

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791514

研究課題名(和文) 癌幹細胞様細胞を狙ったNotchシグナル阻害による胆道癌新規分子標的治療の確立

研究課題名(英文) Establishment of novel targeted therapy by inhibition of Notch signaling pathway in biliary tract cancer

研究代表者

水間 正道 (Mizuma, Masamichi)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：80578675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：各種悪性腫瘍においてNotchシグナルの関与が報告されておりNotchシグナルを標的とした新規がん治療に期待が寄せられているが、胆道癌にNotchシグナルが関与するか否かは明らかになっていない。本研究で、肝外胆管癌切除標本においてNotchシグナル関連因子を免疫組織化学において検討したところ、Notchシグナル関連因子を発現している症例を認めた。本研究結果から肝外胆管癌にNotchシグナルが何らかのかたちで関与していることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：Although Notch signaling pathway is related to various malignancies, it is unclear whether it influences cancer of the biliary tract. In the present study, it was clarified that expression of Notch signaling pathway proteins in immunohistochemistry was seen in some resected cases with extrahepatic cholangiocarcinoma. The results of this study suggest influence of Notch signaling on extrahepatic cholangiocarcinoma.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：Notch 癌幹細胞様細胞 胆管癌

1. 研究開始当初の背景

Notch シグナル系の異常な活性化は膵臓癌や大腸癌の消化器癌、肺癌、白血病をはじめ様々な悪性腫瘍の initiation や maintenance に重要な関わりを持つことが認められており、さらには、従来の化学療法や放射線療法に治療抵抗性で発癌や転移に関与しているとされる癌幹細胞様細胞と Notch シグナル系との関連も各施設から報告されている。それゆえ、Notch シグナル系を標的とした癌治療は、癌幹細胞様細胞に効果がある可能性があり、従来の抗癌剤とはコンセプトが異なり癌治療分野に新展開を開くものと期待されている。最近、白血病や膵臓癌における Notch シグナル阻害薬 (セクレターゼ阻害薬) の有効性の報告も散見されるようになってきた。申請者は平成 20 年 5 月から平成 22 年 3 月まで Johns Hopkins University の病理学講座に在籍、Dr. Anirban Maitra の主催するラボで Notch シグナル系を標的とした膵臓癌治療をテーマに研究してきた。

申請者は、これまでに胆道癌においては Notch シグナルが関与するか否かを過去に研究して報告したものはいないことに注目し、胆道癌は他の消化器癌と比較して、従来の化学療法や放射線療法に治療抵抗性であり、外科的切除以外には有効な治療法はなく、新た

な治療法の開発が渴望されているという現状から、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、Notch シグナル系が胆道癌で異常をきたしているか？異常をきたしているならば、Notch シグナルを阻害することは、胆道癌に有効か？を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) preliminary study

本研究の最終的目標は Notch シグナル阻害が癌幹細胞様細胞を標的とし胆道癌治療に有効か否かを基礎的及び異種移植腫瘍モデルで検討することであるが、異種移植モデル腫瘍における癌幹細胞様細胞や影響を受ける癌微小環境を検討するにあたり、異種移植腫瘍塊から癌細胞と癌間質細胞の分子生物学的解析が必要となる。しかし、そのためには、異種移植腫瘍塊から癌細胞と癌間質細胞を互いに混入することなく高精度に両者を分離・回収する方法を確立することが必要である。それゆえ、Preliminary study として、全身蛍光免疫不全マウスである NOG-EGFP マウスを用いることで、異種移植腫瘍塊から癌細胞と癌間質細胞を宿主由来である癌間質細胞の蛍光性を利用してフローサイトメトリにより分離できるか検討した。具体的に

は、NOG-EGFP マウスに胆管癌細胞株 TFK-1 を皮下移植し腫瘍を形成・増大させた後に、腫瘍を摘出した。摘出後、迅速に細切し、コラゲナーゼ添加培地で 30 分培養し単細胞化させた。この単細胞化したサンプルをフローサイトメーターを用いて eGFP 陽性細胞の分布を確認し、癌細胞のソーティングを施行した。ソーティングし分離・回収した癌細胞集団における癌間質細胞の混入率をフローサイトメーターにて検討した。以下の表面マーカー、CD11c (樹状細胞)、CD14 (マクロファージ)、CD49 (ナチュラルキラー細胞)、CD31 (血管内皮細胞)、CD90 (線維芽細胞)を用いて癌間質細胞を構成する種々の細胞混入率を評価した。

フローサイトメーターでソーティングされた癌細胞のバイアビリティーが低下することが予想されたが、これまで分離・獲得した癌細胞のバイアビリティーを検証した報告はみられなかったため、分離・回収した癌細胞は細胞培養が可能であるか、腫瘍形成能には変化があるかを検討した。実際には、TFK-1 細胞の異種移植腫瘍片をコラゲナーゼ処理して単細胞化させ、フローサイトメーターで分離し癌細胞集団を回収した。回収した癌細胞を通常の培養条件でディッシュ上で培養、増殖させた。増殖後に、NOG-EGFP マウ

スに 5×10^5 /匹の個数で再び背部皮下に移植し腫瘍形成能を検討した (n=6)。対照として非ソーティングの通常に培養された TFK-1 細胞を用いた (n=6)。

(2) 胆道癌への Notch シグナルの関与

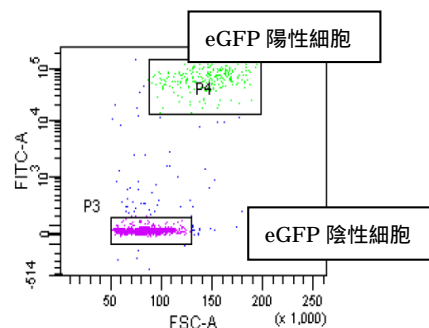
Notch シグナル系の発現と胆道癌との関係を検討するために、当科で過去に切除したホルマリン固定された外科切除標本のパラフィンブロックを用い、Notch シグナル受容体である Notch1、Notch2、Notch3、Notch4 の発現を免疫組織化学にて検討した。対照は、減黄処置や総胆管拡張のない膵神経内分泌腫瘍で膵頭十二指腸切除が施行された症例の正常総胆管 5 例とした。

4 . 研究成果

(1) preliminary study

フローサイトメーターにより、TFK-1 異種移植腫瘍をコラゲナーゼで単細胞化したサンプルは eGFP 陽性細胞と eGFP 陰性細胞の 2 集団に明瞭に識別された (図 1)。

図 1 :NOG-EGFP マウスにおける TFK-1 異種移植腫瘍のソーティング



理論上、eGFP 陽性細胞集団はマウス由来の間質細胞であり、eGFP 陰性細胞集団は TFK-1 細胞である。分離・回収した eGFP 陰性細胞集団におけるマウス由来間質細胞の混入率は、CD11c (樹状細胞):0.4%、CD14 (マクロファージ):1.7%、CD49 (ナチュラルキラー細胞):1.6%、CD31(血管内皮細胞):0.9%、CD90 (線維芽細胞):0.4%であった。完全には間質細胞を除去できてはいなかったが、以前に全身蛍光免疫不全マウスである NOD/SCID EGFP マウスを用いて癌細胞と間質細胞の分離を検討した Niclou らの報告¹⁾よりも間質細胞混入度は同等ないしそれ以下であることが示された(Niclou らの報告では、CD11c:1.3%、CD14:1.8%、CD49:1.7%、CD31:0.3%、CD90:2.6%)。

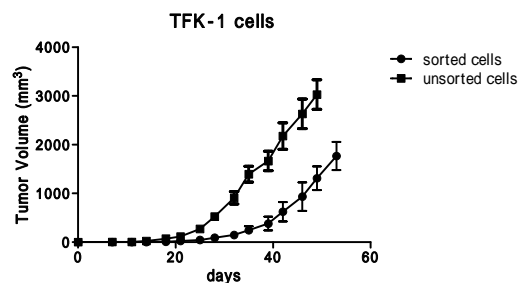
ソーティングして分離・回収した TFK-1 細胞の培養を試みたところ、形態と増殖能は保たれていた。また、このソーティング後に培養で増殖した TFK-1 細胞の腫瘍形成能を検討したところ、腫瘍形成が確認されたが、皮下移植から腫瘍形成開始までの期間は、非ソーティングの対照と比較すると長くなっていた(図2)。ソーティングによりバイアビリティは少なからず影響を受けるものの、細胞培養で増殖し、その後の異種移植で腫瘍を形成しうるバイアビリティは保たれている

ことが明らかとなった。以上から NOG-EGFP マウスを用いた癌細胞の高純度分離回収法は有用であり、今後の Notch シグナルを含めた癌細胞と癌微小環境の相互作用の研究に応用できる研究成果が得られた。

参考文献

1) Niclou SP, Danzeisen C, Eikesdal HP, et al: A novel eGFP-expressing immunodeficient mouse model to study tumor-host interactions. FASEB J. 22: 3120-3128, 2008

図2 : 文献 Shima K et al より引用



(2) 胆道癌への Notch シグナルの関与

対照とした膵神経内分泌腫瘍症例の正常総胆管5例ではNotch1、Notch2、Notch3、Notch4、の発現をいずれも認めなかった。肝外胆管癌においては Notch1、Notch2、Notch3 の発現を認める症例があり、Notch シグナルが何らかのかたちで肝外胆管癌に関与していることが示唆された。

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1件)

Shima K, Mizuma M, et al: Potential utility of eGFP-expressing NOG mice (NOG-EGFP) as a high purity cancer sampling system. 査読有、J Exp Clin Cancer Res. 2012 Jun 6;31:55. doi: 10.1186/1756-9966-31-55.

研究代表者：corresponding author

〔学会発表〕(計3件)

嶋健太郎、水間正道、ほか：蛍光NOGマウスの異種移植モデルを用いた高純度癌細胞サンプリングシステム、第113回日本外科学会定期学術集会、2013年4月13日、福岡

Shima K, Mizuma M, et al: Utility of xenograft models using NOG-eGFP mice for a high quality sampling system of Pancreato-Biliary cancer cells、International Hepato-Pancreato Biliary Association 2012, 2012年7月3日、Paris, France,

嶋健太郎、水間正道、ほか：An attempt to establish a high quality sampling system of cancer cells using a xenograft model of NOG-EGFP mice、第70回日本癌学会学術集会、2011年10月3日、名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水間 正道 (Mizuma, Masamichi)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号：80578675