

平成30年 5月28日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19876

研究課題名(和文) 胃癌微小環境における脂肪由来幹細胞の機能解析と間質線維化制御への応用

研究課題名(英文) Adipose-Derived Cells Enhance Cancer Stem Cell Property and Chemo-resistance in Gastric Cancer

研究代表者

木下 淳(Kinoshita, Jun)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：90584855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、胃癌細胞と脂肪由来幹細胞(ADSC)との細胞間相互作用に関する検討を実施した。ヒト大網よりADSCを分離、培養し、CAF(癌関連線維芽細胞)としての機能解析を行った結果、ADSCは癌細胞のEMTを誘導し、xenograftにおいて、間質内の線維化を誘導する事を確認した。胃癌細胞との共培養下において、sphere形成能を亢進させ、stemness関連蛋白の発現が増強し、癌幹細胞性獲得に関与している可能性が考えられた。更にマウス皮下腫瘍モデルにてADSCと胃癌細胞との共投与群では、5-FUの腫瘍縮小効果が抑制され、ADSCが化学療法抵抗性獲得に関与する事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Little is known regarding the influence of adipose tissue derived stem cells (ADSC) in gastric cancer (GC). We investigated the potential effects between GC cell lines and ADSC.

The sphere-forming efficiency of GC cells was significantly increased while directly co-cultured with ADSC. OCUM2MD3 cells generated subcutaneous tumors increased in size after co-injection with ADSC in mouse model. Xenografts tissue revealed the expression of SMA was increased in tumors generated by co-injection of OCUM2MD3 with ADSC in comparison with control tumors, which corresponds to the significant increase of fibrous area. The expressions of SMA and FAP on ADSC were confirmed by fluorescent immunostaining. We also examined whether ADSC is associated with the chemo-sensitivity of OCUM2MD3 using 5-FU. ADSC enhance sphere formation and in vivo tumor growth of GC cells. ADSC also induced 5-FU-resistance, which suggests ADSC acts as CAF in tumor microenvironment of GC.

研究分野：胃癌

キーワード：gastric cancer ADSC

1. 研究開始当初の背景

腹膜播種は胃癌患者の予後規定する最大の因子であり、抗癌剤による治療とともに腹膜播種の成立や増生に関わる分子機構を解明し、それらを標的とした新たな治療法の開発が急務である。胃癌腹膜播種は原発巣から腹腔内に遊離した癌細胞が腹膜下層の脂肪組織に浸潤し播種が成立する。腹膜播種の代表的な好発部位は大網であり、肝円索、結腸脂肪垂など脂肪組織が豊富な部位にも好発する事から、胃癌細胞と脂肪組織の間には何らかの相互作用が働いている可能性が高いと考えられる。近年、脂肪組織内に存在する脂肪由来幹細胞 (Adipose Derived Stem Cell: ADSC)は、骨芽、脂肪、筋、軟骨細胞など、間葉系に属する細胞への分化能をもつとされる細胞であり、特に再生医療の領域で応用が期待されている。一方、悪性疾患においても、ADSCは、多様な生物学的応答によって微小環境を構築していると予想されるが、癌の発生・進展に促進的に作用するか抑制的に作用するかは、成績が相反し一定の見解は得られていない。

2. 研究の目的

本研究では、胃癌におけるADSCの腫瘍増殖や腫瘍集積性に関する機能解析を行うとともに、マウス腫瘍線維化モデルを用い、より生体内に近い微小環境においてADSCが癌間質の線維化に及ぼす影響を検討するべく、本実験を立案した。腹腔内は脂肪組織が豊富な領域であり、その中に多量に含まれるADSCのphenotypeを解析し、癌間質における相互作用とその分子機構を解明する事は、今後の治療開発にとって重要であると考えられる。

3. 研究の方法

ヒト大網組織からのADSCの分離・培養とphenotype解析

ADSCが胃癌細胞の増殖能に与える影響

マウスモデルにおけるADSCと癌細胞の共投与が癌間質線維化に与える影響

ADSCにおけるCAF(癌関連線維芽細胞)マーカーの発現

ADSCが胃癌細胞のsphere形成能に与える影響

化学療法耐性におけるADSCの影響

4. 研究成果

ヒト大網組織からのADSCの分離・培養とphenotype解析

同意を所得したヒト大網の脂肪組織よりADSCを分離培養し、細胞表面マーカー(CD22,44,90,105+/14,31,34,45-)をFACSにて解析し間葉系幹細胞としてのpurityを確認した(Fig.1)。

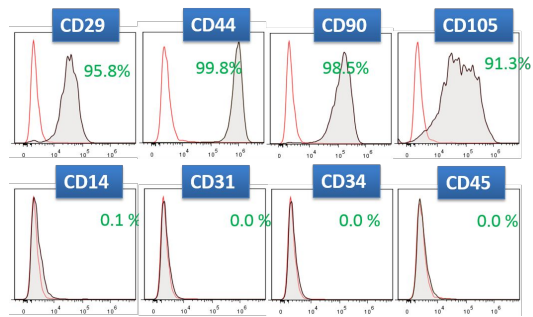


Figure1. the expression of mesenchymal stem (CD29,CD44,CD90,CD105), haematopoietic and endothelial markers on ADSC

ADSCが胃癌細胞の増殖能に与える影響
ADSCのconditioned mediaにて各種胃癌細胞を培養し、MTT assayにて増殖能変化を確認したところ、MKN45のみ増殖能の亢進を認めたが、OCUM2MD3,MKN74,NUGC4においては有意な細胞増殖の変化は認めなかった。

マウスモデルにおけるADSCと癌細胞の共投与が癌間質線維化に与える影響

ヌードマウス皮下に胃癌細胞(OCUM2MD3)とADSCを5×10⁶個共投与し、胃癌細胞単独投与群と比較した結果、ADSCとの共投与により有意な造腫瘍能の亢進を認め(Fig.2A)、腫瘍内の線維化の増生と共にE-cadherinの減弱、αSMAの発現が亢進していた事から、ADSCが胃癌組織においてもCAFとして機能し、癌細胞のEMTを誘導している事が示された。

更にPKH26にて蛍光標識したADSCが皮下腫瘍内に局在している事を確認した(Fig.2B)。

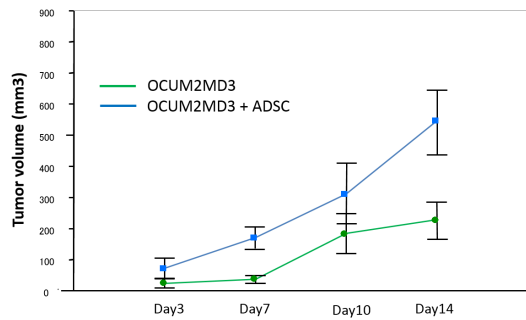


Figure2A. Growth of mouse subcutaneous xenograft models and stromal fibrosis of xenografts.

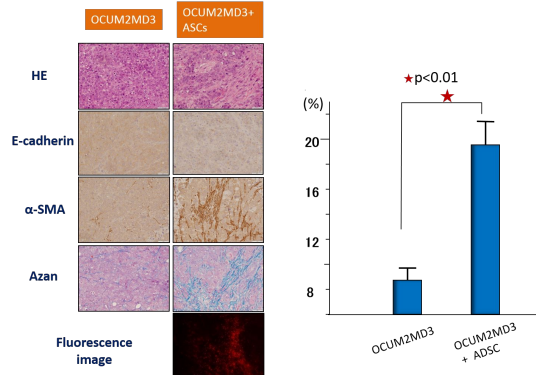


Figure2B. The fibrous area measured by semi-quantitatively

ADSC における CAF(癌関連線維芽細胞)マーカーの発現

ADSC における CAF の関連マーカーとされる SMA と FAP の発現を細胞蛍光免疫染色にて確認した。実験より、ADSC は胃癌微小環境において、CAF として間質線維化に与与する事が示唆された。

ADSC が胃癌細胞の sphere 形成能に与える影響

各種胃癌細胞(OCUM2MD3, MKN45, MKN74, NUGC4)と ADSC を用い sphere formation assay を実施した。ADSC との直接共培養において、OCUM2MD3, MKN45, MKN74 の 50um 以上の sphere 形成数は、単独培養に比較し有意に高値であった。一方で、NUGC4 は単培養、共培養ともに spheroid の形成は認めなかった。また、PKH26 にて蛍光標識した ADSC が spheroid 内に存在している事が確認された (Fig.4A,B)。

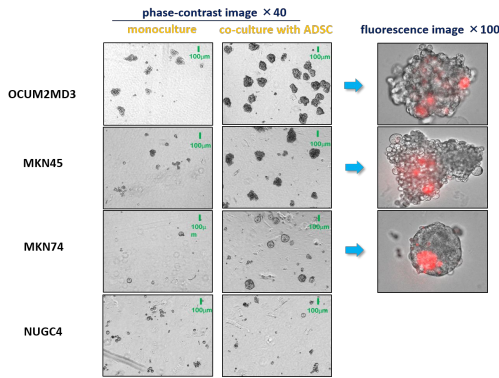
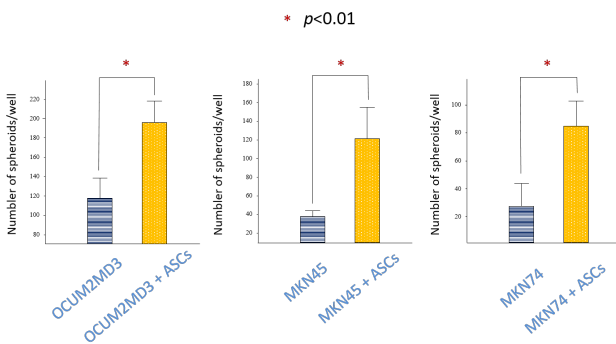


Fig.4A Spheroid formation assay
spheroid 内に PKH26 標識された ADSC が確認できる。



Only spheres bigger than 50 µm in size were included in the analyses.

Fig.4B The number of spheroids of each gastric cancer cell lines.

化学療法耐性における ADSC の影響

ヌードマウス皮下に OCUM2MD3 45×10^6 個 (n=6) および ADSC 5×10^6 個 (n=6) を投与し、皮下腫瘍径が 100-150mm³ に達した時点より placebo (PBS) と 5-FU 25mg/kg を計 5 回、隔日投与した。同様に OCUM2MD3 5×10^6 個のみをヌードマウスに皮下投与し、同様の治療を

実施し、ADSC の共投与が 5-FU の腫瘍縮小効果に与える影響を評価した。5-FU の投与開始から 14 日目の皮下腫瘍径は、OCUM2MD3 単独接種マウスにおいて、control 群: $576 \pm 82 \text{mm}^3$ 、5-FU 治療群: $323 \pm 69 \text{mm}^3$ と有意な腫瘍縮小効果を認めたが、MKN45 および ADSC の共投与群においては、control 群: $813 \pm 63 \text{mm}^3$ 、5-FU 治療群: $715 \pm 53 \text{mm}^3$ と有意な腫瘍縮小効果は認められず、ADSC が胃癌における化学療法耐性を促進する事が示唆された (Fig.5)

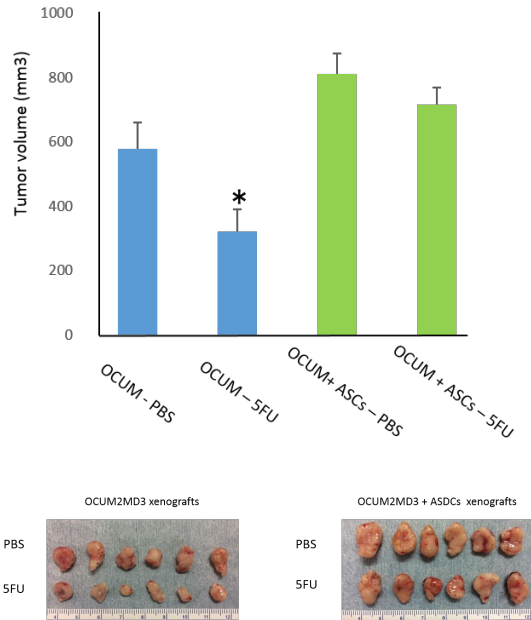


Figure5. ADSC confers the chemotherapy resistance to 5-FU in GC xenograft

以上の結果より、胃癌細胞は脂肪組織との接触後、ADSC が微小環境において、CAF として機能し、間質の線維化を誘導し、胃癌細胞の幹細胞性獲得、化学療法耐性に寄与している可能性が示唆された。現在、これらの細胞間相互作用を誘導するシグナル解析を検討し、論文投稿予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

第 76 回 日本癌学会学術総会 2017
胃癌微小環境における脂肪由来幹細胞の機能解析 発表者 木下 淳

第 117 回日本外科学会定期学術集会

2017 胃癌微小環境における脂肪由来幹細胞の機能解析 発表者 木下 淳

ESMO Asia2016 Congress, SINGAPORE

2016/12/17 Adipose tissue derived

stem cells provide an advantageous

tumor microenvironment in gastric cancer. 発表者 木下 淳
第 27 回日本消化器癌発生学会総会
2016/9/16 胃癌微小環境における癌関連線維芽細胞としての脂肪由来幹細胞の機能解析
発表者 木下 淳
第 74 回日本癌学会総会 2015/10/9
Adipose tissue derived stem cells provide an advantageous tumor microenvironment in gastric cancer 発表者 木下 淳

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 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 0 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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 淳 (KINOSHITA Jun)
金沢大学・医学系・協力研究員
研究者番号：90584855

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

()
研究者番号：

(4) 研究協力者

()