

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11353

研究課題名(和文)肝芽腫幹細胞による腫瘍血管の構築と微小環境の役割

研究課題名(英文) Construction of tumor blood vessels involved in hepatoblastoma stem cells and role of tumor microenvironment.

研究代表者

藤田 恵子 (Fujita, Keiko)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80173425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：従来、腫瘍血管新生は腫瘍周囲の既存血管からおこり、腫瘍血管内皮細胞は正常な血管内皮細胞に由来するとされた。しかし、本実験においてCD133陽性肝芽腫幹細胞からの腫瘍血管内皮細胞の分化が示唆された。

フローサイトメトリーを用いて肝芽腫幹細胞を同定し、side population分画細胞を免疫不全マウスに移植した。形成された腫瘍組織を用いスフェア形成実験を行った。スフェアを3次元培養すると、一部のスフェアからはCD133陽性のチューブ様構造の形成がみられた。細胞間を直接結合する細胞膜ナノチューブはがん微小環境において重要な役割を担う。肝芽腫細胞間における細胞膜ナノチューブの構造について調べた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝芽腫の発がん機構を解明し新たな治療法の開発を進めていく上で、肝芽腫幹細胞をとりまく微小環境、腫瘍血管の新生機序とがん幹細胞との相互作用の解明、がん幹細胞から血管内皮細胞へ分化するメカニズムの解明が重要である。肝芽腫幹細胞を選択的に死滅させることができれば、再発・転移を抑制できる可能性が高いことから、治療法が確立されていなかった再発・転移した肝芽腫に対する解決にも本研究の結果が期待される。

研究成果の概要(英文)：The conventional notion of tumor vasculature is that new tumor blood vessels sprout from preexisting vasculature near the tumor; hence, tumor endothelial cells are derived from normal endothelial cells. However, the results in this report suggest that CD133 positive hepatoblastoma stem cells (CSCs) differentiate into tumor vascular endothelial cells and might be able to form tumor vessels.

The hepatoblastoma stem cells using flow cytometry were identified. The side population cells were injected into NOD/SCID mice. The digested xenograft tumor fragments were cultured and the tumor sphere assay was performed. The spheres were cultivated using 3D culture methods. Some spheres formed CD133 positive capillary-like structures. The membrane nanotubes, which conduit for direct cell-to-cell communication, have been suggested to play an important role in tumor microenvironments. The structure of membrane nanotubes in hepatoblastoma cells was investigated.

研究分野：解剖学

キーワード：肝芽腫 腫瘍血管新生 がん幹細胞 がん微小環境 細胞膜ナノチューブ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞はがん細胞の中にわずか数%しか存在せず、がんの再発や転移の原因と考えられてきた。がん幹細胞は特別な微小環境内で休眠状態となっているため、増殖するがん細胞を標的とする従来の抗がん剤や放射線療法ではがん幹細胞を死滅させることができない。がん幹細胞をとりまく微小環境(ニッチ)はがん幹細胞の増殖に重要であり、きわめて多様で、がんの種類によっても異なる。

従来、腫瘍血管新生は腫瘍周囲の既存血管から腫瘍細胞に新しい血管が伸長し分布するとされ、血管新生阻害剤はこの考えに基づいて正常血管をターゲットとして開発されてきた。しかしながら、正常組織と異なる「腫瘍特異的な病的血管新生」が明らかにされ、がん幹細胞そのものが腫瘍血管の内皮細胞へ分化し血管形成にかかわるという機序が報告されてきた。肝芽腫に対する理想的な血管新生阻害療法の開発のためには、腫瘍血管の特性および新生機序を理解することが重要である。

2. 研究の目的

がん幹細胞はがんの再発や転移にかかわると考えられ、がん根絶の標的細胞とされている。これまで、肝芽腫におけるがん幹細胞(肝芽腫幹細胞)の分離同定法を確立し、腫瘍血管新生との関係について研究を進めてきた。肝芽腫幹細胞をターゲットとした新たな治療法開発のため、肝芽腫幹細胞と周囲の微小環境構成要素の一つである腫瘍血管の関係を明らかにすることを目的として研究を進めた。

3. 研究の方法

肝芽腫幹細胞周囲に存在する微小環境(腫瘍血管)を破壊させる治療法開発のために、肝芽腫幹細胞と腫瘍血管との関連性を解明する目的で実験を実施した。

(1) 肝芽腫細胞培養実験モデルを用いた肝芽腫幹細胞の分離

ヒト肝芽腫細胞株(HuH-6 clone-5, well differentiated type, JCRB0401)を培養モデルとして使用した。肝芽腫細胞を培養し、培養細胞がコンフルエントになった時点で実験に用いた。

肝芽腫幹細胞の分離は今まで確立してきた方法で実施した。すなわち、超生体染色色素であるHoechst 33342の排出能の高い集団であるside population (SP)分画を検出するアッセイを用いた。ABC transporter阻害剤であるverapamil (Sigma, MO, USA)を添加し、Hoechst 33342排出を阻害しSP分画を消失させることにより、SP分画の細胞を確認した。SP分画細胞ならびにnon-SP (main population: MP)分画細胞をソーティングした。

(2) *in vivo* 異種移植実験とその解析

SP抽出法によりソーティングした肝芽腫SP分画細胞(がん幹細胞の候補となる細胞)を免疫不全マウス(NOD/SCIDマウス)の皮下に異種移植し、腫瘍形成の有無を確認した。形成された腫瘍をパラフィン包埋・薄切し、ヘマトキシリン・エオシン染色を行い組織学的に調べた。

また、腫瘍細胞の増殖能を確認するために、免疫不全マウスに形成された腫瘍を粥状になるまで細切し培養した。

(3) 肝芽腫細胞由来の細胞集塊(スフェア)形成実験ならびに3次元培養の実施

免疫不全マウスに形成された腫瘍組織から分離した初代がん細胞を用い、無血清培地で浮遊培養(スフェロイド培養)を行い、がん幹細胞から血管内皮細胞へ分化するメカニズムの解明

を進めた。がん幹細胞はスフェロイド培養を行うと、球状の細胞集塊（スフェア）を形成し、このスフェアを微小環境としてがん幹細胞が増殖していくとされている。

形成されたスフェアの構成細胞の性状を免疫組織化学的に調べた。さらに、コラーゲンゲルをスキヤフォールド（足場）とした3次元培養を用いてスフェアを培養し、スフェアから新生する構造物について形態学的ならびに免疫組織化学的に解析した。

(4) 肝芽腫細胞間の相互作用-細胞膜ナノチューブ

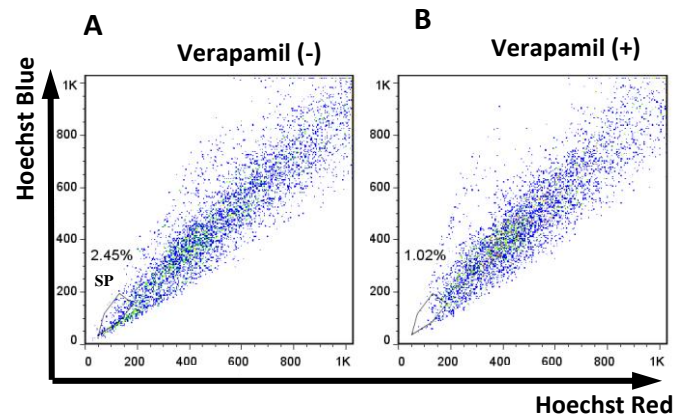
細胞間コミュニケーションは、腫瘍の微小環境において、異種性を誘発する重要な因子として注目を集めている。細胞膜ナノチューブ（membrane nanotube）として知られている新しい形態の細胞間連絡は、離れた細胞同士を直接連結し、ミトコンドリア、細胞質シグナルなどを効率よく伝達することから、従来の液性シグナル伝達物質のような物質拡散がおこらず、シグナルの減弱が少ない効率的な連結システムであると考えられている。

ヒト肝芽腫細胞間における連結-細胞膜ナノチューブの形成と特徴について、形態学的に確認した。

4. 研究成果

(1) 肝芽腫細胞培養実験モデルを用いた肝芽腫幹細胞の分離

培養ヒト肝芽腫細胞から SP 分画法により肝芽腫幹細胞を分離した。



(2) *in vivo* 異種移植実験と解析

培養ヒト肝芽腫細胞からがん幹細胞の候補となる細胞を分離し、免疫不全マウスに異種移植後、腫瘍再構築能を確認した。SP 分画細胞を免疫不全マウスに移植した場合は腫瘍形成が確認された。SP 細胞は高い腫瘍形成能を有し、この細胞集団にがん幹細胞が含まれていることが示唆された。形成された腫瘍を組織学的に調べた結果、肝芽腫特有の組織学的構造を示した。

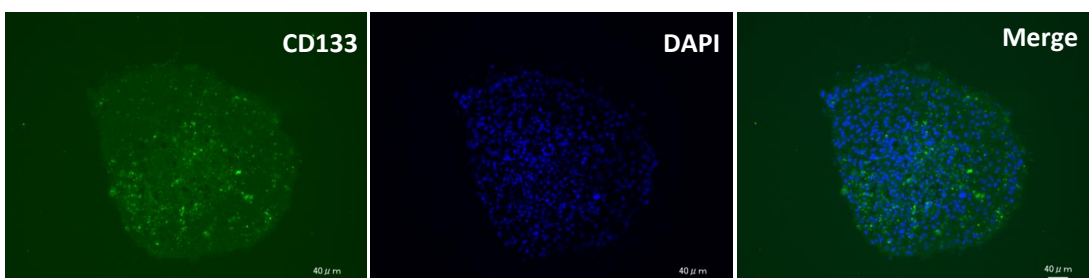
形成された腫瘍を組織学的に調べた結果、肝芽腫特有の組織学的構造を示した。

(3) 肝芽腫細胞由来の細胞集塊（スフェア）形成実験

SP 分画細胞を免疫不全マウスに異種移植し、腫瘍再構成を確認後、初代がん細胞のスフェア形成実験を行うと、がん細胞由来の細胞集塊（スフェア）が形成された。

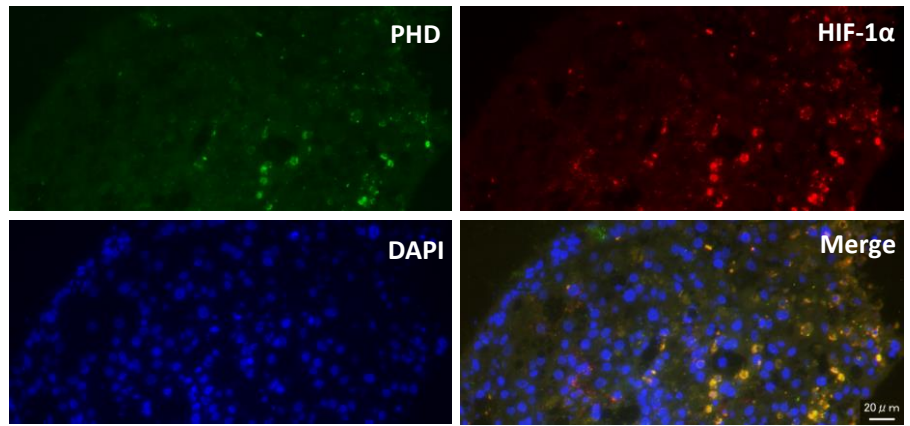
蛍光免疫染色を実施し、形成されたスフェアの構成細胞の性状を免疫組織化学的に調べた。

1) CD133 スフェアには CD133 陽性の細胞が確認された。



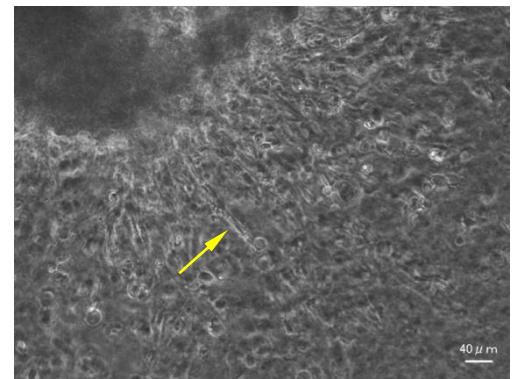
2) hypoxia-inducible factor(HIF)-1 α および prolyl hydroxylase(PHD)

低酸素シグナルの中心的分子であるHIF-1 α とPHDの関係について調べた。HIF-1 α のレベルは酸素濃度感受性タンパクPHDにより酸素濃度依存性に調節されると言われている。HIF-1 α がスフェアの中心部に近くに観察されたのに対し、PHDの反応はスフェアの辺縁に近い細胞に確認された。



(4) 形成されたスフェアの3次元培養

3次元培養したスフェアの周囲には多くの細胞が遊走し、一部のスフェアではチューブ様構造(矢印)が観察された。遊走細胞およびチューブ様構造はCD133陽性であった。さらに、光学顕微鏡で観察した試料を透過型電子顕微鏡で観察すると、チューブ用構造は管腔を形成していることが確認された。これらの結果からCD133陽性細胞からの腫瘍血管新生の可能性が示唆された。

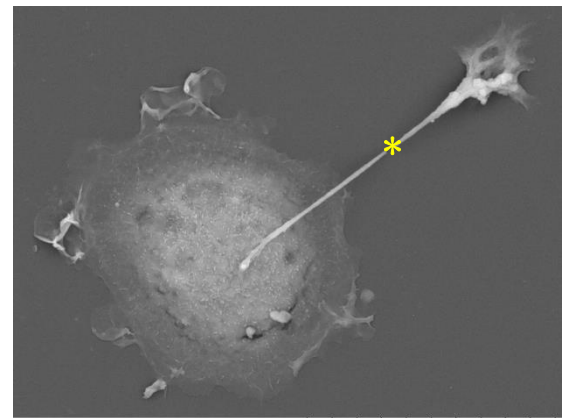


(5) 肝芽腫細胞間の相互作用-細胞膜ナノチューブ

培養モデルを用いて肝芽腫細胞を観察すると、遠隔の細胞間を結合するチューブ様構造、細胞膜ナノチューブが確認された。ヒト肝芽腫における腫瘍血管新生メカニズムを明らかにする研究の一環として、肝芽腫細胞による培養モデルを用いて、がんの微小環境、とくに腫瘍細胞間のネットワークに着目し、肝芽腫細胞間連結機構(細胞膜ナノチューブ)について研究を進めた。

細胞膜が細長く伸長したチューブ構造、細胞膜ナノチューブは隣接する細胞だけでなく遠隔にある細胞同士も物理的に連結し、細胞から細胞へのシグナル輸送を可能にするネットワークであり、細胞間コミュニケーションをダイレクトに司る新しいシステムとして注目されている。腫瘍が組織浸潤能および転移能をもつようになることをがん化と呼び、複数の遺伝子変異が原因とされていたが、近年では細胞から分泌するタンパク質により、前がん細胞あるいは正常細胞のがん化が促進されるといわれている。腫瘍におけるがん化にも細胞膜ナノチューブによるタンパク質輸送が関与していると考えられる。

肝芽腫細胞間の細胞膜ナノチューブを走査型電子顕微鏡で確認した。写真の細胞膜ナノチューブ(*)は微絨毛をもった細胞に向かって伸長していた。悪性度の高いがん細胞表面には微絨毛が密に分布するとされ、細胞表面の微絨毛の発達とがん細胞の悪性度とは相関すると報告されている。これらのことから、細胞膜ナノチューブにより輸送された物質が、がん細胞の悪性度を増加させ、細胞表面の微絨毛が発達したのではないかと予測される。



細胞膜ナノチューブの構造と機能については今後さらに研究を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤田恵子, 松本幸子, 藤田一正, 穠田真澄, 永島雅文
2. 発表標題 肝芽腫細胞間を連結する細胞膜ナノチューブの構造と機能
3. 学会等名 第125回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤田恵子, 松本幸子, 藤田一正, 穠田真澄, 永島雅文
2. 発表標題 細胞膜ナノチューブによるヒト肝芽腫細胞間の連絡
3. 学会等名 第124回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田恵子, 松本幸子, 村井則子, 穠田真澄
2. 発表標題 ヒト肝芽腫における細胞間ネットワークの形成
3. 学会等名 第49回 日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤田恵子, 松本幸子, 藤田一正, 穠田真澄, 永島雅文
2. 発表標題 ヒト肝芽腫における細胞膜ナノチューブの形成
3. 学会等名 第123回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤田恵子, 松本幸子, 小松久美子, 村井則子, 糺田真澄
2. 発表標題 腫瘍血管構築に関する肝芽腫幹細胞について
3. 学会等名 第48回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 藤田恵子, 松本幸子, 藤田一正, 糺田真澄, 永島雅文
2. 発表標題 ヒト肝芽腫細胞におけるがん微小環境ストレスに対する適応応答
3. 学会等名 第122回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Keiko Fujita, Masumi Akita	4. 発行年 2017年
2. 出版社 INTECH	5. 総ページ数 10 (215-225)
3. 書名 Physiologic and Pathologic Angiogenesis - Signaling Mechanisms and Targeted Therapy. Chapter12 Tumor Angiogenesis: A Focus on the Role of Cancer Stem Cells.	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考