

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究 B

研究期間：2008～2009

課題番号：20790928

研究課題名（和文） 癌組織中の 2 つの間質細胞の機能解析と新規治療法開発

研究課題名（英文） The studies of two populations of stromal cells in cancer

研究代表者

小濱 和貴 (OBAMA KAZUTAKA)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50322649

研究成果の概要(和文): 癌研究においては、今まで癌細胞に注目する研究が主だった。しかし、最近になって癌組織内に存在する間質細胞の役割が注目されるようになってきている。我々は、特に間質細胞の多様性に注目している。癌細胞の増殖を正・負に調整する役割を考えた場合、少なくとも 2 つの細胞群に分けることができるはずで、我々はあるマーカーによって 2 つの群の存在を証明した。また、ヒトの癌サンプルから間質細胞を収集し、ヒトにおける役割を解析する基礎を作った。

研究成果の概要(英文): Up to date, the target of cancer research has been cancer cells themselves. However, cancer tissues are composed of many other cells, including stromal cells. In this study, we found 2 populations of stromal cells and showed that a marker positive cell promotes the tumor growth but a marker negative cell inhibits the growth. Further, we succeeded the culture of stromal cells derived from samples of patients. We demonstrated that the cultured stromal cells also showed the similar effects on the tumor growth.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

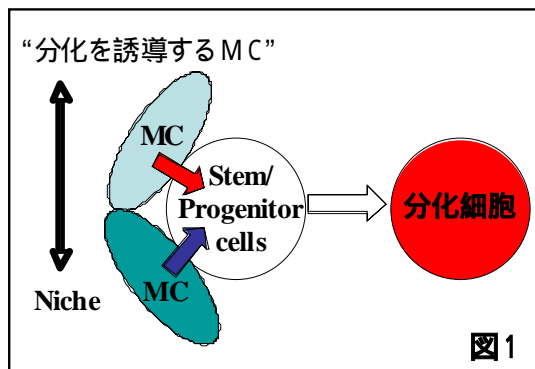
キーワード：実験外科学、間質細胞

1. 研究開始当初の背景

骨髄をモデルとして、stem/progenitor cells の未分化維持装置として "Niche" が想定されたが、現在では特殊な間質細胞 osteoblast がそ

の担い手であることもわかってきた。我々の研究室では、胎児期肝臓発生において、肝臓 stem/progenitor cells の分化を正負に調節する 2 つの間質細胞を胎児期 13 日の肝臓から分

離・培養した。この結果から、我々は、臓器特異的な stem/progenitor cells を未分化維持する Niche の他に“分化を誘導する装置(間質細胞)”が存在し、Niche と均衡を図っているという仮説を提唱した。(図1参照)



これらの仮説は、発生および再生の分野で想定されたものであるが、同様の状況は、「がん幹細胞」を想定すれば、がん組織でもおこっていることが予想される。この当時、がん間質とがん細胞の関連を想定する研究はあったが、がん間質細胞とがん幹細胞の関連を想定する研究はなかった。我々は、このときに、がん間質細胞とがん幹細胞の関連を想定しており、非常に新しい考え方であった。

参考文献：

Kamo N, Yasuchika K, Fujii H, Hoppo T, Machimoto T, Ishii T, Fujita N, Tsuruo T, Yamashita JK, *Kubo H and Ikai I: Two populations of Thy1-positive mesenchymal cells regulate the in vitro maturation of hepatic progenitor cells. Am J Physiol Gastr Liver Physiol. 292: G526-534, 2007.

2. 研究の目的

我々は、癌組織から分離培養した“fibroblast”にも同様に形態的に2種類の細胞が存在することを見出している。本研究では、癌組織でも2つの間質細胞が癌細胞の分化を正負に調節することで、癌の悪性度を決定している可能性を検討する。また、マイクロアレイなどの High-throughput 解析を用いて、それら間質細胞の相違を評価し、「癌分化療法」に応用可能な因子を発見したいと考えている。さらに、マイクロアレイ解析によって、癌細胞の個性のみならず、癌間質細胞の個性を評価することも期待したい。

さらに、がん幹細胞からの観点から、

がん間質細胞および肝臓間質細胞とがん細胞株とのマウスへの同時皮下移植実験を行っている。この際、がん幹細胞の定義上、CD133によって、CD133(+)とCD133(-)細胞をFACSを用いて、分離・培養した。

3. 研究の方法

本研究課題は大きく、1)臨床サンプルにおける間質細胞の検討、2)間質細胞の基礎実験、3)マウスを用いた検討の3点に分けることができるが、それぞれを並列に推進することを計画する。

4. 研究成果

がん間質細胞からの観点の結果

現在までに、ヒト大腸および胃癌のサンプルから、5つの間質細胞を分離・培養した。いずれも、セルラインとして確立し、保存されている。免疫組織染色によって、desimi, alpha-SMA陽性であることを確認し、CD31, CKに陰性であることも確認した。以上の染色性に関しては、1つのセルライン中の多様性もあり、興味深い結果も得られている。詳細は、今後検討していく予定である。

次に、癌細胞に対する影響を、in vivoで調べた。現在まで報告された情報では、癌間質細胞は、癌細胞と同時にヌードマウス皮下に移植した場合、癌増殖を促進する効果が知られている。今回の同様の実験では、4つの間質細胞は、大腸癌細胞株HCT116に対して、同様に増殖促進効果を示した。しかし、1つの間質細胞は、HCT116増殖を有意に抑制することがわかった。これは、今までにない効果で、今回我々が提唱している仮説を裏付ける結果である。

このメカニズムを明らかにするために、in vitroの系を用いて実験を行った。結果、in vivoでの癌抑制効果を示した間質細胞のCMは、HCT116をむしろ増殖促進させることがわかった。よって、この間質細胞の癌抑制効果の原因は、in vivoの血管新生抑制の可能性が考えられる。今後、この因子を同定していく方法を検討中である。

がん幹細胞からの観点の結果

また、以上の結果は、がん細胞の方から解釈すると、がん幹細胞の新しい概念になる。

現在使われている抗がん剤の多くは、「がん細胞の増殖する性質」を標的として開発されたものです。ところで、最近になって、がん細胞集団の中に、組織の幹細胞と同様の性質

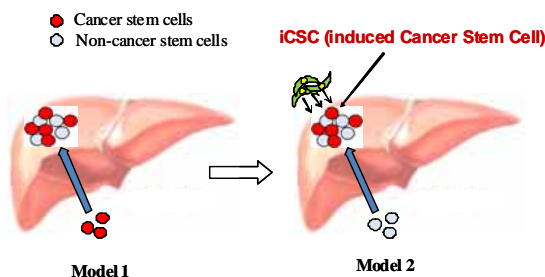
を持つ細胞が存在することが指摘されるようになりました。その「がん幹細胞」は、がん細胞の源であり、もっとも重要な標的細胞ですが、がん細胞の中では増殖期にあることが少ないという特徴をもっています。よって、従来の抗癌剤が効きにくいということが示唆されています。大腸がん幹細胞としては、CD133 (+) 細胞が同定され、報告されています (Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. Nature. 2007 Jan 4;445(7123):111-5.)。そこで、CD133 (+) 細胞を標的とする新しい抗癌剤の開発が期待されるようになりました。「がん幹細胞の性質」としてもっとも重要なものは、「少数 (10の3乗) 個のがん細胞を免疫不全マウス (ヌードマウス、NOD/SCID マウスなど) に皮下移植して、腫瘍塊を形成することができる」という性質です。我々も、FACS sorter を用いて、大腸がん細胞株 HCT116 から、CD133 (+) 細胞と CD133 (-) 細胞を分離し、報告どおり、CD133 (+) 細胞ががん幹細胞の性質を示し、CD133 (-) 細胞は非がん幹細胞であることが確認しました。

今回我々は、肝臓に存在する星細胞という間質細胞 (10の5乗個) を同時に移植することで、少数 (10の3乗) 個の CD133 (-) 細胞が腫瘍塊を形成することを見出しました (図3)。これは、非がん幹細胞であった CD133 (-) 細胞をがん幹細胞へと誘導したことを意味します。実際、single cell culture によって、CD133 (-) 細胞から CD133 (+) 細胞が誘導されて、がん幹細胞の能力が誘導されることを証明しました (論文準備中)。これは、患者サンプルを用いた実験でも証明できました。

概念 . 「がん幹細胞は、間質細胞の作用によって誘導することができる。」

以上の概念を考慮すると、星細胞によって誘導される誘導がん幹細胞 (iCSC: induced cancer stem cell) に対する薬剤選択は、転移あるいは再発に対する創薬に繋がる可能性が示唆されます。(以下図参照)

図3. 肝転移における概念の変換



参考文献 :

Matsusue R, Kubo H, Hisamori S, Okoshi K, Takagi H, Hida K, Nakano K, Itami A, Kawada K, Nagayama S, Sakai Y. Hepatic Stellate Cells Promote Liver Metastasis of Colon Cancer Cells by the Action of SDF-1/CXCR4 Axis. Ann Surg Oncol. 16(9):2645-53, 2009.

ケモカインと間質細胞

一方で、ケモカインとサイトカインは、in vivoとin vitroで異なる効果があることが考えられ、現在5つの間質細胞における、ケモカイン・サイトカインの相違を調べている。

がん間質細胞の新しい結果

特許の申請のため、詳述できないが、今回予想をしていたこと以外の結果を得たので簡単に報告しておく。

外科サンプルを生きた状態で実験に供することで、新しい概念を創出することを目的に、がん細胞の他にがん間質細胞の初代培養を確立しています。一般的に、がん間質細胞は主要増殖を促進すると考えられていますが、我々はマウスの皮下移植実験において、腫瘍増殖を抑制するがん間質細胞の存在を見出しました。

がん間質細胞の新しい役割を提案し、新規のがん抑制因子の発見に寄与する可能性があります。また、がん間質細胞には、いままで想定しなかった作用があることを見出しています。外科サンプルを生きた細胞として収集することで、新しい概念の創出のみならず、個別治療への方向性も期待しています。

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3件)

すべて査読有

1. Okabe H, Ueda S, Obama K, Hosogi H, Sakai Y. Induction chemotherapy with S-1 plus cisplatin followed by surgery for treatment of gastric cancer with peritoneal dissemination. Ann Surg Oncol. 2009 Dec;16(12):3227-36.
2. Okabe H, Obama K, Tanaka E, Nomura A, Kawamura J, Nagayama S, Itami A, Watanabe G, Kanaya S, Sakai Y. Intracorporeal esophagojejunal anastomosis after laparoscopic total gastrectomy for patients with gastric cancer. Surg Endosc. 2009 Sep;23(9):2167-71.
3. Obama K, Satoh S, Hamamoto R, Sakai Y, Nakamura Y, Furukawa Y. Clin Cancer Res. 2008 Mar 1;14(5):1333-9. Enhanced expression of RAD51 associating protein-1 is involved in the growth of intrahepatic cholangiocarcinoma cells. Clin Cancer Res. 2008 Mar 1;14(5):1333-9.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小濱 和貴 (OBAMA KAZUTAKA)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：5 0 3 2 2 6 4 9