

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21590813

研究課題名（和文） 骨髄由来間葉系幹細胞による大腸癌転移促進機構の解析

研究課題名（英文） Role of bone-marrow derived mesenchymal stem cells in growth and metastasis of colon cancer.

## 研究代表者

北台 靖彦 (KITADAI YASUHIKO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：10304437

## 研究成果の概要（和文）：

大腸癌の増殖、転移に重要な働きをする癌関連線維芽細胞(Carcinoma-Associated Fibroblast: CAF)の由来として骨髄間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell: MSC)が関与すること、また、MSCが大腸癌の増殖、転移を促進していることをヌードマウス大腸癌同所移植モデルで証明した。また、分子標的薬である Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) チロシンキナーゼ阻害剤（イマチニブ）により MSC の腫瘍間質への遊走や生存が阻害され、MSC による大腸癌の増殖、転移促進作用を抑制できたことから、MSC により形成される腫瘍間質を標的とした新しい治療法の可能性が示された。

## 研究成果の概要（英文）：

In an orthotopic nude mice model of colon cancer, mesenchymal stem cells (MSCs) traveled to tumor stroma, where they differentiated into carcinoma-associated fibroblast (CAF)-like cells. The KM12SM+MSC xenograft enhanced cell proliferation and angiogenesis and inhibited tumor cell apoptosis. When tumor-bearing animals were treated with imatinib, there was no significant increase in primary tumor volume or total volume of liver metastases, despite the KM12SM+MSC xenograft, and survival in the mixed-cell group was prolonged by imatinib treatment. Moreover, the ability of MSCs to migrate to tumor stroma was impaired, and the number of MSCs surviving in the tumor microenvironment was significantly decreased. Our data suggest that blockade of PDGF signaling pathways influences the interaction between bone marrow-derived MSCs and tumor cells in the tumor microenvironment and, hence, inhibits the progressive growth of colon cancer.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：下部消化管学（小腸、大腸）、骨髄由来間葉系幹細胞、間質、癌転移、分子標的治療

## 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで癌間質組織における癌関連線維芽細胞 (**Carcinoma-Associated Fibroblast: CAF**)、血管内皮細胞、ペリサイト、リンパ管内皮細胞、腫瘍関連マクロファージなど、非腫瘍細胞に注目し、転移機構の解析および血管新生抑制療法に関する研究を行ってきた。なかでも CAF は種々の癌において増殖、転移に重要な働きをすると報告されているが、その由来は明らかではない。

また我々は以前、CAF が増殖因子レセプターのひとつである **Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)** を過剰発現することを見出し、分子標的薬である PDGFR チロシンキナーゼ阻害剤が間質反応を抑え、抗癌剤の抗腫瘍効果を増強させることにより転移を抑制することを報告した。

## 2. 研究の目的

骨髄 MSC が創傷部のみならず癌の間質に遊走することが知られているが、その意義やメカニズムについては明らかにされていない。今回の研究では骨髄 MSC が大腸癌の腫瘍微小環境においてどのような役割を持つのか、また癌の増殖、転移にどのような影響を与えるのかを検討した。

また PDGFR チロシンキナーゼ阻害剤を用いて MSC により形成される腫瘍間質を標的とした新しい治療法の可能性を検証した。

## 3. 研究の方法

(1) ヌードマウス同所移植モデルを用いた MSC の遊走能の検討 (PDGFR チロシンキナーゼ阻害剤を用いた治療実験)

PDGF-B を高発現し、マウス大腸へ同所移植した際に間質反応の強い腫瘍を形成することが知られているヒト大腸癌細胞株 (KM12SM) とヒト骨髄 MSC を用いた。

具体的には KM12SM 細胞  $1 \times 10^6$  個をヌードマウスの盲腸壁ないし脾臓に移植し、大腸癌 (原発巣)、肝腫瘍 (転移巣) 形成後に蛍光標識した MSC を尾静注した。同実験を、PDGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (イマチニブ) 投与群/非投与群で行った。

腫瘍移植 28 日後に凍結切片を用いて蛍光顕微鏡にて MSC の腫瘍間質への遊走能を検討した。

(2) ヌードマウス同所移植モデルを用いた MSC の腫瘍増殖、転移促進作用の検討 (PDGFR チロシンキナーゼ阻害剤を用いた治療実験)

ヒト大腸癌細胞株 (KM12SM)  $0.5 \times 10^6$  個単独、ないし癌細胞  $0.5 \times 10^6$  個とヒト骨髄 MSC  $1.0 \times 10^6$  個を混合し、ヌードマウスの盲腸壁ないし脾臓に移植した。同実験を、

PDGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (イマチニブ) 投与群/非投与群で行った。

腫瘍容積、生存期間、肝転移について評価し、パラフィンや凍結切片を用いて免疫組織学的検討を行った。

(3) ヌードマウス同所移植モデルを用いた MSC の分化能の検討

ヒト大腸癌細胞株 (KM12SM)  $0.5 \times 10^6$  個単独、ないし癌細胞  $0.5 \times 10^6$  個と赤色蛍光で標識したヒト骨髄 MSC  $1.0 \times 10^6$  個を混合し、ヌードマウスの盲腸壁に移植した。移植 3 週間後の大腸腫瘍組織の凍結切片を用いて CAF のマーカーである  $\alpha$  SMA、PDGFR- $\beta$ 、デスミン、Fibroblast activation protein (FAP)、Fibroblast specific protein (FSP) の蛍光免疫染色を行い、腫瘍微小環境における MSC の分化能を検討した。

また MSC の腫瘍微小環境における生存能を PDGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (イマチニブ) 投与群/非投与群で評価した。

(4) in vitro における癌-MSC 相互作用の検討

Boyden chamber の下室に癌細胞、上室に MSC を共培養し、MSC の遊走能を評価した。同実験を、PDGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (イマチニブ) 投与群/非投与群で行った。

また、下室に MSC、上室に癌細胞を培養し、癌細胞の遊走能を評価した。またフィルターにマトリゲルをコーティングし、癌細胞の浸潤能も評価した。

さらに MSC の培養上清を癌細胞に曝露し、アポトーシスをおこした癌細胞の割合を検討した。さらに MSC の培養上清を癌細胞に曝露した場合、ないし MSC と癌細胞を接触性に共培養した場合の癌細胞の細胞増殖能を評価した。

Boyden chamber の下室に癌細胞、上室に MSC を共培養し、癌細胞で特異的に変化する遺伝子を、マイクロアレイ法を用いて網羅的に解析した。

## 4. 研究成果

(1) 腫瘍間質への MSC の遊走能

(PDGFR チロシンキナーゼ阻害剤を用いた治療実験)

尾静注された MSC は、大腸癌原発巣ないし肝転移巣の間質に遊走した。イマチニブ投与により MSC の大腸癌原発巣ないし肝転移巣への遊走が阻害された (図 1)。

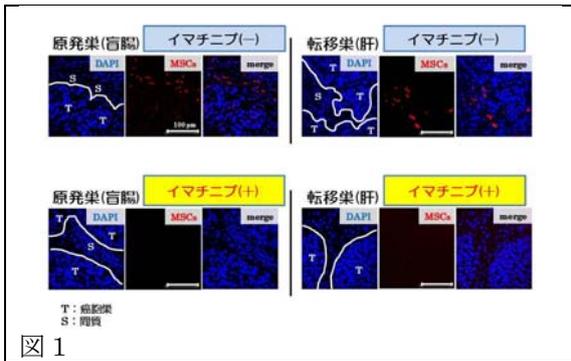


図 1

(2) MSC による腫瘍増殖、転移促進効果 (PDGFR チロシキナーゼ阻害剤を用いた治療実験)

癌細胞と MSC の混合移植群において有意に腫瘍容積が大きく、肝転移が促進され、生存率が低下した。これらの腫瘍促進作用はイマチニブ投与により阻害された(図 2, 3)。免疫組織学的検討では、混合移植群の腫瘍組織において、有意に細胞増殖および血管新生が促進され、アポトーシスが抑制されていた(図 4)。

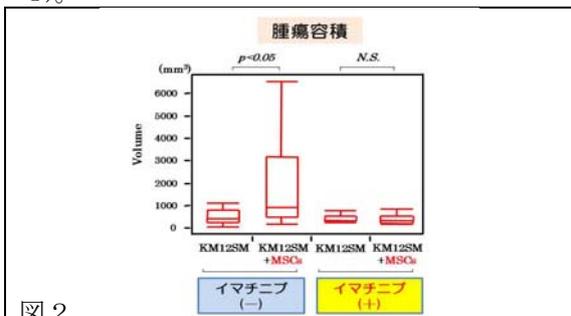


図 2

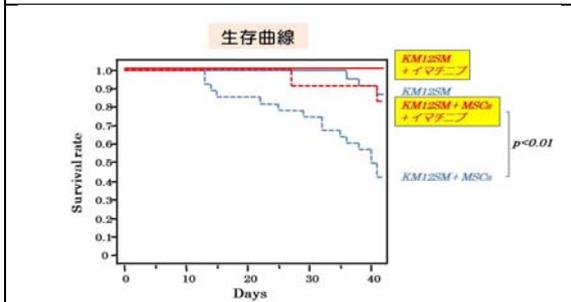


図 3

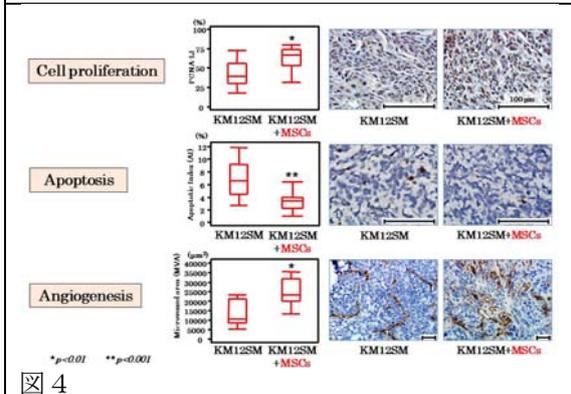


図 4

(3) MSC の分化能の検討

MSC は大腸癌間質に取り込まれ、CAF のマーカーである  $\alpha$  SMA、PDGFR- $\beta$ 、デスミン、Fibroblast activation protein (FAP)、Fibroblast specific protein (FSP) を発現していた (図 5)。

また腫瘍微小環境における MSC の数はイマチニブ投与により大きく減少した (図 6)。

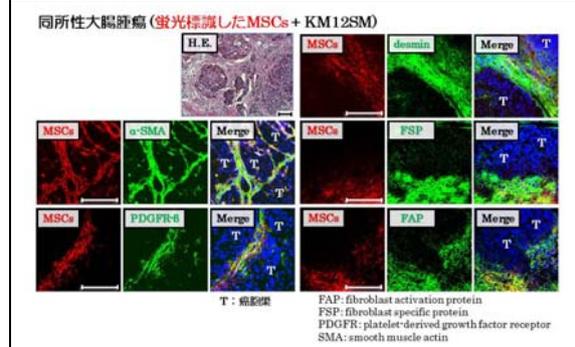


図 5

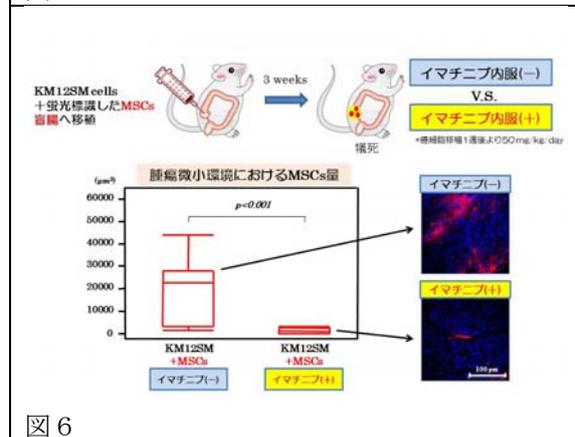


図 6

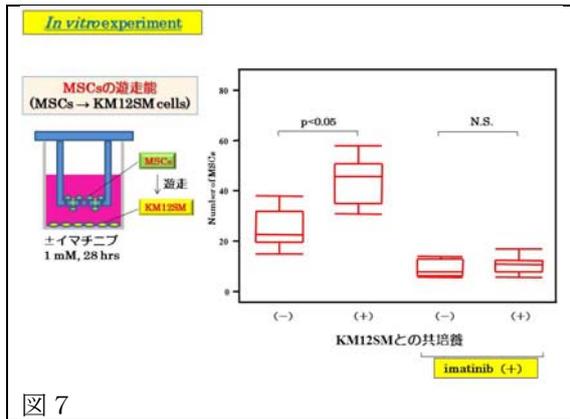
(4) *in vitro* における癌-MSC 相互作用の検討

MSC の遊走能は癌細胞と共培養した際に有意に促進されるが、イマチニブ投与により阻害された(図 7)。MSC は癌細胞の遊走能・浸潤能を有意に高めた。

MSC の培養上清を曝露することで癌細胞のアポトーシスが有意に抑制された。

また MSC の培養上清を曝露しても癌細胞の細胞増殖は促進されなかったが、MSC を癌と接触性に共培養することで癌細胞の増殖が有意に促進された。

マイクロアレイ法による網羅的な解析にて、癌細胞を MSC と共培養することで、癌細胞においてメタロチオネイン (metallothionein: MT) 遺伝子群の発現が特に大きく上昇することを見出した。



## 考察

創傷治癒過程において、MSC が骨髄から動員され創傷部に集積し治癒を促進することが明らかにされている。腫瘍間質と創傷の肉芽組織の間には類似点が多いことから、本研究では MSC の腫瘍微小環境における重要性を明らかにし、大腸癌増殖・転移促進機構の解析を行った。

MSC は CAF に分化し、細胞増殖や血管新生の促進、アポトーシスを抑制することで腫瘍増殖・転移を促進することが示された。また PDGFR シグナル阻害により MSC の腫瘍間質への遊走や腫瘍微小環境における生存を抑制し、腫瘍促進作用を阻害することを示した。

これまでの報告では、MSC の腫瘍増殖・転移促進機構として癌の浸潤や血管外遊走、血管新生、アポトーシス、免疫抑制、癌幹細胞性の維持に関連すると考えられている。最近、CAF の 20% が骨髄由来 MSC であると報告されたが、本研究により MSC により形成される腫瘍間質を標的とした治療の可能性が示された。

さらに MSC と共培養することにより癌細胞において発現が上昇する MT は、アポトーシス、血管新生、増殖、免疫反応に関与することで癌の進展に寄与することが知られている。今後はその機能解析をすることによって癌-MSC 相互作用の分子生物学的機序を解明し、MSC により形成される腫瘍間質を標的とした新しい治療の開発をすすめようと考えている。

## 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 7 件)

1. Kitadai, Y., Kodama, M., Shinagawa, K.: Stroma-directed molecular targeted therapy in gastric cancer. *Cancers*, 3, p4245-4257, 2011. 査読あり
2. Sumida, T., Kitadai, Y., Shinagawa, K.,

Tanaka, M., Kodama, M., Ohnishi, M., Ohara, E., Tanaka, S., Yasui, W., Chayama, K.: Anti-stromal therapy with imatinib inhibits growth and metastasis of gastric carcinoma in an orthotopic nude mouse model *Int J Cancer* 128:2050-2062, 2011. 査読あり

3. Kitadai, Y.: Angiogenesis and lymphangiogenesis of gastric cancer. *J. Oncol.* 2010: Article ID 468725, 2010. 査読あり
4. Kodama, M., Kitadai, Y., Sumida, T., Ohnishi, M., Ohara, E., Tanaka, M., Shinagawa, K., Tanaka, S., Yasui, W., Chayama, K.: Expression of platelet-derived growth factor (PDGF)-B and PDGF-receptor beta is associated with lymphatic metastasis in human gastric carcinoma. *Cancer Sci* 101:1984-1989, 2010. 査読あり
5. Shinagawa, K., Kitadai, Y., Tanaka, M., Sumida, T., Kodama, M., Higashi, Y., Tanaka, S., Yasui, W., Chayama, K.: Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. *Int J Cancer* 127:2323-2333, 2010. 査読あり
6. Tanaka, M., Kitadai, Y., Kodama, M., Shinagawa, K., Sumida, T., Tanaka, S., Oue, N., Yasui, W., Chayama, K.: Potential role for vascular endothelial growth factor-D as an autocrine factor for human gastric carcinoma cells. *Cancer Sci* 101:2121-2127, 2010. 査読あり
7. Kitadai, Y.: Cancer-stromal cell interaction and tumor angiogenesis in gastric cancer. *Cancer Microenviron.* Epub, 2009. 査読あり

[学会発表] (計 4 件)

1. Kitadai, Y., Kodama, M., Sumida, T., Shinagawa, K., Tanaka, S., Chayama, K.: Blockade of PDGFR signaling with imatinib inhibits lymph node metastasis of gastric carcinoma in an orthotopic nude mouse model. Montreal International Symposium on Angiogenesis and Metastasis (MISAM), Montreal, Quebec, Canada, June 15, 2011.
2. Shinagawa, K., Kitadai, Y., Ohnishi, M., Ohara, E., Tanaka, M., Sumida, T., Tanaka, S., Yasui, W., Chayama, K.: Blockade of PDGFR signaling impairs the tumor promoting effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in colon cancer. 102st Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Orland, FL, USA, Apr 3, 2011.

3. Kitadai, Y., Shinagawa, K., Tanaka, M., Sumida, T., Kodama, M., Tanaka, S., Yasui, W., Chayama, K. : Blockade of PDGFR signaling impairs the tumor promoting effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in colon cancer. Joint Metastasis Research Society-AACR conference, Philadelphia, PA, USA, Apr 19, 2010
4. Shinagawa, K., Kitadai, Y., Tanaka, M., Sumida, T., Kodama, M., Tanaka, S., Yasui, W., Chayama, K. : Significance of mesenchymal stem cells in growth and metastasis of colon cancer. 101st Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Washington D.C., USA, Apr 19, 2010

〔図書〕（計 2 件）

1. Kitadai, Y., Shinagawa, K.: Enhanced growth and metastasis of colon cancer: Role of mesenchymal stem cells. Stem Cells and Cancer Stem Cells : Therapeutic Applications in Disease and Injury, Volume 4 (Hayat, M. A., ed), Springer, USA, in press. 2012
2. Kitadai, Y., Kodama, M.: Regulation of lymphangiogenesis in human gastric cancer. Trends in Cancer Research, Volume 7, Research Trends, India: pp87-93, 2011.

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

北台 靖彦 (KITADAI, YASUHIKO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号： 10304437

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3)連携研究者

品川 慶 (SHINAGAWA, KEI)

広島大学・病院・医科診療医

研究者番号： 50623609