

# びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫の再発に関する 腫瘍前駆細胞の同定

愛知県がんセンター研究所 遺伝子医療研究部

主任研究員 片山 幸

## 研究の背景

全悪性腫瘍の 4%を占める悪性リンパ腫は、化学療法が奏功することが知られており、新規開発薬剤の恩恵も受けてその多くが寛解する。その反面再発も多く、悪性リンパ腫の最大病型であるびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (DLBCL) の、治療後 4 年以内の再発率は約 4 割に上り<sup>1</sup>、再発予防が予後改善の鍵の一つであると考えられている。

近年、膵癌、胃癌、脳腫瘍を始めとする固形腫瘍や白血病において、腫瘍前駆細胞の存在が証明されている。<sup>2</sup> 腫瘍前駆細胞は、腫瘍のごく一部分を占める CD34 や c-kit 陽性の未分化な細胞表面マーカーが陽性の細胞分画である。この腫瘍前駆細胞は、腫瘍の大部分を占める末端クローンにはない腫瘍の再構築能を持っていることから、この積極的に増殖をしない化学療法抵抗性の細胞が、腫瘍の再発源であると考えられている。これらの研究成果を受け、白血病などの腫瘍においては現在、腫瘍の大部分を占める末端クローンではなく再発源となる腫瘍前駆細胞の根絶こそが予後の改善に重要であるという考え方が広がっており、この腫瘍前駆細胞の性質の検討や特異的な治療法に対する研究が行われている。

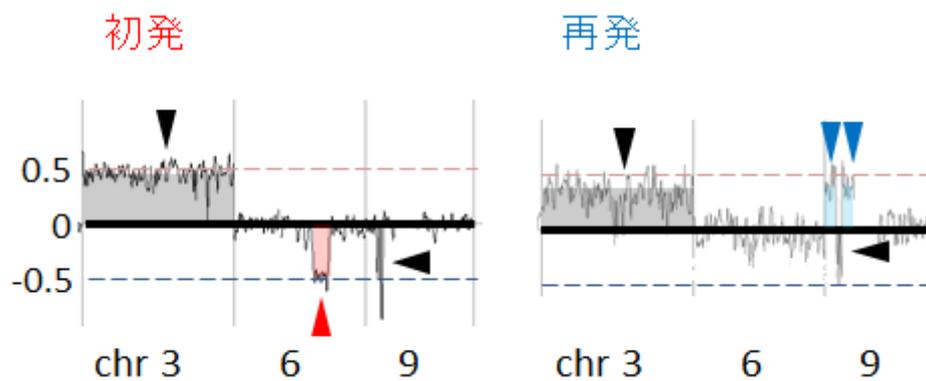
一方、悪性リンパ腫においては、この腫瘍前駆細胞に対する検討はこれまでに一部を除いて行われていない。悪性リンパ腫における腫瘍前駆細胞の同定は、再発予防のための重要な一步となると考えられたため、本研究では、悪性リンパ腫にこの腫瘍前駆細胞が存在するか否かについての検討を行った。

## 研究方法と結果

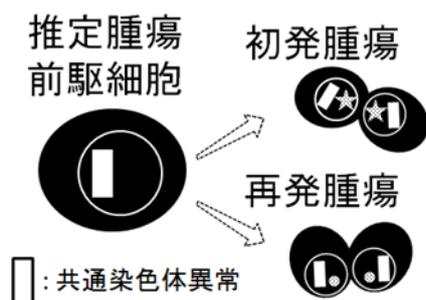
1) 患者腫瘍検体の染色体増幅欠失異常の解析結果を行った所、悪性リンパ腫においても腫瘍前駆細胞が存在することが示唆された。

悪性リンパ腫において、腫瘍前駆細胞が存在すると仮定した場合、同一患者の初発時と

再発時の検体は同じ腫瘍前駆細胞から発生していることになる。そのような場合には、同一患者の初発腫瘍と再発腫瘍に共通してみられる染色体異常は、腫瘍前駆細胞の持つ染色体異常である可能性が高い。このため、まず悪性リンパ腫における初発および再発の連続患者検体の染色体異常の解析を行ったところ、同一症例における初発再発検体に共通する異常として9p21 (CDKN2A) の欠損(7/9 例)、bc12 遺伝子座を含む 18q の増幅(6/9 例)等が高頻度に認められた。これらの遺伝子異常は、長期生存する腫瘍前駆細胞の性質として矛盾せず、実際にこのような異常を持つ腫瘍前駆細胞が存在することが示唆された。更に初発と再発で共通した異常以外に、初発時に見られた染色体異常のうち一部が、再発時に消失しているという結果が得られた(9/9 症例、図①)。この結果から、再発腫瘍が、残存初発腫瘍からではなく、初発腫瘍より染色体異常の少ない腫瘍前駆細胞から生じていることが推測され、このことから腫瘍前駆細胞の存在が示唆された(図②)。



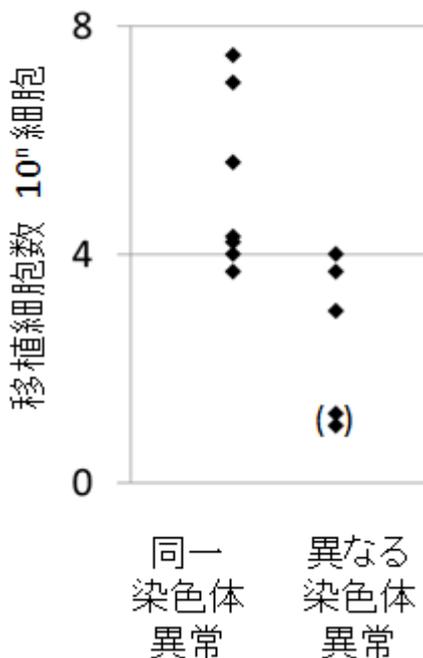
図① 悪性リンパ腫 同一患者での初発及び再発時の腫瘍検体における 染色体異常結果の一例. X軸は異常持つ染色体部位を示す。Y軸の値が0より大きい場合、増幅異常が、0より小さい場合に欠失異常があることを示す。初発時の染色体異常には、再発時に共通する染色体異常(3番染色体の増幅異常と9番の欠失異常)のほか、再発には“消失”する染色体異常(6番染色体の欠失異常)が認められる。検討した9例全てにおいて、同様の再発時に“消失”する染色体異常が認められた。



図② DLBCLにおける腫瘍前駆細胞の推定. 検討した全9症例において、初発時にあった体細胞変異の一部(☆)が再発時に必ず消失していることから、初発/再発に共通する染色体異常(□)を持つ、腫瘍前駆細胞が推定された。

2) 悪性リンパ腫のマウスに対する再移植実験から、腫瘍前駆細胞から進化した新たな末端クローンが腫瘍を再構築することが示唆された。

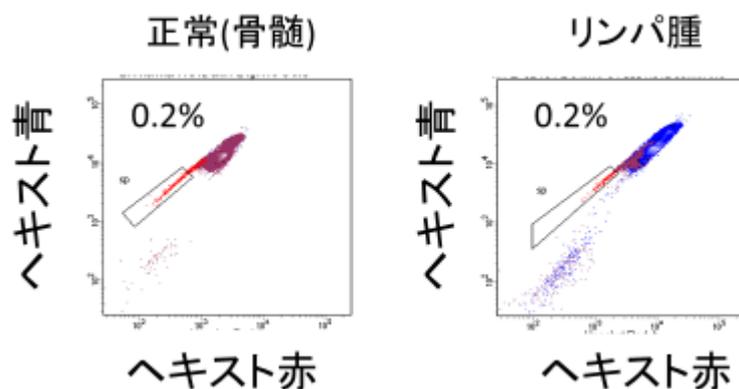
次に、悪性リンパ腫を用いたマウスに対する再移植実験を行い、腫瘍前駆細胞の有無について検討を行った。少量の腫瘍前駆細胞と、大量の末端クローンから成っていると考えられる悪性リンパ腫をマウスに再移植し、再構築された腫瘍の染色体増幅欠失異常の変化の検討を行った。その結果、再移植細胞数が多い場合、同じ染色体異常を持つ腫瘍が再構築され、移植細胞数が少ない場合には異なる染色体異常を持つ腫瘍が再構築されることが判明した(図③)。また、染色体異常が異なる腫瘍が再構築された場合の5症例において、それぞれの染色体異常は互いに(その一部が)異なっていることが明らかになった。すなわち、これらの腫瘍は、腫瘍前駆細胞からそれぞれ別々の染色体異常を獲得して、それぞれが新たな末端クローンに進化したことが推察された。一方、移植細胞に含まれていた当初の末端クローンは、移植細胞数が少ない場合には移植を再構築することが出来ないことから、この当初の末端クローンは有限性の増殖能しか持たないことが示唆された。以上より、悪性リンパ腫には腫瘍再構築能を持つ腫瘍前駆細胞と、限定した増殖能を持つ末端クローンが存在することが示唆された。



図③ 悪性リンパ腫の再移植実験における、移植細胞数と、再構築腫瘍での染色体異常の変化の有無 左側は移植細胞と再構築腫瘍の染色体異常が同一の症例、右側は再構築腫瘍における染色体異常は移植細胞における染色体異常と異なった症例(X軸)。◆はそれぞれの症例を表し、○で示した3次移植の2例を含んでいる。再移植細胞数が多い場合、同じ染色体異常を持つ腫瘍が再構築され、移植細胞数が少ない場合には異なる染色体異常を持つ腫瘍が再構築されている。

3) 悪性リンパ腫にも、未分化な細胞分画である Side-Population 分画は存在したが、その細胞分画に腫瘍前駆細胞が存在することを示すことはできなかった。

1) 2) の結果より、白血病等と同様、悪性リンパ腫においても腫瘍前駆細胞が存在する可能性が強く示唆されたため、この腫瘍前駆細胞の単離を目的として、悪性リンパ腫の検体中における未分化である細胞分画についての検討を行った。これまでに他の悪性腫瘍において、腫瘍前駆細胞が存在しているとの報告があった CD34, CD38, CD127, CD135, c-kit 陽性および Side Population 分画について悪性リンパ腫の検体を用いて検討を行った。その結果、CD38, CD127 は末端クローンにおいても陽性であり、c-kit, CD135, CD34 については腫瘍検体中にほとんど全く陽性細胞分画が見られなかった為、悪性リンパ腫における腫瘍前駆細胞の存在する特異的な細胞分画である可能性は低いと考え除外した。Side Population 細胞分画は、悪性リンパ腫の症例にも存在したものの、正常コントロールの割合と比べて大きな差はなかった (図④)。また腫瘍検体における side population 分画をマウスに再移植する実験を用いて、腫瘍の再構築能の検討を行ったが、腫瘍の再構築は認められず、これらの細胞分画中に腫瘍前駆細胞が存在するという証拠を見出すことはできなかった。



図④悪性リンパ腫検体に対する Side population 分画の検討.  
これまでに他の悪性腫瘍において腫瘍前駆細胞が存在するという報告のあった side population 分画に対して、フローサイトメーターを用いた解析を行った。リンパ腫検体にもわずかな Side Population 分画が存在したが、正常コントロール検体における Side Population 分画の比率と差はみられなかった。

## まとめ

患者検体の解析およびマウスを用いた再移植実験から、悪性リンパ腫においても腫瘍前駆細胞が存在する可能性が高いことが明らかになった。他の悪性腫瘍で報告にあったような腫瘍前駆細胞の豊富な細胞分画を同定することはできなかったが、これらの研究成果は、今後の悪性リンパ腫の治療戦略を考えるための重要な知見であると考え、更にデータを追加して論文化する予定である。

## 文献

1. Seki R, Ohshima K, Nagafuji K, Fujisaki T, Uike N, Kawano F, Gondo H, Makino S, Eto T, Moriuchi Y, Taguchi F, Kamimura T, Tsuda H, Ogawa R, Shimoda K, Yamashita K, Suzuki K, Suzushima H, Tsukazaki K, Higuchi M, Utsunomiya A, Iwahashi M, Imamura Y, Tamura K, Suzumiya J, Yoshida M, Abe Y, Matsumoto T, Okamura T: Rituximab in combination with CHOP chemotherapy for the treatment of diffuse large B cell lymphoma in Japan: a retrospective analysis of 1,057 cases from Kyushu Lymphoma Study Group. *Int J Hematol.*, 91(2):258-66, 2010
2. Meacham CE, Morrison SJ: Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature.*, 501(7467):328-37, 2013