

令和 5 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09669

研究課題名(和文) 浮遊中皮細胞による卵巣癌幹細胞誘導メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of cancer stem-like properties of ovarian cancer cells associated with the floating mesothelium

研究代表者

穴戸 明美 (Shishido, Akemi)

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい研究員

研究者番号：30838909

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)：固形癌の転移研究が進む中で卵巣癌の腹膜播種に関するメカニズム研究は遅れている。本研究では、治療抵抗性の原因となる卵巣癌の癌幹細胞性について検討した。LYPD3は正常細胞群に比べて約100倍 癌幹細胞モデル細胞で高発現していたことから、卵巣癌スフェロイドでの発現変化を検討した。LYPD3発現はA2780では二次元培養に比べてスフェロイドで約12倍、CaOV-3では約7倍に発現上昇した。更にCAOV3にLYPD3を強制発現させると、コントロール株に比べて、CD44v9やALDH1A1が有意に上昇した。このことよりLYPD3は卵巣播種病変の新規癌幹細胞マーカーとなる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣癌はしばしば腹腔内に浮遊する癌細胞の集塊をつくる。これは腹膜播種の中でも独特の形態でありスフェロイドと呼ばれ、治療抵抗性の癌幹細胞との関連が示唆されている。本研究課題では、卵巣癌の癌幹細胞マーカーとしてLYPD3という分子を見出した。LYPD3は癌細胞の細胞膜上に存在するGPIアンカー型の膜蛋白であり、大腸癌の転移・再発にも関係していることが分かっている。本研究成果はLYPD3に対する新しい抗体治療の可能性に繋がるもので学術的、医学的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Ovarian cancer cells often produce spheroid formation in abdominal cavity. It is, however, largely unrevealed how peritoneal dissemination of ovarian cancer cells is established and why some tumor cell population is resistant to chemotherapy. In this study, we worked on this problem in terms of cancer stem-like properties which is thought to be one of the reasons for chemo-resistance. Using a cancer stem cell model that can produce tumor in mice from a single cell, we took notice of LYPD3 among various up-regulated genes. LYPD3 level increased in spheroid cultures. Overexpression of LYPD3 cDNA led to induction of cancer stem markers such as CD44v9 and ALDH1A1. These findings suggest that LYPD3 may be a novel marker for ovarian cancer spheroids.

研究分野：病理学、細胞診断学、分子生物学

キーワード：卵巣癌 浮遊播種病変 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は腹腔内浮遊播種病巣を伴うことが多く、化学療法に感受性を示すため、化学療法を先行し、腫瘍を縮小させた後に外科治療が行われることが多い。しかし、通常、術後5年以内に50-85%が再発し、再発後の平均生存期間は2年と報告されている。固形癌の転移研究が進む中で、卵巣癌の腹膜播種に関するメカニズム研究は遅れており、新しい治療法の開発に繋がっていない。私達はこれまでに3D培養系で中皮細胞が卵巣癌細胞に対してスフェロイド形成をはじめとする癌幹細胞様特性を促進させる足場となることを観察してきた。中皮細胞は漿膜の再生機能を有することが知られているが、体腔内では浮遊細胞としても存在しており、これが間葉系幹細胞としての機能を担い、腹水中の卵巣癌細胞の幹細胞性を亢進させて腹膜播種形成を容易にさせている可能性も考えられる。

2. 研究の目的

研究代表者は細胞診断業務において、腹水中にみられる卵巣癌の形態と化学療法の感受性が他の固形癌と異なることから卵巣癌を特別な癌として認識してきた。腹水中には様々な臓器の癌が出現する。分化型腺癌が原発巣の形態を保持しながら漿膜へ浸潤するのに対して、卵巣癌では原発巣と異なる大型の充実性集塊などが多数出現し、腹水中での増殖形態がみられること。さらには卵巣癌(漿液性癌)では腹水中に多量の癌細胞が存在していても抗癌剤療法後に外科的切除がおこなわれ一旦寛解することである。卵巣癌の発生が腹腔内表層細胞(卵管采)であることから、他の固形癌に比べて容易に播種病巣を形成しやすく、これが癌性腹膜炎を惹起する。腹腔内の浮遊播種病巣は、体腔を覆う腹膜に生じる播種巣と比べて、血管に乏しいが、癌幹細胞が浮遊培地でスフェロイドを形成するように、幹細胞性が増強していることで活発な増殖が可能となっているのではないかと考えた。更に先行研究においては中皮細胞との3次元混合培養により卵巣癌スフェロイドの増殖や、癌幹細胞マーカーの誘導がみられた。本研究では、卵巣癌の癌幹細胞性を維持するメカニズムを明らかとし、新たな治療法を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト中皮細胞株 Met-5A を単層培養した上に卵巣癌細胞株 CaOV3 を播種した2D培養系を確立し卵巣癌細胞株と中皮細胞株を用いた2D培養条件下において癌幹細胞性が促進するかどうかをqRT-PCRで検討した。

(2) 卵巣癌細胞株 A2780, CaOV-3 を用いて浮遊播種細胞を模倣したスフェロイド培養を行い癌幹細胞性をqRT-PCRで評価した。

(3) 癌幹細胞用の治療的microRNAであるmiR-4711をはじめとして、KRAS変異癌に効くmiR-4689、難治性癌全般に効く人工核酸MIRTXなどのmicroRNAが卵巣癌細胞株に対する抗腫瘍効果について検討した。

(4) 研究の過程で精巣抗原に着目し、スフェロイド培養で発現上昇する分子を探索した。

(5) 独自の手法で作製した1個からマウスに腫瘍を造るスーパー癌幹細胞で正常細胞と比べて発現亢進する分子を探索した。

4. 研究成果

(1) ヒト中皮細胞株 Met-5A を単層培養した上に卵巣癌細胞株 CaOV3 を播種した 2D 培養系を確立し、24, 48, 96, 120 時間後のサンプルを回収し、癌幹細胞関連マーカーの発現変化を qPCR にて検討した。その結果、CD133, CD44v9 などの種々の癌幹細胞関連マーカーのうち、CD133 のみ遺伝子発現上昇が認められた。

(2) スフェロイド培養でしっかりと癌幹細胞マーカーの上昇を示す陽性コントロール細胞を探索した。HER2 陽性の SKBR-3, Estrogen Receptor 陽性の MCF7, トリプルネガティブ MDA-MB-468 乳癌細胞について検討し、MDA-MB-468 が最も高い ALDH 活性を示し、2次元培養よりもスフェロイド培養系で CD44, CD44v9, CD166 などの癌幹細胞マーカーの有意な亢進がみられ幹細胞性に富んでいると考えられた。MDA-MB-468 を陽性コントロールとして、スフェロイド培養を行い、その結果、卵巣癌細胞株 A2780 のスフェロイドでは、ALDH1A1, NANOG, CD133, CD44v9 などの癌幹細胞マーカーの発現が MDA-MB-468 と同程度に上昇した。CaOV-3 でも同様にこれらの癌幹細胞マーカーが上昇した。

(3) miR-4711, miR-4689, MIRTX のいずれもが卵巣癌細胞株 A2780, Caov-3 に対して有意な細胞増殖活性抑制効果を示した。中でも miR-29b-1-5p の完全相補鎖である MIRTX は極めて強い抗腫瘍効果を示した。

(4) 精巢抗原の中で CT83 は 2次元培養系に比べてスフェロイド培養系で発現上昇がみられ、CT83 の強制発現系により CD44, CD166 などの癌幹細胞性マーカーが上昇したことから新規の癌幹細胞マーカーとなる可能性がある。

(5) LYPD3 は正常細胞群 (HEK293, HPNE, MRC5, BJ5ta, HME1, CCD-18Co-PDL34) の約 100 倍 癌幹細胞モデル細胞で高発現していたことから、卵巣癌スフェロイドでの発現変化を検討した。qRT-PCR の結果、LYPD3 発現は A2780 では二次元培養に比べてスフェロイドで約 12 倍、CaOV-3 では約 7 倍に発現上昇した (図 1)。更に CAOV3 に LYPD3 を強制発現させると、コントロール株に比べて、CD44v9 や ALDH1A1 が有意に上昇した (図 2)。このことより LYPD3 は卵巣播種病変の新たなマーカーとなる可能性があり、卵巣癌の癌幹細胞性との関連が示唆された。

図 1

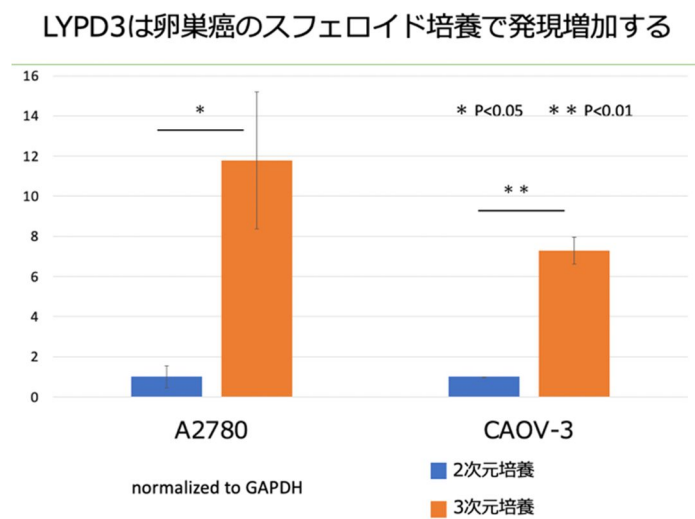
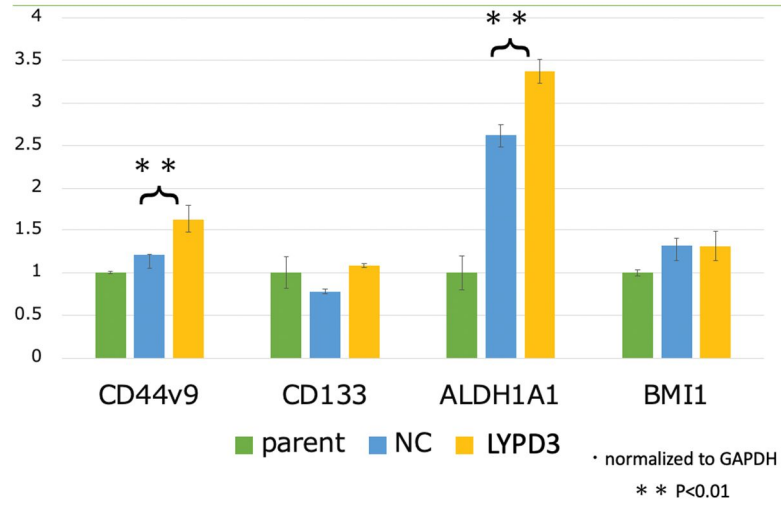


図 2

LYPD3の強制発現によるCAOV-3における
CSCマーカー発現



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	山本 浩文 (Yamamoto Hirofumi) (30322184)	大阪大学・大学院医学系研究科・教授 (14401)	
研究分担者	横山 雄起 (Yokoyama Yuhki) (60615714)	大阪大学・大学院医学系研究科・助教 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関