

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591017

研究課題名(和文) 三次元培養システムを用いたヒト膵癌幹細胞初代培養系の確立

研究課題名(英文) Investigation of primary culture system for pancreatic cancer stem cells

研究代表者

樋口 肇 (Hajime, Higuchi)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：20306682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：マトリゲルを用いた3次元培養法により、膵癌細胞の長期維持、培養に成功した。膵癌細胞中には、癌幹細胞マーカーであるCD44スプライズバリエントを強発現する細胞群が豊富に含まれていた。膵癌細胞と間葉系幹細胞との共培養系においては、膵癌細胞におけるside population (SP) 細胞分画における、各種癌幹細胞マーカーの発現増強が確認された、膵癌SP細胞の腫瘍形成能および上皮間葉転換(EMT)増強されていることが明らかになった。本研究の成果により、膵癌幹細胞の性質をIn Vitro培養系で解析することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：Primary culturing or long-term culturing of pancreatic cancer tissue is important technology for the study of cancer biology and investigation of molecular specific treatment strategy. We performed long-term culturing of primary pancreatic cancer tissue using matrigel 3D culture system. The pancreatic cancer cells were enriched with CD44-sprize variant-positive cells, so-called cancer stem cell-like population. In addition, we found that co-culturing of pancreatic cancer cells with mesenchymal stem cells (MSCs) enhanced cancer stem cell-like properties as well as epithelial-to-mesenchymal transition within the cancer cells. The matrigel 3D culture system or co-culturing with MSCs is an attractive technology for in vitro analysis of cancer biology.

研究分野：腫瘍学

キーワード：癌幹細胞 上皮間葉転換 CD44 膵癌 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

近年の癌治療の発展により、消化器癌の分野においてもその治療成績は向上しつつある。奏効率の改善と生存期間の延長は相関関係にあり、より治療効果の高い薬剤の開発と生存期間の延長が期待されている。膵癌においても、Gemcitabine、TS-1、Erlotinibなどの新規の薬剤の導入により、その治療成績は近年改善してきている。しかしながら、癌治療の最終目標は手術例・非手術例ともに癌細胞の根絶・根治であることは言うまでもなく、その意味ではいまだ治療成績は満足できるものではない。根治的手術後の再発や薬物治療に対する抵抗性、腫瘍焼失後の再発・転移は、ごく少数の腫瘍細胞の残存によって引き起こされるとされており、癌治療における大きな課題である。近年、腫瘍中にごく少数存在する癌幹細胞と呼ばれる細胞が、治療抵抗性、再発、転移を担うことが複数の研究により示唆されており、これらの癌幹細胞を標的とした治療戦略の構築が求められている。

癌幹細胞は、高い腫瘍形成能と増殖のポテンシャルを有する一方、非幹細胞へと分化する能力を持ち、癌の進展に寄与する。非幹細胞は、一定の増殖能を持つもののそのポテンシャルは有限で、幹細胞を持たない細胞集団は腫瘍を形成することが出来ないとされている。また、癌幹細胞は多くの抗癌剤に対して抵抗性であり、腫瘍の再発や転移に関与することが示唆されている。従って、癌幹細胞の持つ治療抵抗性に対してそれを標的とした治療を行うことにより、癌幹細胞を効率よく減少させるだけでなく、薬物治療の奏効率の改善をもたらす、さらには根治の可能性を高めることとなる。

これらの癌幹細胞の持つ性質を規定する因子としては、Wnt/ β -catenin系シグナル、Notchシグナル、Hedgehogシグナルなどを中心とした幹細胞特異的シグナル伝達機構

や様々な増殖因子・サイトカインシグナルなどが同定されており、これらを標的とした治療が開発されつつある。しかしながら、消化器癌における幹細胞制御の中心を担う因子の同定や複数のシグナルのクロストークの解析など、いまだ解明すべき問題は多く、有効な癌幹細胞標的治療は確立されていない。とくに、癌幹細胞における薬剤抵抗性機構や、転移・再発の分子学的機序に関しては、不明な点が多い。これらの問題を解明するためには、癌幹細胞を長期間維持するための *in vitro* 培養法が極めて有用であり不可欠と考えられるが、いまだ有効な培養法は存在しない。

2. 研究の目的

本申請研究の目的は、ヒト膵癌における癌幹細胞の同定、機能解析を効率的に行うための、*in vitro* 初代培養系を確立することである。癌幹細胞を標的とした新規抗腫瘍薬剤のスクリーニングあるいは薬剤感受性試験には、比較的長期間の *in vitro* 細胞培養が不可欠であるが、現在のところ消化器腫瘍組織に対しての効率の良いシステムは存在しない。本研究では消化器癌の中でも特に予後不良である膵癌を対象とし、臨床検体由来の組織を用いて癌幹細胞の機能を評価可能な長期培養系を構築し、その培養系における癌幹細胞の機能を評価・検証する。Matrigelを用いた三次元培養法を導入することにより、長期に安定した培養系が可能であると考えている。

3. 研究の方法

(1) 三次元培養法による膵癌組織初代培養系の確立

膵癌組織ならびに随伴する非癌部膵組織をコラゲナーゼ処理後、collagen enriched-Matrigelへ包埋、培養した。培養条件は無血清、bFGF 20 ng/ml、EGF 20 ng/ml、HGF 5 ng/ml、R-spondin-1 500

ng/ml、BSA 1.8%、Wnt3A 100 ng/ml を基本条件とし、さらに詳細な条件検討を行った。また、膵組織、膵癌組織の増殖・分化に関わる因子として、Wnt/ catenin シグナル、Notch シグナル、hedgehog シグナルに着目し、これらに対するリガンド添加・除去により、幹細胞時培地あるいは分化誘導培地としての培養条件の確立を行った。

(2) 間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell, MSC)との共培養系における膵癌幹細胞の解析

癌幹細胞の維持、増殖、分化調節には間葉系細胞との相互作用によりもたらされる細胞外微小環境によるシグナル調節が重要であることが知られている。そこで、間葉系幹細胞を膵癌細胞と共培養することにより、より効率の高い、癌幹細胞培養系の構築を検討した。ヒト骨髄より間葉系幹細胞を分離、培養し、膵癌細胞 5×10^4 個に対して間葉系幹細胞 1×10^5 個を共培養した。

(3) 培養により得られた膵癌組織における膵癌幹細胞様性質の検証

得られた培養膵組織を用いて、膵癌幹細胞マーカーの発現状態 (CD133、CXCR4、ESA、CD24、CD44 など) に対する免疫染色法を行い、癌幹細胞マーカー陽性分画と陰性分画での比較検討を行い、癌幹細胞としての性質が維持されているか否かを検討した。

In Vivo 腫瘍形成能 得られた細胞分画を NOD-SCID マウス皮下に移植し、腫瘍形成能を比較検討する。Serial dilution 法により、腫瘍形成のために必要な最低細胞数を算定し、癌幹細胞分画及び非幹細胞分画において比較する。一部の細胞においては、NOD-SCID マウス腹腔内への細胞注入投与により、腹膜播種結節の形成能を検討する。

転移、浸潤能の評価 浸潤能の評価として Matrigel を用いた局所浸潤能の評価を行う。また、転移能に関しては、

NOD/SCID マウスを用い、癌細胞脾臓局注による肝転移モデルおよび腹腔内投与による腹膜転移モデルを用いて評価を行う。また、転移・浸潤に重要なステップとなる上皮間葉間転換 (Epithelial to mesenchymal transition, EMT) についても検討した。

Side Population (SP)法 幹細胞における ABC トランスポーター蛋白の発現レベルが非幹細胞に比べて高いことを利用し、特異的蛍光色素 Hoechst33342 の色素排泄能を指標に幹細胞分画の分離・同定を行う。Hoechst33342 で incubate したのち、flowcytometry により色素染色性の異なる SP 分画を同定、分離する。SP 分画の検証には、ABC トランスポーターの阻害剤 recerpine により SP 分画が消失することを持って行う。

幹細胞特異的分子シグナルによるレポーター遺伝子 sorting 法 幹細胞における未分化性維持にかかわる分子シグナルとして、Wnt/ β -catenin および notch シグナルを用いる。申請者らは既に、これらのシグナル応答遺伝子のプロモーター領域に蛍光レポーター蛋白 GFP を結合したレポーター遺伝子の発現ベクターを作成した (安定発現陽プラスミドおよびレトロウイルスベクター)。これらの感染細胞を用い、Wnt/ β -catenin あるいは notch シグナルが active の細胞集団を flowcytometry による sorting により分離する。

4 . 研究成果

マトリゲルを用いた 3 次元培養法により、膵癌細胞の長期維持、培養に成功した (図 1)。得られた膵癌細胞、組織中には、癌幹細胞マーカーである CD44 のうち、特異的なスプライズバリエーションを強発現する細胞群を豊富に含んでいることが免疫染色法、フローサイ

トメトリ法、real time PCR 法により確認された。

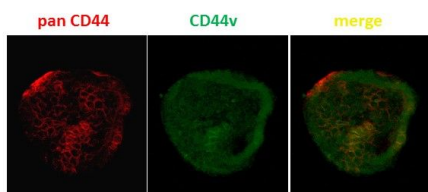


図1 膵癌細胞3次元培養におけるCD44分子の発現

膵癌細胞と間葉系幹細胞との共培養系においては、膵癌細胞における side population (SP) 細胞分画における、各種癌幹細胞マーカー (CD133, LGR5) ならびに幹細胞関連遺伝子群 (Oct4, Nanog, KLF4) の発現増強が確認された(図2)。さらに、間葉系幹細胞との共培養によって、膵癌 SP 細胞の腫瘍形成能が増強されることが明らかになった(図3)。また、これらの性質は、膵癌細胞における上皮間葉間転換 (EMT) と密接にリンクしていることが示唆され、その調節には、MSC 由来の Jagged-1 による膵癌細胞への Notch シグナル誘導により引き起こされていることが、レポーターアッセイ並びに Notch 阻害剤 DAPT を用いた検討により明らかになった。

本研究の成果により、膵癌幹細胞の性質を In Vitro 培養系で解析することが可能となった。また、膵癌幹細胞の調節に Notch シグナルを介した EMT の調節が重要であることが明らかになった。本研究は、膵癌幹細胞を標的とした新たな治療戦略の構築に示唆を与える重要な研究であると考えられた。

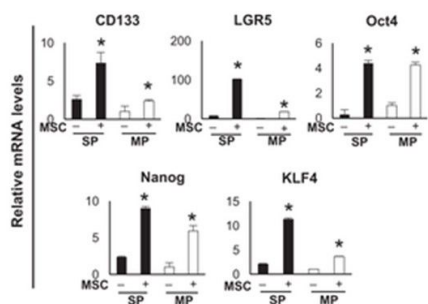


図2 MSCとの共培養による膵癌幹細胞関連分子の発現

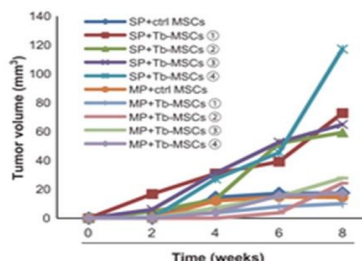
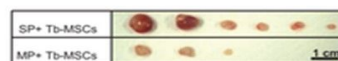


図3 MSCとの共培養による膵癌SP細胞腫瘍形成能

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Kabashima-Niibe A, **Higuchi H**, Takaishi H, Masugi Y, Matsuzaki Y, Mabuchi Y, Funakoshi S, Adachi M, Hamamoto Y, Kawachi S, Aiura K, Kitagawa Y, Sakamono M, Hibi T. Mesenchymal Stem Cells Regulate Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Tumor Progression of Pancreatic Cancer Cells. **Cancer Sci.** (査読有り) 104(2): 157-164, 2013

〔学会発表〕(計 1 件)

1. Kabashima-Niibe A, **Higuchi H**, Matsuzaki Y, Mabuchi Y, Funakoshi S, Adachi M, Hamamoto Y, Takaishi H, Hibi T. Mesenchymal stem cells mediate epithelial to mesenchymal transition (EMT) and stemness regulation in pancreatic cancer via notch signal. **American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting, 2013** April 6-10, Washington DC

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

6．研究組織

(1)研究代表者

樋口 肇 (HIGUCHI, Hajime)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：20306682

(2)研究分担者

佐藤 俊朗 (SATO, Toshiro)

慶應義塾大学・医学部・特任准教授

研究者番号：70365245

(3)連携研究者

なし