

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659723

研究課題名(和文) 卵巣がん人工多能性癌幹細胞(iPC)の樹立と機能解析 - 薬剤抵抗性の観点から

研究課題名(英文) Establishment and functional analysis of induced pluripotent cancer cells in ovarian cancer

研究代表者

倉智 博久(Kurachi, Hirohisa)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：40153366

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)：ハニカム膜は、3D porous scaffoldともいわれ、細胞が接着、増殖していく上での足場となる。ハニカム膜上で卵巣癌細胞株を培養したところ増殖抑制を認め、卵巣癌を休眠状態にし、幹細胞の性質を持ち得る可能性と腹膜播種を抑制する可能性があると考えられた。さらに卵巣癌患者腹水より腹膜播種に関連する骨髄由来細胞を分離、初代培養し、CD11b+CD14+細胞が卵巣癌の浸潤能、増殖能を有意に促進することを証明した。またこの促進効果がCD11b+CD14+細胞からのIL-6分泌を介すること、抗IL-6受容体抗体を用いて、その浸潤能、増殖能の亢進が阻害できることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Honeycomb films (3D porous scaffold) exert an influence on cell adhesion and proliferation. Honeycomb films inhibited cell proliferation compared with control flat films in ovarian cancer cells, suggesting that honeycomb films have the possibility of inducing cancer cell to cancer stem cell and suppressing peritoneal spread of ovarian cancer. Ovarian cancer ascites were collected from patients who underwent surgery and we identified that primary CD11b+CD14+ cells, which were predominantly macrophages, are the major source of IL-6 production in an ovarian tumor microenvironment. When CD11b+CD14+ cells were co-cultured with cancer cells, the invasion and the proliferation of cancer cells were robustly promoted and these promotions were almost inhibited by the pretreatment of anti-IL-6R antibody (tocilizumab).

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：卵巣がん 低酸素 microRNA ハニカム膜 細胞接着 細胞増殖 卵巣癌幹細胞 卵巣明細胞腺癌

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌組織において骨髄由来の癌幹細胞 (cancer stem cell) の存在が明らかになり (Nature 2001)、卵巣癌でも幹細胞の存在が報告された (PNAS 2006)。その後も卵巣がん幹細胞を同定したとの報告は多数あるが、ほとんどが癌幹細胞様細胞 (cancer stem cell-like cells) としか言えないのが現状である。最近、大腸がん、肝細胞がん、血液がんではがん細胞から人工多能性癌幹細胞 (iPC) を樹立したという報告があった (J Cancer Res Clin Oncol 2011)。卵巣がん細胞から卵巣がん人工多能性癌幹細胞 (iPC) を樹立できれば、卵巣がん幹細胞の研究が著しく進展する可能性がある。

(2) 研究開始当初は卵巣癌細胞株に Yamanaka factor (Oct4, Sox-2, Klf4, c-Myc) を導入し、卵巣癌人工多能性癌幹細胞 (iPC) を樹立する計画であったが、均一な多孔性膜である八二カム膜の孔径を変えることにより、神経幹細胞が、神経細胞に分化すること、または幹細胞の性質を保持したまま増殖することが報告され (Tanaka M, et al. Patent application PCT/JP2006/303909)、この機能を卵巣癌幹細胞の樹立に応用しようと考えた。

(3) 八二カム膜は細胞が接着、増殖していく上での足場となり、癌細胞の増殖を抑制させることが知られている (Tanaka M, et al. Biochim Biophys Acta 2011)。この八二カム膜の特性を生かし、卵巣癌の再発形式として最も頻度の高い播種性病変を抑制できる可能性があると考えた。さらに腹膜播種の機序として癌細胞の浸潤・増殖能に影響を与えていると考えられる骨髄由来細胞に着目した。

2. 研究の目的

(1) 八二カム膜によって卵巣癌細胞の増殖が抑制されるか、否かを検討する。癌細胞増殖抑制に最適な生体素材と孔径を確立させる。

(2) 八二カム膜による卵巣癌細胞の増殖抑制のメカニズムと幹細胞の性質を有するか否かを検討する。

(3) 癌性腹水中に存在する骨髄由来細胞に焦点を当てて、それらの細胞が卵巣癌細胞の浸潤能、増殖能に与える影響を解析する。

3. 研究の方法

(1) ヒト卵巣癌細胞株における八二カム膜

の増殖抑制効果の検討：3種類の卵巣癌細胞株 (SKOV3, TOV21G, A2780) を用いる。12 well plate の組織培養プレート (TC; tissue culture) とプレート上にコントロール膜 (平膜) またはさまざまな孔径の八二カム膜 (ロットナンバーで管理) を貼付し、各細胞 (1×10^4 cells/cm²) をまく。FBS(+) の細胞培養液内で 48 時間培養後、DAPI 核染色を行い、蛍光顕微鏡 100 倍率でランダムに 5 視野をとり、細胞数をカウントする。組織培養プレート、コントロール膜上で培養した細胞数と八二カム膜上で培養した細胞数を比較し、増殖抑制効果を検討する。

(2) 八二カム膜による細胞増殖抑制機序の解明と幹細胞の性質を持ち得るか、否かの検討：アポトーシス関連蛋白、細胞周期関連蛋白の発現を western blot で検討する。幹細胞の形態的特徴である sphere の形成があるか否かを走査電子顕微鏡で確認する。sphere 形成を認めた細胞を回収し、幹細胞マーカー (Nanog, Oct4, Sox-2, Klf4, c-Myc, BMI1, nestin, ABCG2) の発現状況を real-time PCR と immunoblot で確認する。

(3) 卵巣癌患者腹水より骨髄由来細胞の初代培養：倫理委員会承認のもと卵巣癌患者の手術の際に腹水を採取し、遠心分離後、Picolli で赤血球、血漿の除去を行い、Miltenyi Biotec 社の MACS Cell Separation Columns を用いて、骨髄球のマーカーである CD11b⁺ 細胞を分離し、さらに、その陽性細胞をマクロファージのマーカーである CD14 で識別し、最終的に CD11b⁻, CD11b⁺CD14⁻, CD11b⁺CD14⁺ 細胞を回収した。分離した細胞は 20% の FCS (胎仔血清) 添加 RPMI 培養液で培養し、継体回数が 3 回以内のものを実験に用いた。

(4) 骨髄由来細胞が卵巣癌細胞の浸潤能にあたえる影響の検討：卵巣癌細胞株 SKOV3ip1 を用い、Invitro Invasion Assay を行った。24 ウェルの Transwell に 25 μ g の Matrigel (BD Bioscience 社) をコーティングし、上層に 1×10^5 の SKOV3ip1 細胞を撒き、下層に同数の骨髄由来細胞を Chemoattractant として添加して、72 時間培養。培養後、Transwell の下方に浸潤してきた卵巣癌細胞数を測定し、浸潤能を比較検討した。具体的には Transwell を PBS で 3 回洗浄し、上層に残っている細胞を綿棒で丁寧に取り除き、固定後、下層に浸潤した細胞をギムザ染色した。しかる後に 200 倍視野で無作為に 10 か所撮影し、浸潤細胞数を目視でカウントし、下層に骨髄由来細胞を撒かなかった時の浸潤細胞数を 1 として、比較検討した。

(5) 骨髄由来細胞が卵巣癌細胞の増殖能にあたる影響の検討：上層に 1×10^4 個の骨髄由来細胞をまき、下層に同数の卵巣癌細胞株 SKOV3ip1 を撒き、72 時間の共培養を行った。増殖能は Cell Titer 96AQ kit (Promega 社) を用いた MTS 変法で評価した。共培養開始時の細胞数を 1 として、比較検討した。

(6) 骨髄由来細胞が癌周辺微小環境に与える影響の解析：今回の検討では、骨髄由来細胞が放するインターロイキン 6 (以下 IL-6) に焦点を当てることにした。 1×10^5 個の骨髄由来細胞を 6 ウェルのプレートにまき、血清無添加の状態 で 72 時間培養し、その上清中の IL-6 濃度を Enzyme linked immunosorbant assay (ELISA) 法で検討した。測定には、Human IL-6 ELISA Ready-SET-GO (eBioscience 社) を用いた。

(7) CD11b⁺CD14⁺ 細胞が分泌する IL-6 が卵巣癌の浸潤能に与える影響の検討：方法(2)で行った共培養下の In vitro Invasion Assay をおこない、その際に抗 IL-6 受容体抗体 (Anti-IL-6R, Tocilizumab、中外製薬より提供) を添加し、卵巣癌の浸潤能が IL-6/IL-6R シグナルの抑制によって制御されるか検討した。

(8) CD11b⁺CD14⁺ 細胞が分泌する IL-6 が卵巣癌の増殖能に与える影響の検討：方法(5)で行った共培養実験の際に抗 IL-6 受容体抗体 (Anti-IL-6R antibody, Tocilizumab、中外製薬より提供) を添加し、卵巣癌の増殖が IL-6/IL-6R シグナルの抑制によって制御されるか検討した。

4. 研究成果

(1) 卵巣癌細胞株をハニカム膜上で培養したところ、コントロール膜に比較して明細胞腺癌由来である TOV21G 細胞で細胞増殖抑制効果を認めた (図 1)。

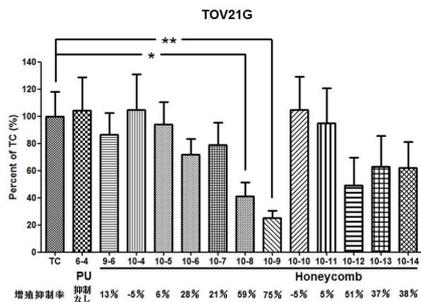


図 1 . 卵巣癌細胞におけるハニカム膜の細胞増殖抑制効果

(2) ハニカム膜による癌細胞増殖抑制の機序としては、他癌種ではアポトーシスより細胞周期進行の遅延による可能性が高いと報告されており (Tanaka M, Biochim Biophys Acta 2011)、現在 cyclin や Rb 蛋白を解析中

である。またハニカム膜により癌細胞が幹細胞の性質を持ち得るかについても検討中である。

(3) 卵巣癌患者腹水よりの初代培養に成功した。骨髄由来細胞は CD11b 陽性であり、その中で、CD11b⁺CD14⁺ 細胞は大部分がマクロファージ、CD11b⁺CD14⁻ 細胞は MDSC などそれ以外の骨髄由来細胞と考えられる。一方で CD11b⁻ 細胞は腹水中の癌細胞、その他組織細胞と考えられる。従って、以下の実験では CD11b⁻ 細胞は陰性コントロールとして用いることにした。

(4) 卵巣癌細胞株 SKOV3ip1 の浸潤能は腹水中の骨髄由来細胞との共培養により、著明に促進された。特に CD11b⁺CD14⁺ 細胞との共培養により、浸潤が促進され、腹水中のマクロファージが癌細胞の浸潤能獲得に寄与している可能性が示唆された (図 2)。

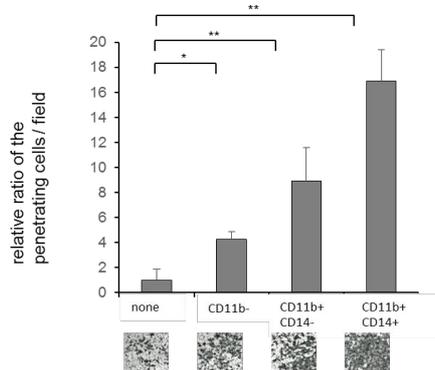


図 2 . 共培養による浸潤能の検討

(5) 卵巣癌細胞株 SKOV3ip1 の増殖能は腹水中の骨髄由来細胞 CD11b⁺CD14⁺ 細胞との共培養により、有意に亢進した。すなわち、腹水中のマクロファージが癌細胞の増殖能獲得に参与している可能性が示唆された (図 3)。

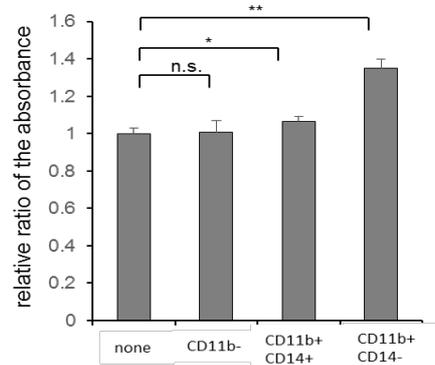


図 3 . 共培養による増殖能の検討

(6) 卵巣癌細胞株 SKOV3ip1 や CD11b⁻ 細胞が IL-6 を殆ど分泌していないのに対して、骨髄由来細胞では IL-6 の分泌を認めた。特に CD11b⁺CD14⁺ 細胞において、著明な IL-6 分泌を認めた (図 4)。

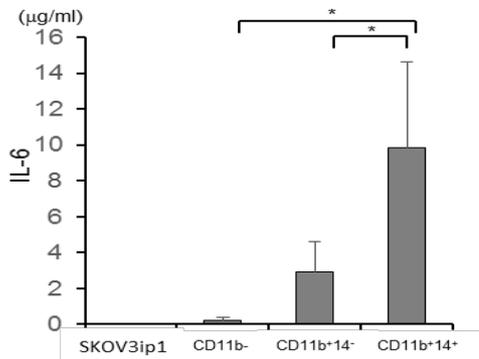


図4 . 上清中の IL-6 の濃度の検討

(7) 抗 IL-6 受容体抗体は単独では卵巣癌細胞の浸潤能に影響を与えなかったが、CD11b⁺CD14⁺ 細胞との共培養下では、卵巣癌細胞の浸潤能を著明に抑制した。即ち、CD11b⁺CD14⁺ 細胞が IL-6 を分泌することにより、卵巣癌の浸潤能を亢進していることを証明した (図5)。

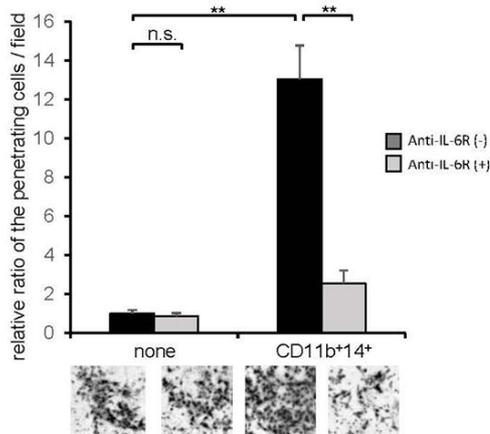


図5. 抗 IL-6 受容体抗体による浸潤能に対する影響の検討

(8) 抗 IL-6 受容体抗体は単独では卵巣癌細胞の増殖能に影響を与えなかったが、CD11b⁺CD14⁺ 細胞との共培養下では、卵巣癌細胞の増殖能を部分的に抑制した。即ち、CD11b⁺CD14⁺ 細胞が IL-6 を分泌することにより、卵巣癌の増殖能に寄与していることを証明した (図6)。

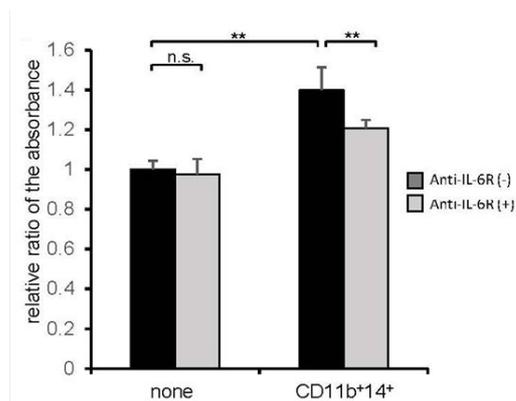


図6. 抗 IL-6 受容体抗体による増殖能に対する影響の検討

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 20 件)

Yokoyama Y, Kurachi H. (他 13 名、11 番目) Redistribution of resistance and sensitivity to platinum during the observation period following treatment of epithelial ovarian cancer. *Mol clin oncol*. 2014;2:212-218 査読有

DOI: 10.3892/mco.2013.223

Ohyagi-Hara C, Sawada K, Mabuchi S, Takahashi T, Kurachi H. (他 13 名、15 番目) miR-92a inhibits peritoneal dissemination of ovarian cancer cells by inhibiting integrin 5 expression. *Am J Pathol* 2013;182(5):1876-1889 査読有

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.01.039>

Matsumura S, Ohta T, Takahashi K, T Kurachi H. (他 2 名、6 番目) Non-sex cord-stromal ovarian tumors frequently produce and secrete estrogen in postmenopausal women: impact on bone metabolism and abnormal endometrial histology. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98(7):2775-2782 査読有

DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2013-1267>

Kato N, Hayasaka T, Takeda J, Osakabe M, Kurachi H. (他 3 名、5 番目) Ovarian tumors with functioning stroma: a clinicopathologic study with special reference to serum estrogen level, stromal morphology, and aromatase expression. *Int J Gynecol Pathol* 2013;32(6):556-561. 査読有

DOI: 10.1097/PGP.0b013e31827c6362.

Yokoyama Y, Kurachi H. (他 12 名、10 番目) Investigation of the clinicopathological features of fallopian tube malignancy. *Oncol Rep* 2013;30:79-84 査読有

DOI: 10.3892/or.2013.2439. Epub 2013 Apr 30.

Ohta T, Takahashi K, Kurachi H. (他 4 名、7 番目) Inhibition of the Rho/ROCK pathway enhances the efficacy of cisplatin through the blockage of hypoxia-inducible factor-1 in human ovarian cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2012;13(7):1-9. 査読有

DOI: 10.4161/cbt.13.1.18440.

Ohta T, Takahashi K, Kurachi H.

(他4名、7番目) Gefitinib (ZD1839) increases the efficacy of cisplatin in ovarian cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2012;13(6):408-416. 査読有
DOI: 10.4161/cbt.19292. Epub 2012 Apr 1.
Yamamoto S, Kurachi H. (他10名、8番目) Histological grading of ovarian clear cell adenocarcinoma: proposal for a simple and reproducible grouping system based on tumor growth architecture. *Int J Gynecol Pathol* 2012;31(2):116-124. 査読有
DOI: 10.1097/PGP.0b013e3182285c90.
Mabuchi S, Sawada K, Takahashi K, Kurachi H. (他6名、9番目) The activity of trabectedin as a single agent or in combination with everolimus for clear cell carcinoma of the ovary. *Clin Cancer Res* 2011;17(13):4462-4473 査読有
DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2987
Yamamoto S, Kurachi H. (他10名、8番目) Clear cell adenocarcinoma with a component of poorly differentiated histology: a poor prognostic subgroup of ovarian clear cell adenocarcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2011;30(5):431-441. 査読有
DOI: 10.1097/PGP.0b013e3182165eba.
Shoji T, Kurachi H. (他13名、13番目) Phase clinical study of the combination chemotherapy regimen of irinotecan plus oral etoposide for the treatment of recurrent ovarian cancer. (Tohoku Gynecologic Cancer Unit 101 Group Study). *Int J Gynecol Cancer* 2011;21(1):44-50. 査読有
DOI: 10.1097/IGC.0b013e3181ffbe9f.
Yamamoto S, Kurachi H. (他11名、9番目) Validation of the histologic grading for ovarian clear cell adenocarcinoma: a retrospective multi-institutional study by the Japan clear cell carcinoma study group. *Int J Gynecol Pathol* 2011;30(2):129-138. 査読有
DOI: 10.1097/PGP.0b013e3181f71264.
Kojimahara T, Kurachi H. (他11名、13番目) Identifying prognostic factors in Japanese women with pseudomyxoma peritonei: a retrospective clinico-pathological study of the Tohoku Gynecologic Cancer Unit. *Tohoku J Exp Med* 2011;223(2):91-96. 査読有
[e/tjem/223/2/223_2_91/_pdf
Amita M, Ohta T, Takahashi K, Kurachi H. \(他6名、10番目\) Molecular mechanism of the inhibition of estradiol-induced endometrial epithelial cell proliferation by clomiphene citrate. *Endocrinology* 2010;151\(1\):394-405. 査読有
DOI: 10.1210/en.2009-0721.
Karube Y, Kurachi H. \(他8名8番目\) Histopathological prognostic factors predicting para-aortic lymph node metastasis in patients with endometrioid uterine cancer. *Gynecol Oncol* 2010;118\(2\):151-154 査読有
DOI: 10.1016/j.ygyno.2010.05.004.](https://www.jstage.jst.go.jp/articl</p></div><div data-bbox=)

〔学会発表〕(計16件)

小島原敬信、高橋俊文、松尾幸城、松村創平、小幡美由紀、松川淳、倉智博久.
2年前の膀胱癌由来と思われる腹膜偽粘液腫の1例. 第65回日本産科婦人科学会 札幌市教育文化会館(札幌市) 2013.5.10-12.
横山良仁、倉智博久.(他13名、11番目) 卵管悪性腫瘍の臨床的解析 東北婦人科腫瘍研究会後方視的検討. 第50回日本癌治療学会 パシフィコ横浜(横浜市) 2012.10.25-27.
島田宗昭、倉智博久.(他26名、13番目) 再発卵巣癌に対するリポソーマルドキソルピシン単剤療法における手足症候群および口内炎予防のためのサポーターケアに関する多施設共同研究. 第63回日本産科婦人科学会 大阪国際会議場、リーガロイヤルホテル大阪(大阪市) 2011.8.29-31.
網田光善、高橋俊文、原周一郎、五十嵐秀樹、倉智博久. GFP結合ER α を用いた子宮内膜細胞におけるエストロゲン、抗エストロゲン作用の可視化. 第62回日本産科婦人科学会 東京国際フォーラム(東京都) 2010.4.23-25.
清野 学、太田剛、高橋俊文、逸見典子、須藤毅、本山梯一、倉智博久. 化学療法後の卵巣癌再発巣におけるAktとERKの活性化は予後良好因子である. 第62回日本産科婦人科学会 東京国際フォーラム(東京都) 2010.4.23-25.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.id.yamagata-u.ac.jp/ObGyn/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉智 博久 (KURACHI Hirohisa)
山形大学・医学部・教授
研究者番号：40153366

(2) 研究分担者

高橋 一広 (TAKAHASHI Kazuhiro)
山形大学・医学部・准教授
研究者番号：20292427

太田 剛 (OHTA Tsuyoshi)
山形大学・医学部・助教
研究者番号：50375341

澤田 健二郎 (SAWADA Kenjiro)
大阪大学・医学部・講師
研究者番号：00452392