD138 陰性細胞群 第 104 回日本病理学会総会 2015 年 4 月 30 日 名古屋国際会議場
- (3) 松井崇浩, 池田純一郎 (他 3 名, 4 番目) 抗 Hu 抗体陽性腫瘍随伴性末梢神経障害を伴った低分化型肝細胞癌の一例 第 104 回日本病理学会総会 2015 年 4 月 30 日 名古屋国際会議場
- (4) 堀由美子, 池田純一郎 (他 7 名, 7 番目) 背景の子宮壁内にリンパ脈管筋腫症と伴ったポリープ状の PEComa の一例 第 104 回日本病理学会総会 2015 年 4 月 30 日 名古屋国際会議場
- (5) 城光寺龍, 池田純一郎 (他 2 名, 3 番目) Epithelioid Rhabdomyosarcoma の 1 例 第 104 回日本病理学会総会 2015 年 5 月 1 日 名古屋国際会議場
- (6) 城光寺龍, 池田純一郎 (他 4 名, 5 番目) 鼻腔腫瘍の 1 例 第 70 回日本病理学会近畿支部学術集会 2015 年 9 月 26 日 関西医科大学 (大阪)
- (7) 長友忠相, 池田純一郎 (他 8 名, 8 番目) 肺腺癌の EGFR 遺伝子変異の有無と細胞所見 第 56 回日本臨床細胞学会総会 (春期大会) 平成 27 年 6 月 14 日 くにびきメッセ・松江テルサ
- (8) 松崎聖子, 池田純一郎 (他 8 名, 7 番目) 子宮体癌の細胞診における漿液性腺癌の特徴と臨床所見の検討 第 56 回日本臨床細胞学会総会 (春期大会) 平成 27 年 6 月 14 日 くにびきメッセ・松江テルサ
- (9) 池田純一郎 プラズマ培養液 (PAM) を用いた抗腫瘍効果と腫瘍幹細胞への影響 新学術領域研究「プラズマ医療科学の創成」+「統合的神経機能の制御を標的とした糖鎖の作動原理解明」合同公開シンポジウム 新学術の最前線～プラズマと生物と医療の協奏曲～ 2015 年 8 月 5 日 名古屋大学野依記念学術交流館 2 階講義室
- (10) 池田純一郎 大気圧プラズマを用いたがん幹細胞の制御ーがん治療への応用に向けてー 日本学術振興会 153 委員会 プラズマ材料科学スクール「プラズマ医療の基礎と応用」 2016 年 2 月 8 日 弘済会館 (東京)
- (11) 池田純一郎 (他 2 名, 1 番目) 子宮類内膜腺癌細胞株のアルデヒド脱水素酵素活性におけるヒスタミンの役割 第 103 回日本病理学会総会 2014 年 4 月 26 日 広島国際会議場, ANA クラウンプラザホテル広島
- (12) 和田直樹, 池田純一郎 (他 4 名, 5 番目) ワルデンストローム・マクログロブリン血症 (WM) における CD20 (-) CD138 (-) 細胞の意義 第 103 回日本病理学会総会 2014 年 4 月 26 日 広島国際会議場, ANA クラウンプラザホテル広島
- (13) 堀由美子, 池田純一郎 (他 5 名, 6 番目) 血管新生因子 AGGF1 の種々の血管病変における発現 第 103 回日本病理学会総会 2014 年 4 月 26 日 広島国際会議場, ANA クラウンプラザホテル広島
- (14) 辻洋美, 池田純一郎 (他 4 名, 5 番目) 子宮体部原発神経内分泌癌の 1 例 第 103 回日本病理学会総会 2014 年 4 月 26 日 広島国際会議場, ANA クラウンプラザホテル広島
- (15) 野田百合, 池田純一郎 (他 6 名, 6 番目) 眼窩に生じた Juvenile Ossifying Fibroma の一例 第 103 回日本病理学会総会 2014 年 4 月 26 日 広島国際会議場, ANA クラウンプラザホテル広島
- (16) 浅井麗伊, 池田純一郎 (他 4 名, 3 番目) Paxillin を標的とする miR-27b を介した Src によるがん悪性化の制御 第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 25 日 パシフィコ横浜
- (17) 池田純一郎 (他 2 名, 1 番目) 子宮類内膜腺癌細胞株におけるアルデヒド脱水素酵素発現に対するヒスタミンの役割 第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 25 日 パシフィコ横浜
- (18) 松崎聖子, 池田純一郎 (他 7 名, 7 番目) 子宮体部漿液性腺癌 32 例における子宮頸部細胞診と臨床所見の検討 第 55 回日本臨床細胞学会総会 (春期大会) 2014 年 6 月 7 日 パシフィコ横浜
- (19) 前野悦子, 池田純一郎 (他 4 名, 5 番目) 診断に苦慮した臍腫瘍の一例 第 53 回日本臨床細胞学会秋期大会 2014 年 11 月 9 日 下関市民会館・海峡メッセ下関・下関市生涯学習プラザ
- (20) 池田純一郎 Effect of non-equilibrium atmospheric pressure plasma in cancer initiating cells. 5th International Conference on Plasma Medicine (ICPM5)/ 第 5 回プラズマ医療国際会議 2014 年 5 月 20 日 奈良県新公会堂
- (21) 池田純一郎 腫瘍幹細胞の観点に立脚した大気圧プラズマの抗腫瘍効果の検討 第 18 回 応用物理学会 プラズマエレクトロニクス分科会 プラズマ新領域研究会 プラズマ技術研究会 第 4 回 新学術領域研究「プラズマとナノ界面の相互作用

用に関する学術基盤の創成」公開シンポジウム合同開催『プラズマが拓く新学術領域と今後の展開』 2014年6月14日 名古屋大学東山キャンパスIB電子情報館

- (22) 池田純一郎 新学術領域研究「プラズマ医療科学の創成」第3回公開シンポジウム「プラズマとナノ界面の相互作用に関する学術基盤の創成」「統合的神経機能の制御を標的とした糖鎖の作動原理解明」合同開催『新学術の最前線～プラズマと生物と医療の協奏曲～』2014年8月9日 名古屋大学ES館
- (23) 池田純一郎 TREATMENT STRATEGY OF CANCER INITIATING CELLS WITH NON-EQUILIBRIUM ATMOSPHERIC PRESSURE PLASMA The 2nd International Workshop on Plasma For Cancer Treatment (IWPCT) 2015年3月16,17日 名古屋大学ES館
- (24) 池田純一郎, 森井英一 悪性リンパ腫における活性酸素を制御する因子の検討 第102回日本病理学会総会 2013年6月8日 ロイトン札幌, 札幌芸文館
- (25) 小根山千歳, 池田純一郎(他6名, 6番目) microRNAを介したmTORC2制御とがん形質発現 第72回日本癌学会学術総会 2013年10月4日 パシフィコ横浜
- (26) 前野悦子, 池田純一郎(他4名, 5番目) 後腹膜嚢胞性病変を形成したリンパ脈管筋腫症(LAM)の一例 第52回日本臨床細胞学会秋期大会 平成25年11月3日 大阪国際会議場
- (27) 二瓶恵, 池田純一郎(他4名, 5番目) 気管支擦過細胞診標本における良性異型細胞と軽度異型腺癌細胞との鑑別 第52回日本臨床細胞学会秋期大会 平成25年11月3日 大阪国際会議場
- (28) 池田純一郎 腫瘍幹細胞の観点に立脚したプラズマ技術を用いた新たな腫瘍制御 新学術領域研究「プラズマ医療科学の創成」第2回公開シンポジウム 2013年9月28日 名古屋大学IB電子情報館

〔図書〕(計1件)

池田純一郎 他, 南江堂, 超・入門 臨床血液内科アトラス ~病理組織診断の苦手意識を克服する!~, 金倉謙, 森井英一 編, 2015

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

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: