

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 28 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590478

研究課題名(和文)がん細胞の運命決定に働く淘汰圧の自己形成と回避の機構

研究課題名(英文) Selective pressure driving cancer cell fate decisions: the mechanism of the creation

研究代表者

板野 直樹 (ITANO, Naoki)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：40257712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、淘汰圧形成の責任分子としてヒアルロン酸(HA)に着目し、淘汰圧下に生じるがん幹細胞の選択的な増幅と回避の機構について研究した。そして、HA過剰産生乳癌では、対照に比してがん幹細胞様細胞が増幅していることをフローサイトメトリー解析により明らかにした。また、HA過剰産生のがん幹細胞の培養上清中には、対照細胞の上清に比べてTNF- $\alpha$ やTGF- $\beta$ の産生が有意に増加していた。以上の結果から、がん幹細胞はHA依存的にTNF- $\alpha$ の産生を促してマクロファージを賦活化し、癌組織内に淘汰圧を形成すること、そして、TGF- $\beta$ の抗腫瘍免疫作用によって、淘汰圧から回避すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have investigated the mechanisms of cancer stem cell (CSC) enrichment under the selective pressure and the way in which CSCs can escape from this pressure. Flow cytometric analysis indicated the enrichment of CSC-like cells in hyaluronan synthase 2 (Has2)-overexpressing cancer cells. We also found that Has2 overexpressing cells produced significantly higher levels of TNF-alpha and TGF-beta than the control cells. Taken together, our findings provided a novel idea that CSCs can create selective pressure via the macrophage activation induced by up-regulating TNF-alpha in a hyaluronan-dependent manner. We further suggest that the anti-tumor immune action of TGF-beta allows cancer cells to escape from the selective pressure.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：がん微小環境 ヒアルロン酸 がん幹細胞 淘汰圧 マクロファージ

### 1. 研究開始当初の背景

がん細胞の淘汰圧に対するしたたかさ(頑健性)は、がん進展を加速し、がん治療を困難にしている主な要因となっている。故に、頑健性の制御と環境の正常化は、がん治療戦略の鍵となる。

淘汰圧が頑健性を高める例として、抗がん剤治療後に残存したがん細胞が、再発・再燃を来たしてがんを急速に進展させる問題が挙げられる。即ち、抗がん剤治療は、強力な淘汰圧として大半のがん細胞を死滅させるが、結果として耐性がん細胞の選択的な増幅を誘起してしまう。特に近年では、残存する細胞集団内でがん幹細胞が濃縮しているという結果が報告されている。

これまで、がん細胞が生存に有利な細胞外環境をその周囲に形成することによって、集団を拡大すると一般に考えられてきた。その一方で我々は、これまでの実験事実に基づき、従来の概念とは対照的に、がん細胞が淘汰圧を自己形成して、自らを不利な環境に置くことで頑健性を高め、集団として拡大を図る機構を新たに提案する。

### 2. 研究の目的

がんを進展させる因子として、がん細胞の適応進化を加速する淘汰圧(環境変化)が挙げられる。例えば、がん細胞は、常に免疫系の攻撃に曝されるが、腫瘍免疫からの回避が、がん細胞集団の生存と悪性化に重要とされる。また、抗がん剤や放射線治療では、耐性を獲得したがん細胞亜集団(特に、がん幹細胞)が選択的に増殖と変化を繰り返して、がんを再発、進展させると考えられている。このような外的要因が、がん細胞の選別に働く機構に加え、本研究では新たに、「がん細胞自らがその生存に不利な環境をがん組織内に形成することで、細胞の淘汰を促進して、集団として拡大戦略を図る」という淘汰圧の自己形成と回避の機構を提案する。そして、淘汰圧形成の責任分子として、細胞外マトリックスの主要成分であるヒアルロン酸に着目し、淘汰圧の形成と回避の分子機構について、その解明を目指す。

### 3. 研究の方法

#### 初代乳癌細胞の樹立

ヒアルロン酸合成酵素2遺伝子のコンディショナルトランスジェニック(Has2 cTg)マウスを用いて、乳癌特異的にヒアルロン酸を過剰産生するマウス群を作製した。マウスに発生した乳癌組織を摘出し、コラゲナーゼ処理により、細胞塊を分散した。細胞懸濁液を培養皿に播種し、トリプシン処理と培養を繰り返した後、培養皿に強固に接着している細胞を乳癌細胞として以降の実験に供した。

#### SP細胞の分離

樹立した初代乳癌細胞を Hoechst 33342 で染色し、Becton Dickinson FACS Vantage セル

ソーター (BD Biosciences)により、弱陽性の細胞集団を SP 細胞として分離した。また、強陽性細胞集団を非 SP 細胞として以降の実験に供した。

#### フローサイトメトリー解析

樹立した初代乳癌細胞を FITC-標識抗 CD24 および PE-標識抗 CD44 抗体と反応させ、洗浄後、冷 1%FBS 含有 PBS に懸濁して、FACS Calibur フローサイトメーターで解析した。

#### ヒアルロン酸測定

初代乳癌細胞の培養上清中に分泌されるヒアルロン酸の濃度測定は、以前の報告に記載された方法に従って実施した(Koyama, H., et al. Am J Pathol 170, 1086-1099, 2007)。

#### 定量 RT-PCR

Murine Has2 遺伝子発現の定量 RT-PCR は、以前の報告に記載された方法に従って実施した(Koyama, H., et al. Am J Pathol 170, 1086-1099, 2007)。Murine TGF- $\beta$  と TNF- 遺伝子発現の定量 RT-PCR は、ABI gene expression analyses (TGF- $\beta$  ; Mm03024053\_m1, TNF- ; Mm00443260\_g1)を用いて、94 °C, 30 秒間の 1 サイクルと 94 °C, 3 秒間と 60 °C, 25 秒間の 40 サイクルで行った。

#### TGF- と TNF- の濃度測定

初代培養乳癌細胞の培養上清中の TGF- $\beta$  と TNF- の濃度は、FlowCytomix Simplex Kits (eBioscience)を用いて、マニュアルに従って測定した。

#### スフェア形成能の測定

SP および非 SP 乳癌細胞を 24 穴 ultralow attachment plates (Corning)に播種し、bFGF, EGF,そして B27 含有血清不含 DMEM 培地中で一週間培養した。スフェア形成は、位相差顕微鏡下で評価した。

#### 造腫瘍能の測定

ヒアルロン酸過剰産生と低産生の SP および非 SP 乳癌細胞を用いて、マウス乳腺上皮周辺の脂肪帯に移植して移植癌を形成した。移植後、腫瘍の長径と短径を継続的に測定した。

### 4. 研究成果

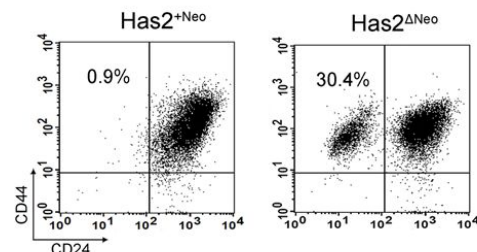


図1. ヒアルロン酸過剰産生乳癌細胞におけるがん幹細胞の増幅

ヒアルロン酸を過剰産生する乳癌発症モデルマウス (Has2<sup>Neo</sup>) と対照マウス (Has2<sup>+Neo</sup>) に発生した乳癌から癌細胞を樹立し、細胞表面における CD44 と CD24 の発現についてフローサイトメトリー解析を行った。その結果、ヒアルロン酸を過剰産

生する乳癌では、対照に比して CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup> がん幹細胞様細胞が増幅していることを明らかにした (図 1)。

さらに、Hoechst 33342 色素の排除能を指標に Side population (SP) 細胞と非 SP 細胞を FACS により分離した (図 2)。SP 細胞の高い色素排除能は、ABC トランスポーター阻害剤の Fumitremorgin C 処理により SP 細胞が消失することから確認できた (図 2)。

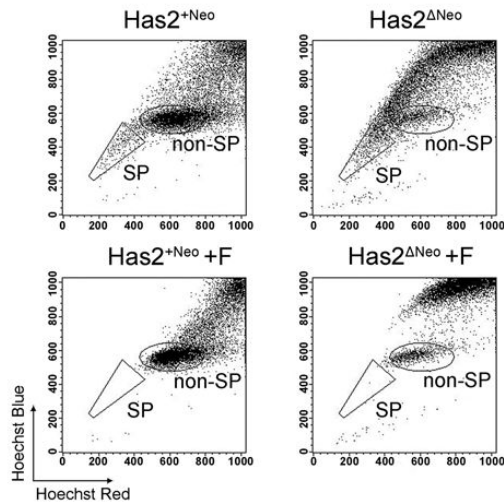


図 2 . SP 細胞の分離  
Fumitremorgin C 処理 (+F)

フローサイトメトリ解析の結果、ヒアルロン酸過剰産生 Has2<sup>Neo</sup> 乳癌由来の SP 細胞中には、CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup> がん幹細胞様細胞が濃縮されていることが明らかとなった (図 3)。

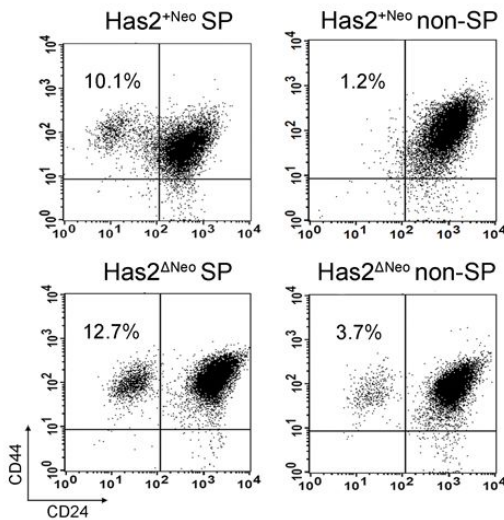


図 3 . SP 細胞と非 SP 細胞中のがん幹細胞の割合

Has2<sup>Neo</sup> と Has2<sup>Neo</sup> 乳癌由来の SP 細胞および非 SP 細胞について、ヒアルロン酸産生能と Has2 遺伝子発現を解析した。Has2<sup>Neo</sup> 乳癌由来の SP 細胞および非 SP 細胞は、何れも高いヒアルロン酸産生と Has2 の発現を示した (図 4)。

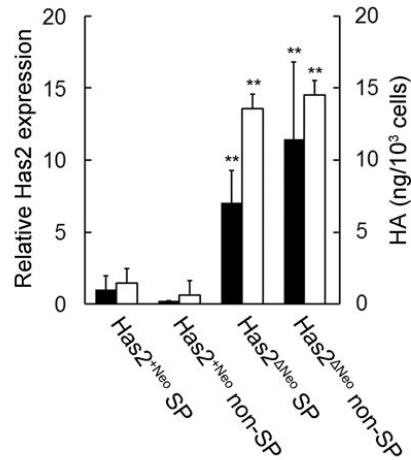


図 4 . SP 細胞と非 SP 細胞のヒアルロン酸産生と Has2 遺伝子発現

がん幹細胞性の指標であるスフェア形成能について、Has2<sup>Neo</sup> と Has2<sup>Neo</sup> 乳癌由来の SP 細胞および非 SP 細胞の間で比較した。各細胞を低血清培地で非接着性の培養皿上で一週間培養して、スフェア形成を位相差顕微鏡下で観察した。その結果、SP 細胞は何れも非 SP 細胞に比して、高いスフェア形成能を示し、さらに、Has2<sup>Neo</sup> SP 細胞は、Has2<sup>Neo</sup> SP 細胞に比して、より高いスフェア形成能を示した (図 5)。

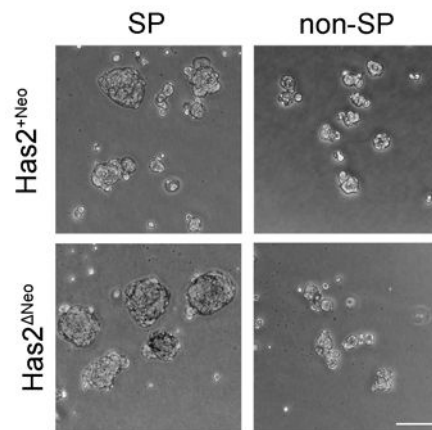


図 5 . SP 細胞と非 SP 細胞のスフェア形成

Has2<sup>Neo</sup> と Has2<sup>Neo</sup> 乳癌由来の SP 細胞をヌードマウスの乳腺脂肪帯に移植後、腫瘍の形成を肉眼にて観察し、腫瘍径を継続的に測定した。その結果、Has2<sup>Neo</sup> SP 細胞は、Has2<sup>Neo</sup> SP 細胞に比して高い造腫瘍能を示した (表 1)。

Has2<sup>Neo</sup> と Has2<sup>Neo</sup> 乳癌由来の SP 細胞および非 SP 細胞について、TNF- $\alpha$  および TGF- $\beta$  の発現量を Beads array 法と qRT-PCR 法により測定した。その結果、Has2<sup>Neo</sup> SP 細胞と非 SP 細胞は、これらの因子について、タンパク質と mRNA の発現において、Has2<sup>Neo</sup> 細胞に比して高値を示した (図 6)。

Cell number	Engraftments	
	Has2 <sup>+Neo</sup> SP	Has2 <sup>ΔNeo</sup> SP
1 x 10 <sup>2</sup>	0/6	0/6
1 x 10 <sup>3</sup>	0/6	4/6
1 x 10 <sup>4</sup>	5/6	6/6
1 x 10 <sup>5</sup>	6/6	6/6

表1 .SP細胞および非SP細胞の造腫瘍性

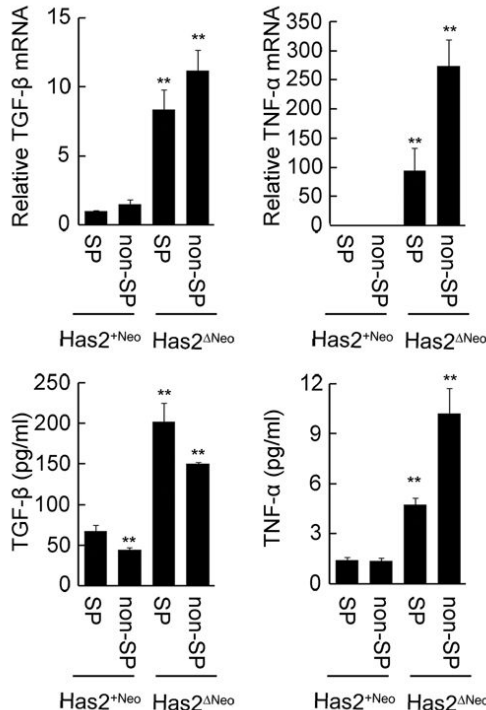


図6 . SP細胞および非SP細胞のTNF-αおよびTGF-βの発現量

以上の結果から、がん幹細胞はヒアルロン酸依存的にTNF-αの産生を促してマクロファージを賦活化し、癌組織内に淘汰圧を形成すること、そして、TGF-βの抗腫瘍免疫作用によって、淘汰圧から回避すると考えられた。

#### 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 5件)

1. 望月信利, 板野直樹: -糖鎖と疾患癌進展におけるヒアルロン酸腫瘍微小環境の役割. 病理と臨床 31, 875-882. 2013
2. Kashima, Y., \*Takahashi, M., Shiba, Y., Itano, N., Izawa, A., Koyama, J., Nakayama, J., Taniguchi, S., Kimata, K., and Ikeda, U. Crucial role of hyaluronan in neointimal formation after vascular injury. PLoS One. 8(3):e58760. 2013.
3. Goncharova, V., Serobyan, N., Iizuka, S., Schraufstatter, I., de Ridder, A., Povaliy, T., Wacker, V., Itano, N.,

Kimata, K., Orlovskaja, I.A., Yamaguchi, Y., and \*Khaldoynidi, S. Hyaluronan expressed by the hematopoietic microenvironment is required for bone marrow hematopoiesis. J. Biol. Chem. 287(30):25419-25433, 2012.

4. Takano, H., Nakazawa, S., Shirata, N., Tamba, S., Furuta, K., Tsuchiya, S., Morimoto, K., Itano, N., Irie, A., Ichikawa, A., Kimata, K., Nakayama, K., Sugimoto, Y., and \*Tanaka, S. Restriction of mast cell proliferation through hyaluronan synthesis by co-cultured fibroblasts. Biol. Pharm. Bull. 35(3):408-412, 2012.
5. Mack, J.A., Feldman, R.J., Itano, N., Kimata, K., Lauer, M., Hascall, V.C., and \*Maytin, E.V. Enhanced inflammation and accelerated wound closure following tetraphorbol ester application or full-thickness wounding in mice lacking hyaluronan synthases Has1 and Has3. J. Invest. Dermatol. 132(1):198-207, 2012.

[学会発表](計 5件)

1. 板野直樹: ヒアルロン酸合成異常と癌の進展. 第32回日本糖質学会年会, 大阪市, 2013.8.6 (シンポジウム)
2. Chanmee, T., Itano, N. Hyaluronan production regulates self-renewal of cancer stem cells. 第22回日本がん転移学会学術集会・総会, 松本市, 2013.7.11
3. Chanmee, T., Konno, K., Kongtawelert, P., Itano, N. Hyperproduction of hyaluronan generate cancer stem-like cells. International Society for Hyaluronan Sciences 9th International Conference (Hyaluronan 2013), Oklahoma City, OK, USA 2013.7.7
4. Itano, N. Impact of the hyaluronan-rich tumor microenvironment on cancer progression. International Society for Hyaluronan Sciences 9th International Conference (Hyaluronan 2013), Oklahoma City, OK, USA 2013.7.6
5. 板野直樹 ヒアルロン酸腫瘍微小環境の形成と癌の進展 第101回日本病理学会総会, 東京, 2012.4.28.

[その他]

ホームページ等

<http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~itanon/index2.html>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

板野 直樹 (ITANO, Naoki)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号: 40257712