

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 30 日現在

機関番号：32666

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650604

研究課題名（和文） 3次元培養での癌幹細胞研究方法の確立

研究課題名（英文） Analysis of cancer stem cells using three dimension culture system

## 研究代表者

松田 陽子 (MATSUDA YOKO)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：20363187

## 研究成果の概要（和文）：

癌幹細胞は癌の増殖、浸潤、転移、治療抵抗性、再発において重要な役割を担う。従来の平面培養では、正確に生体内での状態を再現できないため、癌幹細胞分野の研究は困難をきわめている。本研究では、スフェア培養と生体の血液中の癌幹細胞について検討した。膵癌のスフェア細胞では、細胞増殖の低下、細胞遊走の亢進、マウス腫瘍形成能の亢進、nestin, CD44, ABCG2等の幹細胞マーカーの発現亢進、ephrin 遺伝子の発現亢進が見られた。一方、マウス転移モデルから血液中の腫瘍細胞を採取し、解析したところ、EGFR の発現亢進が認められた。今後さらに、*in vitro*, *in vivo* の癌幹細胞に関する検討を進め、癌幹細胞を効率よく検出する方法の確立を目指す。

## 研究成果の概要（英文）：

Cancer stem cells play important roles on cell growth, invasion, metastasis, resistance to therapy and recurrence. Conventional cell culture methods are limited in their ability to mimic *in vivo* environments exactly. Therefore, it has been difficult to analyze cancer stem cells *in vitro*. In the present study, we compared cancer stem cells in sphere culture system and circulating cancer cells in the blood. Pancreatic cancer sphere cells showed a decrease of cell growth, and an increase of cell migration, tumor formation *in vivo*, expression of stem cell markers such as nestin, CD44 and ABCG2, and ephrin. Circulating cancer cells in mice blood showed an increase of EGFR. Further study is needed to detect and analyze cancer stem cells.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：三次元培養、癌幹細胞、膀胱癌、細胞イメージング

### 1. 研究開始当初の背景

癌幹細胞は癌の増殖、浸潤、転移、治療抵抗性、再発において中心的役割を担っており、近年癌幹細胞に関する研究が世界的規模で広く行われている。癌幹細胞は生体内の環境下では細胞周期の休止期にあるが、周囲の環境や刺激に応じて癌幹細胞の自己複製や分化した癌細胞への変化、及び増殖を起こす。従来の細胞培養法では平面のディッシュ内で癌細胞のみを培養し、実験に用いることが多いが、癌幹細胞の制御には周囲環境である癌幹細胞のニッチが重要な役割を担っている。通常の培養方法での検討では、正確に生体内での状態を再現できず、統一した見解が得られないため、癌幹細胞分野の研究は困難をきわめていると考えられる。

実際には *in vitro* ではプラスチックやガラスのディッシュ上で癌細胞のみを培養し、増殖や浸潤、転移を検討する実験が、簡便であるため広く行われている。しかし癌細胞の平面培養では生体内の状態を再現することが難しいため、様々な方法が工夫され、癌細胞と線維芽細胞や血管内皮細胞との共培養法や、細胞外基質を利用した3次元培養法の有用性が報告されている。平面培養では培養細胞が単層のシート状に増殖するのに対し、3次元培養法では培養細胞が立体的に増殖し、さらに平面培養に比べ3次元培養では遺伝子発現やタンパク質発現パターンが生体内の結果と類似しているという報告が数多く成されている。本研究では3次元培養における癌幹細胞の動態や生体内での変化について明らかにする。

### 2. 研究の目的

癌幹細胞を分離し採取しても、通常の培養環境下では分化してしまい、生体内の環境とは大きく異なる状態での現象だけしか捉える事ができない。本研究では、3次元培養下と、生体内環境における癌幹細胞の動態や癌幹細胞の保持について解明する。従来の培養法では解明することが困難であった癌幹細胞の生体内での動態について、簡便、詳細に究明する方法の確立を目指す。本研究により、癌幹細胞を標的とした抗癌剤や分子標的治療薬の研究を *in vitro* で正確、簡便に行なうことが可能となり、その影響は広範囲に波及すると考えられる。

### 3. 研究の方法

無血清培地にて細胞を低接着プレートに播種し、epidermal growth factor (EGF), basic fibroblast growth factor (bFGF) を添加し、培養すると形成されるスフェアには幹細胞が濃縮されていることが報告されている。癌幹細胞においても、スフェア培養法が広く用いられている。ヒト膀胱癌培養細胞株 PANC-1, KLM-1, MIAPaCa-2, PK-45H を用い、培養細胞をスフェア培養の条件で培養した。スフェアを採取し、非スフェア細胞との増殖、遊走、腫瘍形成能の比較検討を行った。また、癌幹細胞マーカーの発現の変化について、PCR および蛍光染色法で確認した。

次に、マウス転移モデルを用いて、血液から腫瘍細胞を採取した。循環血液中腫瘍細胞は生体内での特殊な癌幹細胞と考えられており、遠隔転移の原因となる。マウスから

採取した循環血液中腫瘍細胞、およびスフェア培養の細胞について、DNA microarray にて遺伝子発現変化を比較した。

#### 4. 研究成果

低接着プレートを用いたスフェア形成法を用いて、ヒト膀胱癌培養細胞を培養すると、スフェアの形成が確認された。スフェア形成細胞は、非スフェア細胞にくらべて、細胞増殖の低下、細胞遊走の亢進、マウス腫瘍形成能の亢進を示した。共焦点顕微鏡にて、スフェア形成細胞では、nestin, CD44, CD133, CD24, ESA といった様々な癌幹細胞マーカーの発現が確認された。PCR にて、スフェア形成細胞では、非スフェア細胞に比べて、nestin, CD44, ABCG2 の発現亢進を認めた。さらに、short hairpin RNA (shRNA) を用いて nestin の発現を knockdown した膀胱癌細胞では、スフェア形成能の低下が観察された。

次に、スフェアで見られる細胞内の変化を網羅的に確認するため、DNA microarray を用いて検討を行った。その結果、スフェア細胞では、ephrin 遺伝子の発現亢進が見られた。Ephrin は受容体型チロシンキナーゼ (ephrin 受容体) のリガンドとなり、正常の幹細胞において重要な役割を担うことが報告されており、癌幹細胞と幹細胞との関連が示唆される結果と考えられる。

次に、生体内での癌幹細胞とスフェア細胞の特徴を比較検討するため、マウス転移モデルを作成した。循環血液中腫瘍細胞は、遠隔転移の直接的な原因となる細胞であり、幹細胞性と上皮間葉転換の両方の機能が関与していることが報告されているため、膀胱癌のマウス転移モデルから血液中の腫瘍細胞を採取した。DNA microarray を用いて遺伝子変化について網羅的に解析したところ、循環血液中腫瘍細胞では EGFR 発現亢進が認められた。

今後、さらに in vitro, in vivo の癌幹細胞の性質や遺伝子変化、及び臨床検体を用いた検討を進め、癌幹細胞を効率よく検出することが可能な方法の確立を目指す。

#### 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 6 件)

1. Akiyama M, Matsuda Y, Ishiwata T, Naito Z, Kawana S: Nestin is highly expressed in advanced stage of melanoma and neurotized nevi. *Oncol Rep*, in press, doi: 10.3892/or.2013.2287.
2. Akiyama M, Matsuda Y, Ishiwata T, Naito Z, Kawana S: Inhibition of the stem cell marker nestin reduced tumor growth and invasion of malignant melanoma. *J Invest Dermatol*, Epub ahead of print, doi: 10.1038/jid.2012.508.
3. Matsuda Y, Hagio M, Ishiwata T: Nestin: A novel angiogenesis marker and possible target for tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol* 2013, 19:42-48, doi: 10.3748/wjg.v19.i1.42.
4. Matsuda Y, Hagio M, Naito Z, Ishiwata T: Clinicopathological features of 30 autopsy cases of pancreatic carcinoma. *J Nippon Med Sch* 2012, 79:459-467
5. Matsuda Y, Hagio M, Seya T, Ishiwata T: Fibroblast growth factor receptor 2 IIIc as a therapeutic target for colorectal cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2012, 11:2010-2020, doi:

10.1158/1535-7163.MCT-12-0243.

6. Matsuda Y, Kure S, Ishiwata T: Nestin and other putative cancer stem cell markers in pancreatic cancer. Med Mol Morphol 2012, 45:59-65, doi: 10.1007/s00795-012-0571-x.

[学会発表] (計 5 件)

1. 松田陽子. 膵癌転移巣における癌幹細胞および上皮間葉転換マーカーの発現. 第 70 回日本癌学会. 札幌, 2012/9/19-21
2. Matsuda Y, et al. Nestin regulating molecule network in pancreatic cancer. Pancreas Cancer 2012. Kyoto, 2012/10/4-6
3. Matsuda Y, et al. EMT and stemness in human pancreatic cancer cells derived from metastatic foci of NOD/Shi-scid, IL-2  $\gamma$  null (NOG) mice. 18th International Heidelberg Symposium on Cancer Research. Germany, 2012/6/28-30
4. Matsuda Y, et al. Nestin regulates stem cell functions of pancreatic cancer cells. American association for cancer research annual meeting 2012. Chicago, 2012/4/1-4
5. Matsuda Y, et al. Metastatic pancreatic cancer cells and stemness. American pancreatic association meeting. Chicago, 2011/11/3

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松田 陽子 (MATSUDA YOKO)  
日本医科大学・医学部・講師  
研究者番号 : 20363187

### (2) 研究分担者

なし ( )  
研究者番号 :

### (3) 連携研究者

なし ( )  
研究者番号 :