

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461435

研究課題名(和文)リンパ腫微小環境に存在する多能性幹細胞MUSEの機能解析

研究課題名(英文)Analysis of the functions of MUSE in the lymphoma microenvironment.

研究代表者

中山 享之(Nakayama, Takayuki)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00456659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん微小環境は、病勢の悪化や化学療法抵抗性を付与する。しかしどのように構成されるか不明である。そこで間質に存在する多能性幹細胞であるMUSE細胞に着目し解析を行ったところホジキンリンパ腫等において多数集簇していた。骨芽細胞を悪性リンパ腫の予後不良因子であるFGF2で刺激するとVEGF-Aの発現が上昇し、血管の安定化を促すAng-1の発現が減少した。これは血管内皮の接合を緩め新たな血管を形成する上で重要である。リンパ腫細胞の培養上清に対しMUSE細胞は遊走することも明らかとなった。つまりMUSEは、FGF2によって形成された豊富な血管を通じてリンパ腫に浸潤すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The tumor microenvironment favors the tumor growth and enhanced the chemo-sensitivity of tumors. However, little is known about the mechanism what a kind cell forms the tumor microenvironment and where they come from so far. We found that multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells reside in lymphoma tissues. Elevated expression of FGF2 has been reported in hematological malignancies, and is prognostically significant for malignant lymphoma. FGF2 significantly modulated expression of genes related to angiogenesis such as VEGF-A, Ang-1 in osteoblasts, a component of the tumor microenvironment, suggesting that FGF2 promotes angiogenesis. Migration assays showed that supernatants of lymphoma cells enhanced migration of MUSE cells. Thus, we concluded that MUSE cells migrate towards the lymphoma tumor via newly formed vascularities by FGF2.

研究分野：血液内科学

キーワード：体性幹細胞 がん微小環境 血管新生

1. 研究開始当初の背景

近年の化学療法技術の向上により血液悪性腫瘍における寛解率は、大きく向上した。しかしながら再発率が高く5年生存率は、例えば白血病の場合には約40%に留まる。近年の研究から、血液悪性腫瘍幹細胞が特定部位(ニッチ)に存在し静止期にあることが明らかとなった。その結果、薬剤耐性を獲得し再発の原因となっている。また炎症性細胞が、ニッチを含めた腫瘍微小環境を修飾することも判明してきた。したがって治療成績を向上させるためには血液悪性細胞に対する直接的な療法だけでは、限界があり微小環境を標的にする必要があることは明らかである。我々は、これまでに炎症性細胞である肥満細胞が、多発性骨髄腫およびリンパ腫微小環境において血管新生や線維化をうながし間接的に腫瘍を増大させることを見いだした。その機能を低下させれば、腫瘍の進展は起こらないことをマウスモデルにて実証した。悪性腫瘍における血管新生の役割は、良く認識されているが、線維化(線維芽細胞)の重要性も判明して来た。それは、悪性細胞のnicheと働くばかりでなく悪性細胞に物理的な刺激を与え増殖を促したり血管より栄養物質をしみ出させたりという機能である。じっさいに線維化と予後とは相関している。血液疾患においてFGF2の上昇は、予後不良因子と考えられている。FGF2は、血管新生や線維化に関与すると考えられているが、癌微小環境における生理的役割は全て解明されていない。また、どのような前駆細胞がどこから遊走しストローマ、線維芽細胞や内皮細胞に分化するか、現時点では不明である。以上を解明すれば、微小環境をターゲットにした新しい治療法に発展出来る可能性が高い。そこで我々は、間質(fibroblast様細胞)に存在する多能性幹細胞であるMUSE(Multilineage-differentiating Stress Enduring)細胞に着目し、FGF2が微小環境に与える役割について解析することとした。

2. 研究の目的

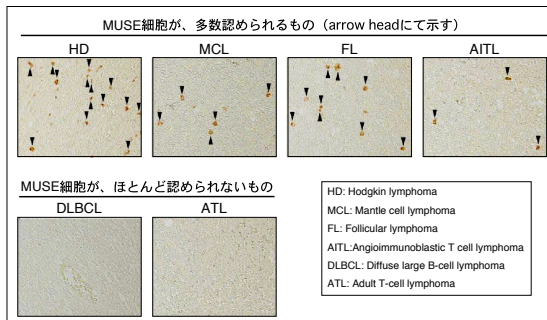
MUSE細胞は、ストローマなどに分化することは確認されており微小環境を構築する前駆細胞である可能性は高いと考えられる。リンパ腫微小環境におけるMUSE細胞の機能を解析することと、リンパ腫微小環境におけるMUSE細胞の数と予後や化学療法抵抗性となにか相関はあるか(臨床的バイオマーカーとしての有用か)を統計学的に解析することを着想した。またFGF2が、微小環境を構成する細胞に与える遺伝子変化を解析することとした。

3. 研究の方法

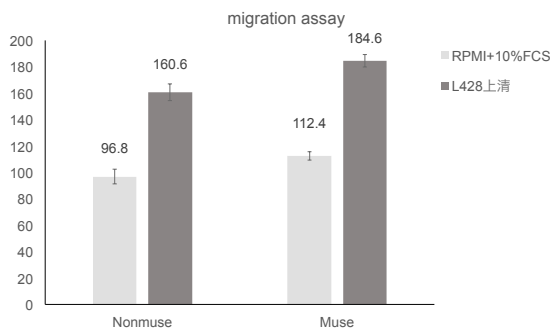
ヒトリンパ腫標本を用いて免疫染色法によりMUSE細胞を同定した。一次抗体は、抗SSEA-3抗体を用いた。MUSE細胞のリンパ腫微小環境への遊走メカニズムを検証するためtranswellを用いたmigration assayを行った。

FGF2による微小環境の変化を検討するため、骨芽細胞細胞をFGF2で刺激し遺伝子の発現変化をマイクロアレイ法にて検証した。その後、発現変化の認められた遺伝子の発現量の推移をquantitative RT-PCRやELISAにて確認した。

4. 研究成果



悪性リンパ腫標本において免疫染色法を用いてMUSE細胞を同定するとある種のリンパ腫(Hodgkin lymphoma、Mantle cell lymphoma、follicular lymphoma、angioimmunoblastic T cell lymphoma)において多数浸潤していることが明らかとなった(上図参照)。これらのリンパ腫は、線維化など間質に組織学的特徴があるものばかりである。興味深いことに、CRP上昇や熱発などのB症状が存在する患者由来のリンパ腫標本にMUSE細胞は、より多く存在している傾向が認められた。



実際にtranswellを用いたmigration assayを行ったところ、MUSE細胞はホジキンリンパ腫の培養上清に対して走化性を示すことが明らかとなった。他のホジキンリンパ腫のcell line(Hs445)に対しても同様の結果を示した(data not shown)。しかしながら、同じホジキンリンパ腫のHDLM2に対しては遊走性を示さなかった(data not shown)。このことは、ホジキンリンパ腫から分泌されるなんらかの物質が、MUSE細胞を誘引していると考えられる。現在、これらの細胞の発現タンパクを比較することにより、原因物質を同定しようとして試みている。

Gene Symbol	UniGene ID	Control average	FGF2 average	log2 ratio	Gene function
Aldh18a1	Mm.233117	423.4	1059.33	1.323	proline biosynthetic process
Igf1bp4	Mm.233799	199.89	502.91	1.331	regulation of cell growth
Slc3a2	Mm.4114	737.44	1855.8	1.331	carbohydrate metabolic process
Pl2g4a	Mm.4186	173.5	440.59	1.344	ovulation from ovarian follicle
Oxnad1	Mm.202257	73.03	187.05	1.357	oxidation-reduction process
Efnb2	Mm.209813	122.81	327.22	1.414	angiogenesis
Hk2	Mm.255848	99.06	265.49	1.422	carbohydrate metabolic process
Fxyd5	Mm.1870	98.63	266.32	1.433	ion transport
Pck2	Mm.29856	437.49	1192.43	1.447	gluconeogenesis
Mtbp	Mm.390829	109.51	300.02	1.454	cell cycle arrest
Sox9	Mm.286407	150.94	419.28	1.474	skeletal system development
Adsl1	Mm.3440	137.24	381.46	1.475	purine nucleotide metabolic process
Slc30a4	Mm.27801	442.23	1233.74	1.48	ion transport
Plia4	Mm.2442	215.3	612.85	1.509	glycerol ether metabolic process
Tnfrsf2	Mm.255332	121	350.83	1.536	angiogenesis
Shmt2	Mm.29890	646.21	1874.86	1.537	glycine metabolic process
Asns	Mm.2942	390.33	1150.26	1.559	asparagine biosynthetic process
Psph	Mm.271784	117.81	350.07	1.571	cellular amino acid biosynthetic process
Igfa6	Mm.225096	101.61	312.63	1.621	cell adhesion
Ptgs1	Mm.275434	110.81	344.85	1.638	prostaglandin biosynthetic process
Vegfa	Mm.282184	581.59	1844.79	1.665	angiogenesis
Glce	Mm.24411	93.92	306.52	1.707	glycosaminoglycan biosynthetic process
Wars	Mm.38433	278.19	942.01	1.76	angiogenesis
Slc6a9	Mm.244549	69.4	235.35	1.762	amino acid transmembrane transport
Gnmpat1	Mm.312945	262.23	894.46	1.77	glucosamine metabolic process
Slc7a5	Mm.27943	536.41	1834.84	1.774	amino acid transmembrane transport
Rps6ka2	Mm.268383	211.14	726.49	1.783	mitotic metaphase
Mthfd2	Mm.443	280.94	967.4	1.784	one-carbon metabolic process
Got1	Mm.19039	297.57	1072.98	1.85	oxaloacetate metabolic process
Hyou1	Mm.116721	356.72	1327.73	1.896	response to hypoxia
Slc7a1	Mm.275489	85.44	321.68	1.913	amino acid transmembrane transport
Slc20a1	Mm.272675	133.78	524.25	1.97	ion transport
Cyb5r1	Mm.280230	93.62	368.25	1.976	steroid biosynthetic process
Hspa5	Mm.330160	423.59	1671.18	1.98	anti-apoptosis
Steap1	Mm.85429	113.69	452.85	1.994	ion transport
Aldh3a1	Mm.4257	354.18	1438.4	2.022	cellular aldehyde metabolic process
Sesn2	Mm.23608	80.94	344.09	2.088	cell cycle arrest
Aldh1l2	Mm.263138	117.96	513.09	2.121	one-carbon metabolic process
Gp12	Mm.200423	162.21	821.3	2.34	2-oxoglutarate metabolic process
Chka	Mm.225505	53.81	283.2	2.396	phosphatidylethanolamine biosynthetic process
Sema7a	Mm.335187	58.44	359.47	2.621	inflammatory response
Prl2c2	Mm.88796	203.29	1292.84	2.669	sprouting angiogenesis
Sdf2l1	Mm.30222	188.2	1213.98	2.689	endoplasmic reticulum-stress inducible gene
Ptgs2	Mm.292547	166.34	1287.09	2.952	prostaglandin biosynthetic process
Atf3	Mm.2706	61.28	546.52	3.157	gluconeogenesis
Chac1	Mm.35083	73.02	659.22	3.174	apoptotic process

Table 1. Profiling of highly up-regulated genes after FGF2 exposure.

FGF2による微小環境の変化を検討するため、骨芽細胞細胞を FGF2 で刺激し遺伝子の発現変化をマイクロアレイ法にて検証したところ、意外にも造血に関する遺伝子の発現変化は少なく主に代謝や血管新生に関するものが大半であった(上記表参照)。なかでも強力な血管新生因子である VEGF-A の発現が上昇し、血管の安定化を促す Ang-1 の発現が減少していた。これは血管内皮の接合を緩め新たな血管を形成する上で重要である。つまり MUSE は、FGF2 によって形成された豊富な血管を通じてリンパ腫に浸潤すると考えられた。

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 10 件)

① Nishiwaki S, Nakayama T*, Naoe T. (19 名中 2 番目) * corresponding author
Dexamethasone Palmitate Ameliorates Macrophages-Rich Graft-versus-Host Disease by Inhibiting Macrophage Functions
PLoS ONE. 2014, 9(5): e96252. (査読あり)

② Inaba H, Takeshita K, Nakayama T, Murohara T. (14 名中 10 番目)

Recovery of Flow-Mediated Vasodilatation after Repetitive Measurements Is Involved in Early Vascular Impairment: Comparison with Indices of Vascular Tone. PLoS ONE. 2014, 9(1): e83977. (査読あり)

③ Hayashi M, Takeshita K, Nakayama T, Murohara T. (11 名中 6 番目)

Angiotensin II Receptor Blocker Ameliorates Stress-Induced Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance. PLoS ONE. 2014, 9(12): e116163. (査読あり)

④ Kato H, Nakayama T, Takamoto S. (8 名中 2 番目)

A retrospective observational study to assess adverse transfusion reactions of patients with and without prior transfusion history. VoxSanguinis. 2015, 108(3):243-50. doi: 10.1111/vox.12208. (査読あり)

⑤ Kato H, Nakayama T, Takamoto S. (8 名中 2 番目)

Repeated exposure rather than the total volume of transfused components may influence the incidence of allergic transfusion reactions. Transfusion. 2015;55(11):2576-81. doi: 10.1111/trf.13201. (査読あり)

⑥ Niwa R, Nakayama T*, Kato H. (15 名中 2 番目) * corresponding author

Identification of a novel missense mutation (563G>a) in the ABO gene associated with a Bel phenotype. * corresponding author
Transfusion. 2016;56(5):1242-3. (査読あり)

⑦ Sugimoto K, Miyata Y, Nakayama T, * Naoe T. (13 名中 3 番目) * corresponding author

Fibroblast Growth Factor-2 facilitates the growth and chemo-resistance of leukemia cells in the bone marrow by modulating osteoblast functions. * corresponding author. Scientific Reports. 2016; 6:30779. (査読あり)

⑧ Yisireyili M, Takeshita K, Nakayama T, Murohara T. (12 名中 9 番目)

Dipeptidyl peptidase-IV inhibitor alogliptin improves stress-induced insulin resistance and prothrombotic state in a murine model. Psychoneuroendocrinology. 2016;73:186-195. (査読あり)

⑨ Nakayama T, * Mizutani K, Hanamura I, Kato H, Takami A, Takeshita K, and Watanabe D. (7名中1番目) * corresponding author Livedoid vasculopathy and popliteal artery occlusion in a patient with protein S deficiency
J Dermatol. 2017 Feb;44(2):198-201. doi: 10.1111/1346-8138.13652. (査読あり)

⑩ Yisireyili M, Nakayama T, Takeshita K. (14名中8番目)
Xanthine oxidase inhibition by febuxostat attenuates stress-induced hyperuricemia, glucose dysmetabolism, and prothrombotic state in mice.
Sci Rep. 2017 Apr 28;7(1):1266. (査読あり) doi: 10.1038/s41598-017-01366-3.

[学会発表] (計 5件)

① Effects of FGF2 on the leukemia microenvironment in the bone marrow
Nakayama T
第76回 日本血液学会学術集会 2014年10月 大阪

② Dexamethasone palmitate ameliorates macrophages-rich graft-versus-host disease by inhibiting macrophage functions.
Nakayama T, Nishiwaki S, Naoe T.
Keystone Symposia, 2015年、4月 Olympic Valley, CA, USA

③ Livedo vasculitis and popliteal artery occlusion in a patient with protein S deficiency
Nakayama T, Mizutani K, Hanamura I, Watanabe D
第77回 日本血液学会学術集会 2015年10月 金沢

④ Identification of a novel missense mutation (563G>A) in the ABO gene associated with a Bel phenotype.
Bel 血型亜型における遺伝子解析
Nakayama T, Niwa R, Ishii H, Takahashi M, Takeshita K, Takami A and Kato H.
第78回 日本血液学会学術集会 2016年10月 横浜

⑤ Fibroblast Growth Factor-2 facilitates the growth and chemo-resistance of leukemia cells in the bone marrow by modulating osteoblast functions.
Nakayama T, Sugimoto K, Miyata Y, Naoe T.
Keystone Symposia, 2017年、3月 Whistler, BC, Canada

[図書] (計 1件)
中山享之. 【白血病学(下)-最新の基礎、臨床研究-】 白血病の基礎研究と臨床研究の動向 CXCR4 阻害剤 (プレリキサファー) による造血幹細胞の動員. 日本臨床. [解説/特集]. 2016 2016.12;74(増刊 10 白血病学(下)):531-6.

[産業財産権]
○出願状況 (計 1件)

名称: 脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いた臍帯造血幹細胞支持物
発明者: 中山享之
権利者: 中山享之
種類: 技術分野
番号: 特願 2016-167355
出願年月日: 2016年8月29日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

6. 研究組織
(1) 研究代表者
中山享之 (NAKAYAMA Takayuki)
愛知医科大学・輸血細胞療法部・准教授
研究者番号: 00456659

(2) 研究分担者
富田章裕 (TOMITA Akihiro)
藤田保健衛生大学 血液・腫瘍内科・准教授
研究者番号: 80378215

(3) 連携研究者
出澤真理 (DEZAWA Mari)
東北大学・細胞組織学講座・教授
研究者番号: 50272323