

令和 2 年 5 月 8 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11267

研究課題名(和文) 生体親和性多孔性膜(ハニカム膜)による卵巣癌の新規治療と診断法の開発

研究課題名(英文) Development of new treatment and diagnostic method for ovarian cancer using biocompatible porous membrane (honeycomb films)

研究代表者

太田 剛 (OTA, TSUYOSHI)

山形大学・医学部・講師

研究者番号：50375341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ハニカム膜は、均一な多孔性膜である。ヒト卵巣癌細胞株をマウスに接種しハニカム膜による腫瘍増殖抑制効果を検討したところ、コントロール(ハニカム膜貼付なし)と比較してハニカム膜貼付では有意差を持って腫瘍増殖を抑制した。形成された腫瘍組織におけるRNA sequenceを行ったところ、Gene Ontology解析でハニカム膜貼付により細胞骨格や受容体リガンドなどに関連した遺伝子発現が有意に抑制されていた。これらの結果から、ハニカム膜の腫瘍形成抑制効果のメカニズムとしてはハニカム膜によって細胞骨格が変化し、細胞膜受容体発現の低下が起こることによって細胞内の増殖シグナルが低下するためではないかと推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣癌は早期発見が難しく、初回手術時は腹腔内に多数の播種病変を認め、腫瘍を完全に摘出することが困難であることが多い。ハニカム膜がin vivoにおいて卵巣癌の腫瘍形成を抑制する効果があることが明らかになった。卵巣癌において手術完遂度は治療因子の中でも重要な予後因子であり、初回可及的腫瘍減量術後の残存腫瘍にハニカム膜を貼付することで残存腫瘍の発育と浸潤・転移の抑制が可能となれば、卵巣癌患者の手術侵襲を低くし、予後を改善できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Honeycomb films are uniform porous membranes. To examine the inhibitory effect of honeycomb films on tumor growth, we conducted the mice study. In mice inoculated subcutaneously with human ovarian cancer cell lines and attached honeycomb films, tumor growth was significantly inhibited as compared with the control without the attachment of honeycomb films. RNA sequence was performed on the formed tumor tissues, Gene ontology analysis showed that gene expressions related to cytoskeleton and receptor ligands were significantly suppressed in the tumor applying the honeycomb films compared to control. Collectively, the mechanism underlying the relationship between honeycomb films and tumor growth inhibition in ovarian cancer may involve abnormalities in cytoskeleton and decreases in expression of the cellular membrane receptor, thereby reducing the intracellular proliferation signaling.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：卵巣癌 ハニカム膜 腫瘍増殖 RNA sequence 細胞骨格 細胞膜受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ハニカム膜 (honeycomb film) は、均一な多孔性膜であり、様々な生体親和性素材から作製することが可能である (Hollister SJ. Nat. Mater 2005)。ハニカム膜は、3D porous scaffolds とも言われ、細胞が接着、増殖していく上での足場となる。使用する生体素材と孔径によりハニカム膜上では、正常細胞は増殖が促進され、癌細胞では増殖が抑制されていることが知られている (Tanaka M. Biochim Biophys Acta 2011)。3D porous scaffolds による抗癌効果は、国内外で例がなく、世界初の結果である。このハニカム膜の特性を生かし、胆管がんの胆道閉塞に対して、ハニカム膜を素材としたステントが開発されすでに臨床応用されている。卵巣癌において手術完遂度は治療因子の中でも重要な予後因子であり、特に進行癌では術後の残存腫瘍径が予後と相関する (Winter WE 3rd. J Clin Oncol 2008)。しかし、進行癌では広汎な腹膜播種や転移巣を伴うため完全摘出が不可能な症例が多い。初回可及的腫瘍減量術後の残存腫瘍にハニカム膜を貼付することで残存腫瘍の発育と浸潤・転移の抑制が可能であれば、卵巣癌患者の手術侵襲を低くし、予後を改善できる可能性がある。

(2) ハニカム膜は生体親和性素材や孔径を変えることで細胞によって接着能が異なるため (Birch MA, Tanaka M. Tissue Eng Part A 2013, Choi H, Tanaka M. Nanomedicine 2013)、癌細胞と血液細胞の分離が可能であることが報告されている (Hoshiba T, Nikaido M, Tanaka M. Adv Healthc Mater 2014, Tanaka M. RSC Advances 2016)。原発腫瘍組織から遊離し循環血液中に存在して転移能を有する circulating tumor cell (CTC) に関する研究は卵巣癌でも報告されているが (Liu JF. Gynecol Oncol 2013)、CTC の存在と予後との関連に一定した見解が得られていないのが現状である。現在 CTC の同定は上皮細胞マーカー EpCAM で CTC をトラップし、血液中の CTC を濃縮する方法が行われているが、CTC の同定に癌細胞接着を有する生体親和性素材で表面処理を行ったハニカム膜を用いることでより効率的に CTC を同定、回収できる可能性がある。これによって卵巣癌における CTC の存在と予後との関連を正確に分析でき、さらに卵巣癌再発・転移の早期発見に応用できる可能性もある。

2. 研究の目的

研究開始当初は in vitro でハニカム膜の細胞増殖抑制効果の有無について検討していたが、当初認めていたハニカム膜による細胞増殖抑制効果は細胞接種時の細胞接着率の違いによるところが大きく、ハニカム膜の細胞増殖抑制効果を正確に反映しているものではなかった。そのため我々は、in vivo でのハニカム膜の腫瘍増殖抑制効果を 2 種類の異なる卵巣癌細胞株を用いて検討することにした。また、研究期間中にハニカム膜の作製、提供が中止したため卵巣癌の CTC に関する実験は行えなかった。以上の理由から本研究期間中の目的は以下の 3 点とした。

- (1) ハニカムによって in vivo で卵巣癌細胞の腫瘍形成が抑制されるか、否か。また卵巣癌細胞の種類によってハニカム膜の腫瘍形成抑制効果に違いがあるのか。
- (2) ハニカム膜の腫瘍形成抑制効果のメカニズムを明らかにする。
- (3) ハニカム膜によって癌幹細胞や CTC に関連した遺伝子発現の変化を認めるかを検討する。

3. 研究の方法

(1) ハニカム膜による in vivo での腫瘍形成抑制効果の検討：親水性と柔軟性が高い素材である polyurethane (PU) を用いてハニカム膜を作成した。5~7 週令のメスヌードマウスの皮下に卵巣癌細胞 SKOV3ip1 (2×10^6) または ES2 (2×10^6) を接種し、腫瘍径が 10mm に達した時点で、麻酔下でマウスに皮下切開を加え、形成した腫瘍表面に PU 平膜、PU ハニカム膜 (孔小 (5-8 μm)、孔中 (8-12 μm)、孔大 (12-16 μm)) をそれぞれ貼付し、皮膚を縫合した。膜を貼付せず手術操作のみを行ったマウスをコントロールとした。SKOV3ip1 は術後 24 日目、ES2 は術後 21 日目に形成した腫瘍を摘出し、腫瘍重量を計測した。

(2) ハニカム膜の腫瘍形成抑制効果のメカニズムの検討：上記 1 の実験で形成された腫瘍のうち、コントロールの腫瘍組織とハニカム膜を貼付した腫瘍組織から RNA を採取し、RNA sequence (RNA 発現の網羅的解析) を行い、ハニカム膜の腫瘍形成抑制効果に関連した遺伝子を同定した。

(3) ハニカム膜による癌幹細胞や CTC 関連遺伝子の発現変化についての検討：上記 (2) で行われた RNA sequence から癌幹細胞に関連した遺伝子 (SOX2, Nestin, CD44) と CTC に関連した遺伝子 (vimentin, EpCAM, E-cadherin) の発現を検討した。

4. 研究成果

(1) ハニカム膜による in vivo での腫瘍形成抑制効果の検討

SKOV3ip1 ではコントロール (Sham, n=5)、PU 平膜 (Flat, n=7)、PU ハニカム膜 (孔小 (5-8 μm): Small, n=7、孔中 (8-12 μm): Medium, n=6、孔大 (12-16 μm): Large, n=7) で実験を行った。腫瘍径が 10mm に達するまでの日数は SKOV3ip1 では 28.9 ± 6.9 、ES2 では 14.1 ± 6.1 であり、それぞれ群で有意差を認めなかった (図 1)。

腫瘍重量は、SKOV3ip1 では コントロール 1.11 ± 0.3 g、PU 平膜 0.8 ± 0.18 g、ハニカム膜孔小 0.61 ± 0.24 g、ハニカム膜孔中 0.53 ± 0.15 g、ハニカム膜孔大 0.31 ± 0.13 g であった。SKOV3ip1 細胞ではコントロールまたは平膜と比較してハニカム膜孔大で有意差を持って腫瘍増殖を抑制した (図 2A)。ES2 では コントロール 1.48 ± 0.54 g、PU 平膜 1.2 ± 0.54 g、ハニカム膜孔小 0.51 ± 0.23 g、ハニカム膜孔中 0.79 ± 0.34 g、ハニカム膜孔大 $0.72 \pm$

0.36 gであった。ES2 細胞ではコントロールと比較して八ニカム膜孔小で有意差を持って腫瘍増殖を抑制した（図2B）。

（2）八ニカム膜の腫瘍形成抑制効果のメカニズムの検討

実験1の結果から SKOV3ip1 では八ニカム膜孔大、ES2 では八ニカム膜孔小の腫瘍形成抑制効果が高いことが明らかになった。次に我々は、八ニカム膜の腫瘍形成抑制効果のメカニズムを検討するため SKOV3ip1 ではコントロール（ip1C）と八ニカム膜孔大（ip1H）、ES2 ではコントロール（ES2C）と八ニカム膜孔小（ES2H）から得られた腫瘍組織を用いて RNA sequence（RNA 発現の網羅的解析）を行った。

ip1C、ip1H、ES2C、ES2H のクラスター解析の結果を図3に示した。SKOV3ip1 ではコントロールと八ニカム膜孔大では遺伝子発現に違いを認めたと、ES ではコントロールと八ニカム膜孔小の遺伝子発現に大きな違いは認めなかった。

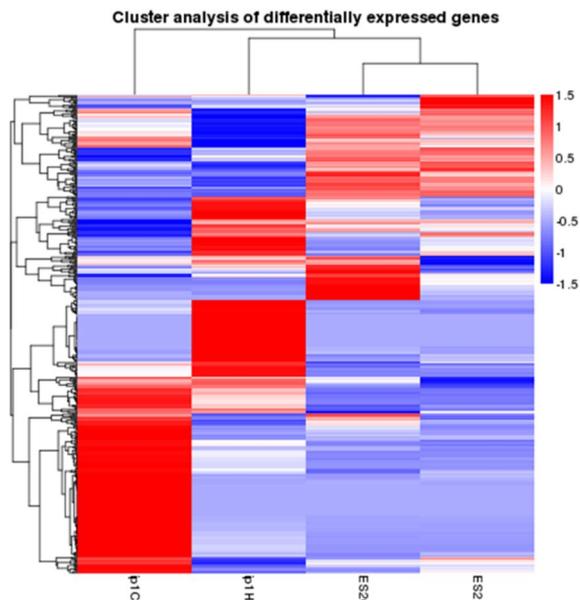


図3. クラスター解析

Volcano diagram による解析では SKOV3ip1 では発現に有意差を認めたと遺伝子は 411 遺伝子あり、そのうちコントロールと比較して八ニカム膜により up-regulation された遺伝子が 164 遺伝子、down-regulation された遺伝子が 247 遺伝子であった。一方、ES では発現に有意差を認めたと遺伝子は 76 遺伝子であり、up-regulation された遺伝子が 19 遺伝子、down-regulation された遺伝子が 57 遺伝子であった（図4）。この結果から我々は、より遺伝子変化が起こっている SKOV3ip1 における Gene Ontology (GO)解析を行った。

SKOV3ip1 において ip1C と ip1H の発現変動遺伝子を含む pathway の上記 20 経路を図5に示した。SKOV3ip1 では八ニカム膜貼付により腫瘍組

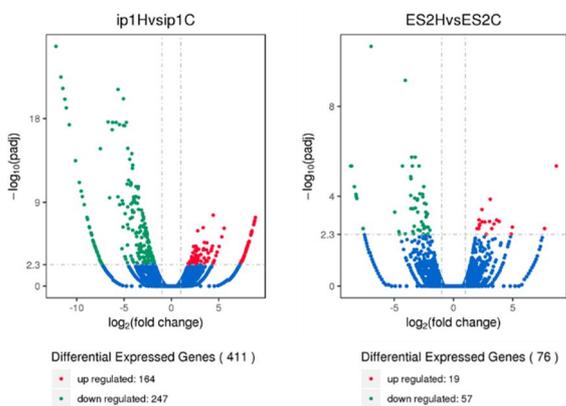


図4. Volcano diagram

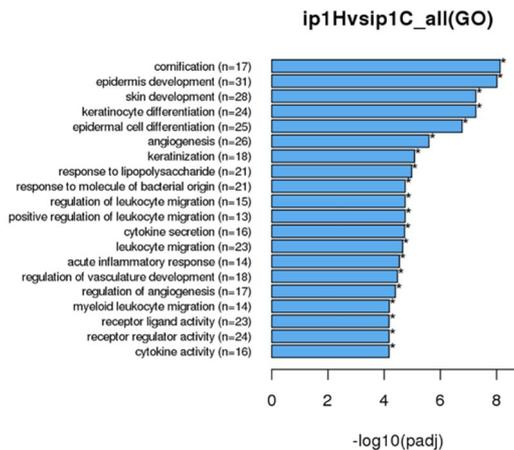


図5. Top 20 ranked GO gene sets

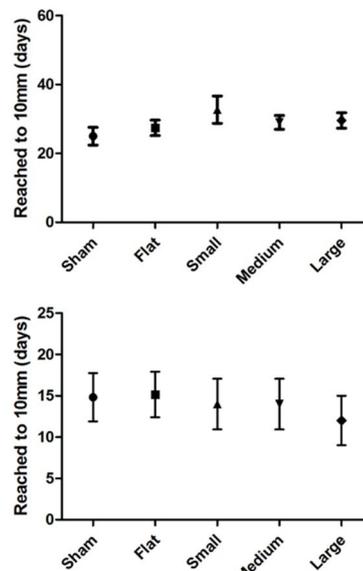


図1. 10mm到達日数

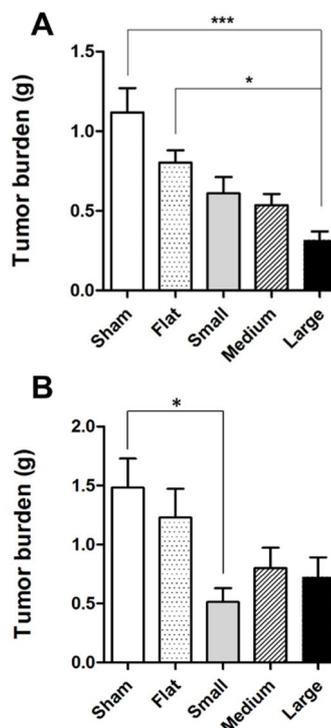


図2. 腫瘍重量

織内の遺伝子発現がコントロールと比較して抑制されている遺伝子が多く、上皮細胞への分化や血管新生、白血球遊走、サイトカイン分泌、受容体リガンドなどに関連した遺伝子発現が有意に抑制されていた。さらにハニカム膜貼付により抑制された遺伝子の cellular component (CC)に関連した GO 解析では細胞骨格に関連した遺伝子群の抑制を認めた(図6)。これは我々が以前行った SKOV3ip1 においてハニカム膜による細胞形態の変化を走査位顕微鏡(SEM)で検討したところ、平膜と比較して孔中、孔大のハニカム膜上で培養することで、細胞は丸みを帯び、孔の中に細胞が入っているものが増えていたという結果を指示するものと考えられた(図7)。ハニカム膜による腫瘍形成抑制効果メカニズムとして当初予測していたアポトーシスや細胞周期に関連した遺伝子発現に有意差は認めなかった。これらの結果から、ハニカム膜の腫瘍形成抑制効果のメカニズムとしてはハニカム膜によって細胞骨格が変化し、細胞膜受容体発現の低下が起これば細胞内の増殖シグナルが低下するためではないかと推察された。さらに血管新生や細胞外マトリックスの抑制も関与しているのではないかと考えられた。現在、関連遺伝子の発現を Real-time PCR で検討中である。

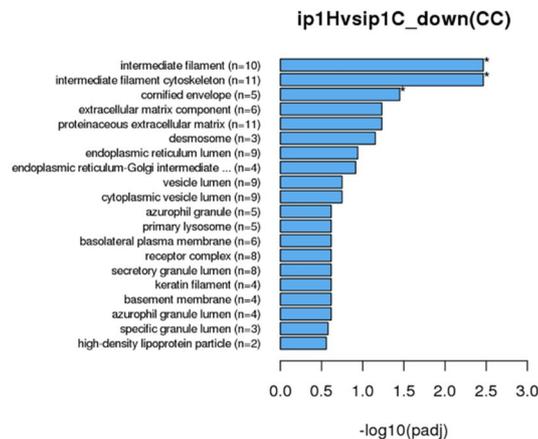


図6. Cellular component ranked gene sets

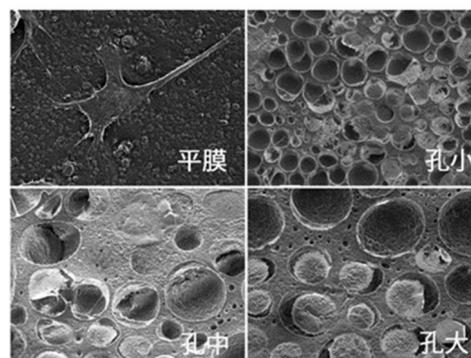


図7. ハニカム膜による細胞の形態変化

(3) ハニカム膜による癌幹細胞や CTC 関連遺伝子の発現変化についての検討

上記(2)で行った RNA sequence から癌幹細胞に関連した遺伝子 (SOX2, Nestin, CD44) と CTC に関連した遺伝子 (vimentin, EpCAM, E-cadherin) の発現を検討した(表1)。SKOV3ip1 と ES2 においてハニカム膜貼付により、癌幹細胞と CTC に関連した遺伝子について有意な変化は認めなかった。この結果は SKOV3ip1 についてはハニカム膜孔大、ES2 についてはハニカム膜孔小で腫瘍形成を抑制された場合の結果に限定されている。腫瘍形成が抑制されることで癌幹細胞への分化や CTC と関連した上皮-間葉細胞分化転換 (EMT: epithelial mesenchymal transition/epithelial to mesenchymal transition) は起こらなかった。これらは癌の治療抵抗性に関連した現象であり、ハニカム膜によって癌細胞の治療抵抗性は引き起こされなかったとも言える。ハニカム膜の特性としてハニカム膜の孔径を変えることで神経幹細胞が、神経細胞に分化すること、または幹細胞の性質を保持したまま増殖することが報告されていることから(Tanaka M, et al. Patent application PCT/JP2006/303909)、今後さらにハニカム膜の素材や孔径を変えることでより癌幹細胞に近い性質をもった細胞の樹立や CTC を接着させるための膜の開発が可能となる可能性がある。

Gene name	ip1C	ip1H	ES2C	ES2H
SOX2	3	0	0	10
NES	445	508	9	3
CD44	2692	2324	11049	6396
VIM	14164	10646	134785	110240
EPCAM	739	886	1	5
CDH1	70	178	2	0

表1. 癌幹細胞とCTC関連遺伝子の発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nagase Satoru, Ohta Tsuyoshi, Takahashi Fumiaki, Enomoto Takayuki, The 2017 Committee on Gynecologic Oncology of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology	4. 巻 45
2. 論文標題 Annual report of the committee on gynecologic oncology, the Japan Society of Obstetrics and Gynecology: Annual patients report for 2015 and annual treatment report for 2010	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 289 ~ 298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.13863	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Seino Manabu, Ohta Tsuyoshi, Sugiyama Akiko, Sakaki Hirotsugu, Sudo Takeshi, Tsutsumi Seiji, Shigeta Shogo, Tokunaga Hideki, Toyoshima Masafumi, Yaegashi Nobuo, Nagase Satoru	4. 巻 9
2. 論文標題 Metabolomic analysis of uterine serous carcinoma with acquired resistance to paclitaxel	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 31985 ~ 98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25868	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ito Tomomichi, Ohta Tsuyoshi, Narumi Megumi, Sakaki Hirotsugu, Seino Manabu, Sudo Takeshi, Nagase Satoru	4. 巻 24
2. 論文標題 Tumor lysis syndrome associated with docetaxel and carboplatin in a case with recurrent endometrial cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Gynecologic Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 21 ~ 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gore.2018.02.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	永瀬 智 (Nagase Satoru) (00292326)	山形大学・医学部・教授 (11501)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	清野 学 (Seino Manabu) (40594320)	山形大学・医学部・助教 (11501)	
研究 協力者	田中 賢 (Tanaka Ken)	九州大学・ソフトマテリアル学際化学分野・教授 (17102)	