

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659600

研究課題名(和文) 腹膜播種における腹腔内癌幹細胞の同定

研究課題名(英文) Cancer stem cell for peritoneal metastasis in abdominal cavity

研究代表者

石神 浩徳 (Ishigami, Hironori)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80372382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：CD90陽性の腹腔内間葉系幹細胞は腹膜局所における線維化や免疫抑制を介して癌細胞の生育に好都合な微小環境を提供することによって腹膜播種の成立を促進する働きを有しており、この腹腔内間葉系幹細胞は、播種における環境因子として癌の幹性と密接な関連を有していることが推測された。また、フローサイトメトリーを用いた腹腔内遊離細胞中のCD326陽性細胞の算定は「生きた」状態の腹腔内遊離癌細胞量や播種病変の活動性を良く反映し、播種患者の予後や化療に対する効果を判定する上で極めて臨床的有用性の高いバイオマーカーになる。

研究成果の概要(英文)：We found that a minor subset of human intraperitoneal free cells with CD90+CD45- displayed the characteristics of mesenchymal stem cell, and differentiated into myofibroblast by the stimulation with TGF $\beta$ , and intraperitoneal coinjection of with MKN45 significantly enhanced the rate of metastatic formation in the peritoneum of nude mice. Histological examination revealed that many MSC were engrafted in metastatic nodules and were mainly located at the fibrous area. Dasatinib, a tyrosine kinase inhibitor, strongly inhibited the proliferation of MSC but not MKN45 in vitro. Nevertheless, oral administration of Dasatinib significantly inhibited the development of peritoneal metastasis of MKN45, and resulted in reduced fibrillar formation of metastatic nodules. The rate of CD326+ tumor cells measured with FACS could be a reliable diagnostic biomarker to determine the severity of peritoneal metastasis as well as effectiveness of chemotherapy.

研究分野：医歯薬系

科研費の分科・細目：消化器外科学

キーワード：腹膜播種 幹細胞 フローサイトメトリー

### 1. 研究開始当初の背景

腫瘍学における癌幹細胞 (Cancer Stem Cell) の重要性について、数多くの研究成果が報告されてきている。しかし、癌幹細胞の性質に関する一定の共通概念は存在するが、その内容は個々の実験系、研究者間で著しく異なり、幹性の実態については十分に把握されていない。近年、癌の発育、進展には、癌細胞自体の幹細胞性ととともに、それを取り巻く微小環境 (micro-environment) が極めて重要な役割を果たしていることが提唱されてきている。したがって、多分化能を有する癌幹細胞でも、その生育に好都合な環境に存在して初めて、「がん」という組織、器官に発育すると考えれば、環境によって、癌幹細胞も性格的に大きく異なる可能性があると考えられる。一方、腹腔は人体内に存在する最大の空間であり、解剖学的、生理学的に極めて特殊な環境であり、腹膜播種、特に胃癌、膵臓癌などの低分化癌の播種は、腹腔内に無数の播種巣を形成するが、この腹膜播種に特化した癌幹細胞に関する情報は少ない。

### 2. 研究の目的

胃癌・大腸癌の腹膜転移を有し、外科的治療を要する患者において、癌性腹水ないし腹腔内洗浄液中を採取し、細胞成分を分離、その表面抗原の解析し、癌細胞、免疫細胞、間葉系細胞に特有の抗原を同時に発現する細胞成分を分離、その細胞成分の比率を検討し、臨床におけるバイオマーカーになりうるかどうかを検討する。また、1~3週間培養後各細胞集団における幹細胞性を *In vitro* の生物学的実験にて検討する。次に、ヌードマウスを用いた造播種性を定量し、ヒト腹腔内に存在するこの細胞の幹性を *In vivo* にて同定する。さらに、様々な分画の白血球や腹腔内間葉系細胞と癌細胞とを共培養し、融合細胞を分離、この細胞の性質を詳細に検討する。最後に、マウスモデルを用いて同条件の実験を行い、腹膜播種の成立におけるこの融合細胞の幹細胞性を確認する事を最終目的とする。

### 3. 研究の方法

腹腔内細胞の phenotype 解析：外科的手術ないし腹水を過濃縮再静注法 (CART) を行

う腹膜胃癌・大腸癌患者由来の腹水ないし腹腔内洗浄液から細胞成分を分離し、免疫系・上皮系マーカーにて多重染色し、相方の抗原を有する細胞同定し、FACSにて分離、培養することによって、腹腔内に存在する細胞の性質を同定する。次にその細胞を用いて様々な形で癌細胞と共培養し、癌幹細胞性の獲得について検討する。

### 3. 研究成果

胃癌患者および肝硬変患者計 243 名より、のべ 380 の腹水/洗浄液サンプルを手術時または腹腔穿刺時、腹腔内化学療法 (IP) を施行した患者では化療の各クール前に腹腔ポートより採取した。Ficoll による遠心後、中間層の細胞群を FITC 標識抗 CD45 抗体および PE 標識抗 EpCAM (CD326) 抗体にて染色、その発現を FACS にて検討した。7AAD (+) の死細胞を除去した細胞分画が 104 以上得られた症例にて、CD326 (+) / CD45 (-) 細胞を遊離癌細胞 (T) と規定、CD45 (+) / CD326 (-) の血球細胞 (L) との細胞数比 (TLR) を算出した。FACS profile では、遊離癌細胞 (T) は L と比べ FSC, SCC ともに高値を示し、より大型で顆粒に富む細胞集団として特定された。播種陽性胃癌 281 例の TLR は Median (M) = 0.19% で、P0 胃癌 77 例 (M=0%, 0-0.30%)、LC22 例 (M=0%, 0-0.028%) に比し有意に高値を示したが ( $p < 0.001$ )、その値は 0%-1868.44% と個々の症例により大きな差異を認めた。また、P1 例のうち、CY1 168 例の TLR は M=1.33% (0-1868.44%) で CY0 113 (M=0%, 0-1.13%) より有意に高く ( $p < 0.001$ )、CEAmRNA (+) 117 例の TLR は CEA mRNA (-) 56 例より有意に高かった (M=0.13%, 0-299.53% vs M=0%, 0-0.94%,  $p < 0.01$ )。P0 胃癌、LC の症例のうち大部分は TLR=0% であったが、P0 胃癌 19 例 (25%)、LC 例 3 例 (14%) で CD326 (+) / CD45 (-) のフェノタイプを持つ癌細胞が検出された。また、Paclitaxel IP 治療を施行した 64 症例を、治療前の TLR > 10% (n=12), 1% < TLR < 10% (n=18), TLR < 1% (n=34) の三群に分けると、それぞれの生存中央値はそれぞれ 271 日, 394 日, 765 日となり、初発時の TLR は予後と有意な相関を示した。さらに、IP 治療を施行した症例毎の検討では、TLR は化療の前後で

極めて鋭敏な反応を示し、その変化はCY, CEA-mRNA の変化より明らかに顕著であった。FACS での TLR の算定は「生きた」状態の腹腔内遊離癌細胞量や播種病変の活動性を良く反映し、播種患者の予後や化療に対する効果を判定する上で極めて臨床的有用性の高いバイオマーカーであると考えられた。

次に、胃癌患者の癌性腹水/洗浄細胞液を採取、遊離細胞を回収し、Type I collagen-coated plate 上で培養、付着細胞群の機能を解析した。胃癌患者腹腔内には CD45(-)CD90(+)細胞が少数存在し、その比率は播種患者で高かった(0.01 ~0.45% vs 0.04~6.81%, p=0.001)。

この phenotype を持つ細胞は高い運動能と増殖能を有し、2-3 週間の培養にて大多数を占めるようになった。本細胞は通常培養では炎症性中皮細胞様の形態を示すが、至適培養条件下にて 1 週間培養すると、Oil red 陽性の脂肪細胞に分化した。また、別の培養条件下にて 2~3 週間培養することによって、Osteocalcin 陽性骨芽細胞や Aggrecan 陽性軟骨芽細胞にも分化することが判明した。また、本細胞は、表面抗原として、cytokeratin, vimentin, calretinin を弱く発現しており、CD90 の他に CD73, CD105, CD166, および CD29, CD44 を高発現していた。また、RT-PCR 法にて REX-2, Oct-3/4, Nanog, Sox2, KLF-4 などの幹細胞因子を発現しており、いわゆる間葉系幹細胞の形質を有していた。さらに、本細胞はこの細胞はアルギナーゼ-1 を強く発現し、固相化抗 CD3 抗体刺激によるリンパ球の増殖を強く抑制した。この間葉系幹細胞は、リンパ球の 1%の細胞数で有意な作用を発揮し、10%でほぼ完全にリンパ球増殖を抑制した。また、ダブルチャンバーで直接接触を避けた形で培養しても、この抑制は有意であり、多量の L-arginine (1mM)、選択的 Arginase inhibitor, nor-NOHA (500microM)の添加によってその抑制作用は有意に減弱したことから、この間葉系幹細胞は arginase などのリンパ球増殖を抑制する液性因子を介して腹腔における免疫能を負に制御する作用を有している事が判明した。以上の事実から、この CD90 陽性細胞は、腹腔内に常在する間葉系幹細胞

(Intraperitoneal mesenchymal stem cell, 以下 p-MSC)として機能している可能性が推測された。

さて、この p-MSC は 10~20ng/ml TGF- $\beta$  の刺激下にて 12~48 時間培養すると、紡錘形の myofibroblast 様形態を示し、Collagen, Vimentin,  $\alpha$ -SMA, FAP- など抗原を強く発現するようになった。また、ヒト胃癌細胞株 MKN45 と共に nude mouse 腹腔内に注入すると、播種の成立を増強した。MKN45 は  $1 \times 10^6$  個で約 50%の確率で播種を形成したが、 $5 \times 10^5$  個の p-MSC と共に移植すると全例で播種が形成された。また、MKN45 単独では  $1 \times 10^5$  個では播種形成は全く見られなかったが、 $5 \times 10^5$  個の p-MSC の存在下では 6/8 匹に播種形成が認められた。播種巣の組織所見では、PKH26 で蛍光標識した多数の p-MSC が播種巣内に取り込まれていることが確認された。この細胞は主に間質の線維組織に多く分布し、免疫染色にて、Type1 コラーゲン, FAP- を産生している事が確認された。さらに、Tyrosine kinase Inhibitor, Dasatinib ( $>10 \mu\text{M}$ )は In vitro で p-MSC の増殖を強く抑制し、MKN45 は抑制しなかったが、In vivo で経口投与(dasatinib; 25mg/Kg, 14 日継続)すると、播種の成立は約半分に減少し、組織所見では播種巣内線維成分は対照群と比べ明らかに減少していた。

以上の事実から、CD90 陽性の腹腔内間葉系幹細胞は腹膜局所における線維化や免疫抑制を介して癌細胞の生育に好都合な微小環境を提供することによって腹膜播種の成立を促進する働きを有していることが推測され、間葉系幹細胞は癌の幹性と密接な関連を有していることが推測された。また、Dasatinib などの薬剤にて正常の間葉系幹細胞を制御することが結果的には有効ながん治療につながる可能性も示唆された。この間葉系幹細胞と腹腔内遊離癌細胞と相互作用に注目してさらに検討を加えることが今後の課題であると考えられる。

本研究を通して、がんは生体が有する再生機能を巧みに利用して発育、転移するという仮説が想定された。逆説的だが、がんは生物学的には個体を死に誘導する「再生」現象といってもよいのかも知れない。考えてみれば、生命そのものは再生することは

不可能であり、子孫への継承、種としてのいのちという形で存続させていくべきものである。真の再生とは、個人の精神を後世の人々の記憶の中に「再生」していくことであり、それこそが、医療が見つけていくべき本当のいのちの意味であると思う。臨床医学における今後のがん治療の在り方を考えていく上で重要な示唆を与えてくれた研究であったと思う。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

1. Kitayama J, Emoto S, Yamaguchi H, Ishigami H, Watanabe T. CD90+ mesothelial-like cells in peritoneal fluid promote peritoneal metastasis by forming a tumor permissive microenvironment. PLoS One. 2014 Jan 21;9(1):e86516.
2. Kitayama J, Emoto S, Yamaguchi H, Ishigami H, Yamashita H, Seto Y, Matsuzaki K, Watanabe T. CD90(+)CD45(-) intraperitoneal mesothelial-like cells inhibit T cell activation by production of arginase I. Cell Immunol. 2014 Mar-Apr;288(1-2):8-14
3. Kitayama J, Emoto S, Yamaguchi H, Ishigami H, Watanabe T. Intraperitoneal paclitaxel induces regression of peritoneal metastasis partly by destruction of peripheral microvessels. Cancer Chemother Pharmacol. 2014 Mar;73(3):605-12
4. Kitayama J, Emoto S, Yamaguchi H, Ishigami H, Kamei T, Yamashita H, Seto Y, Matsuzaki K, Watanabe T. Flow cytometric quantification of intraperitoneal free tumor cells in patients with peritoneal metastasis. Cytometry B Clin Cytom. 2014 Jan;86(1):56-62.

〔学会発表〕(計3件)

1. 北山丈二、江本成伸、山口博紀、石神浩徳、渡邊聡明 Role of the intraperitoneal fibrocytes on the development of peritoneal metastasi.

第72回日本癌学会 2013年10月3日～2013年10月5日 横浜

2. 北山丈二、江本成伸、山口博紀、石神浩徳、渡邊聡明 胃癌腹膜播種の成立における腹腔内遊離間葉系幹細胞の役割とその臨床的意義 第86回日本胃癌学会 2014年3月20日～2014年3月22日 横浜
3. Kitayama J, Emoto S, Yamaguchi H, Ishigami H, Watanabe T. CD90+ mesothelial-like cells in peritoneal fluid promote peritoneal metastasis by forming a tumor permissive microenvironment. 104th Annual meeting of American Association of Cancer Research. April 6, 2014 San Diego CA, USA

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕(計0件)

〔その他〕HP:

<http://all-1su.umin.jp/surgical/>

#### 6. 研究組織

- (1)研究代表者 石神浩徳  
(Ishigami Hironori)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 80372382
- (2)研究分担者 北山丈二  
(Kitayama Joji)  
東京大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号: 20251308
- (3)研究連携者 山口博紀  
(Yamaguchi Hironori)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 20376445
- (4)研究連携者 山下裕玄  
(Yamashita Hiroharu)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 60572542
- (5)研究連携者 谷澤健太郎・助教  
(Yazawa Kentaro)  
東京大学・医学部附属病院  
研究者番号: 50599397