

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 24 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462486

研究課題名(和文)膀胱癌由来癌幹細胞の生存・増殖・分化・遊走における間質細胞の役割とその制御機構

研究課題名(英文) Interaction between cancer stem cell from urothelial carcinoma and stromal cell in survival, proliferation, differentiation and migration.

研究代表者

徳田 雄治 (yuji, tokuda)

佐賀大学・医学部・客員研究員

研究者番号：90315200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：表在性、浸潤性膀胱癌株と脂肪組織間質細胞(ATSCs)との混合培養で、癌幹細胞のマーカーであるCD44、CD105の発現が亢進した。表在性ではmyofibroblastへの分化が示唆された。浸潤性ではpreadipocytesへの分化が示唆され、癌のタイプによりATSCsの分化能が変化することが示唆された。網羅的蛋白解析を行い、表在性ではCD147、galectin-3、galectin-3BPの発現が亢進した。Cathepsin D、CRELD2は表在性では発現低下したが、浸潤性では発現亢進した。これらの蛋白が間質細胞誘導性の癌幹細胞動態の仲介因子の一部と示唆された。

研究成果の概要(英文)：Superficial bladder cancer might promote myofibroblast differentiation of adipose tissue stromal cells as a cancer-associate phenotype, whereas invasive bladder cancer might promote their adipocyte differentiation. We examined the expression profile of proteins in these types cultured alone or with ATSCs. The expression of CD147, galectin-3 and galectin-3BP increased in co-culture of superficial type and ATSCs, while that of CD147, galectin-3 and galectin-3BP decreased in co-culture of invasive type and ATSCs. The expression of cathepsin D and CRELD2 decreased in in co-culture of superficial type and ATSCs, while that of cathepsin D and CRELD2 increased in co-culture of invasive type and ATSCs. Opposite expression of CD147, galectin-3, galectin-3BP, cathepsin D and CRELD2 was observed in ATSC-affected superficial and invasive type. Thus, these molecules may be involved in the mechanisms of ATSC-affected differences between superficial and invasive type.

研究分野：泌尿器科

キーワード：膀胱癌 癌幹細胞 間質細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、癌組織に存在する少数の癌幹細胞が、癌細胞を産生し、腫瘍の形成・維持・進展に必須であることが示唆されている (Cancer Metastasis Rev 26:203-14, 2007)。最近、膀胱癌の癌幹細胞(CD44+/EMA-) が解明された (Proc Natl Acad Sci USA 106:14016-21, 2009; Curr Opin Urol 20:393-7, 2010)。我々も、膀胱尿路上皮癌組織から単離した CD44+/EMA-癌細胞のマウス (SCID) 移植実験により高効率造腫瘍能と培養系による癌細胞産生能を確認し、CD44 陽性、EMA 陰性の癌細胞が膀胱尿路上皮癌の癌幹細胞であることを確認した (未発表)。しかし、膀胱癌由来癌幹細胞の細胞動態の詳細は不明である。一方、癌-間質細胞相互作用は癌生物学の中心課題の1つである。即ち、間質細胞が癌細胞の増殖・浸潤・転移を調節し、さらに、上皮細胞に腫瘍化シグナルを誘導し、発癌にも関与する (Curr Opin Genet Dev 11:54-9, 2001; Cancer Biol Ther 11:150-6, 2011)。我々は、喉頭の間質細胞が喉頭扁平上皮癌細胞の増殖・浸潤を調節することを明らかにした (Yamada S, Toda S, et al. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 125:424-31, 1999)。即ち、線維芽細胞は癌細胞の浸潤を促進し、脂肪細胞は癌細胞の増殖を促進する。また、間質細胞である脂肪細胞が、前立腺癌細胞の増殖を促進することを見出した (Tokuda Y, Toda S, et al. BJU Int 91:716-20, 2003)。さらに、膀胱癌が粘膜内で発生し、上皮結合組織 膀胱周囲脂肪組織へ浸潤する (図1) という臨床経験に基づいた我々の予備実験でも、脂肪細胞が膀胱癌細胞の増殖を高度に促進する (図2)。それ故に、癌細胞だけではなく、癌幹細胞の生存・増殖・分化・遊走を基盤とする、その未分化性の保持、自己複製、癌細胞産生、浸潤・転移形成能にも間質細胞が活発に影響を与えていると推測される。しかし、膀胱癌由来癌幹細胞-間質細胞相互作用の研究は、国内外に報告はなく、その詳細は不明である。

2. 研究の目的

癌幹細胞は、癌細胞を産生し、腫瘍の形成・維持・進展に必須である。最近、膀胱尿路上皮癌の癌幹細胞 (CD44+/EMA-) が同定され、我々も膀胱癌組織より、CD44+/EMA-癌幹細胞の単離に成功した。しかし、その細胞動態の詳細は不明である。一方、線維芽細胞や脂肪細胞などの間質細胞は、癌細胞の増殖・浸潤・転移を調節し、上皮細胞の癌化にも関与する。それ故に、膀胱癌組織に存在する癌幹細胞の生存・増殖・分化・遊走にも、間質細胞が活発に影響を与えていると推測されるが、その詳細は不明である。以上の知見を基盤にした本研究では、膀胱癌由来癌幹細胞の生存・増殖・分化・遊走、即ち、その未分化性の維持、自己複製、癌細胞

産生、浸潤・転移形成における線維芽細胞や脂肪細胞の役割とその制御機構を、培養系と移植実験系を用いて解明する。本研究により、膀胱癌の癌幹細胞標的療法の開発が期待できる。

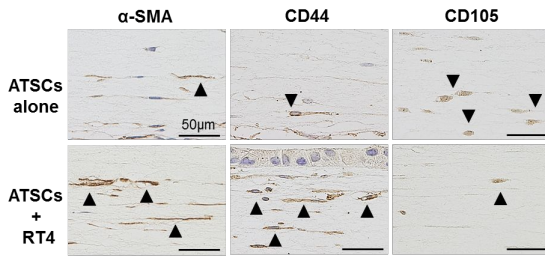
3. 研究の方法

1) 材料: 尿路上皮癌由来細胞株を使用する。浸潤性膀胱尿路上皮癌細胞株 (EJ)、非浸潤性尿路上皮癌細胞株 (RT4)、間質細胞: a) 線維芽細胞: 尿路上皮癌組織から単離した線維芽細胞と線維芽細胞株 (NIH3T3) を用いる。b) 脂肪細胞: 膀胱尿路上皮癌組織や膀胱周囲、皮下脂肪組織から単離した脂肪細胞を用いる。
2) 培養システム: Collagen gel invasion assay system を用いる。この培養系では、癌幹細胞や癌細胞から産生される癌細胞の形態、ゲル内への遊走、浸潤、免疫染色による蛋白発現の局在が解析できる利点がある。まず、外皿 (1) に、間質細胞 (100 万個) を I 型コラーゲン・ゲル内に包埋し、1 日間培養する。その後、底面がニトロセルロース膜から成る内皿 (2) にコラーゲン・ゲル層を作製し、そのゲル層上に、癌幹細胞 (0.01、0.1、1 万個) を播種し、この内皿 (2) を、外皿 (1) に入れて培養する。コントロールは、間質細胞のない培養系である。また、外皿 (1) に線維芽細胞と脂肪細胞を混合した培養系で、両者の相乗あるいは相反効果も検討する。

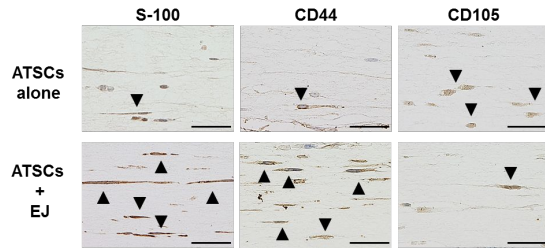
4. 研究成果

膀胱癌細胞が脂肪組織由来の線維芽細胞に与える影響について検討した。すなわち、間質細胞の癌幹細胞の生存・増殖・分化能について Collagen gel invasion assay system を用いて膀胱癌細胞株と脂肪組織由来間質線維芽細胞 (ATSCs) との混合培養を行った。癌細胞株は、表在性膀胱癌細胞株 (RT4, RT112) と浸潤性膀胱癌細胞株 (EJ, HT1376) 使用した。線維芽細胞のコントロールとして線維芽細胞株 (NIH3T3) を用いて癌細胞株との混合培養を行った。ATSC, 3T3 をゲル内に包埋し、ゲル上に癌細胞株を播種し相互作用を検討した。HE 染色・免疫染色にて比較検討を行った。表在性、浸潤性膀胱癌株それぞれとの混合培養で、癌幹細胞のマーカーである CD44、CD105 の発現が、ATSCs 単独培養群よりも亢進した。また、表在性膀胱癌株との混合培養で、ATSCs は、SMA の発現が亢進し、myofibroblast への分化が促進した。一方、浸潤性膀胱癌株との混合培養では、s100 の発現が亢進し、preadipocytes への分化を促進した。

表在性膀胱癌

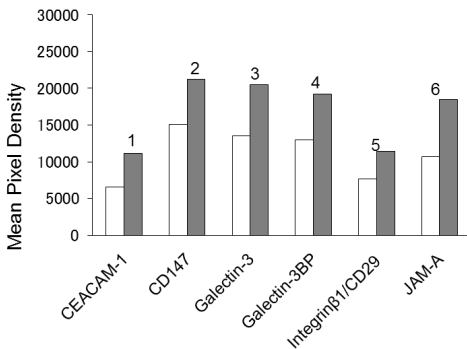


浸潤性膀胱癌

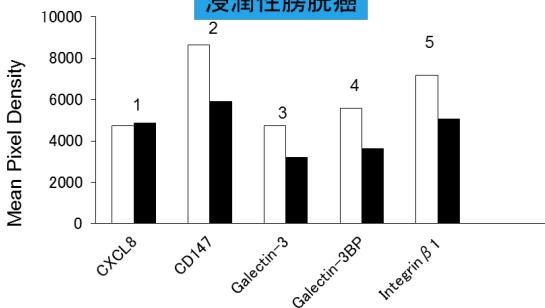


膀胱癌 - 脂肪組織間質細胞 (ATSCs) 相互作用解析モデルを用いてその他の細胞動態の仲介因子の解析を行った。蛋白アレイを用いて、可溶性レセプターと非造血性仲介因子 (119 種類) に対して網羅的蛋白解析を行った。表在性膀胱癌では、ATSCs との混合培養で CD147, galectin-3, galectin-3BP の発現亢進がみられた。一方、浸潤性膀胱癌では、ATSCs との混合培養で発現低下がみられた。Cathepsin D, CRELD2 は、ATSCs との混合培養で表在性膀胱癌では発現低下したが、浸潤性膀胱癌では発現亢進した。その他の因子では、発現がみられなかった。以上の結果より、CD147, galectin-3, galectin-3BP, Cathepsin D, CRELD2 が間質細胞誘導性の癌幹細胞細胞動態の仲介因子の一部と示唆された。

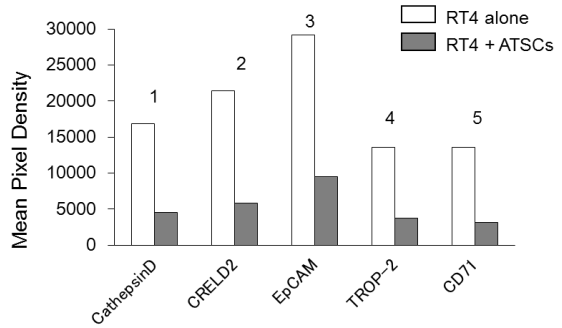
表在性膀胱癌



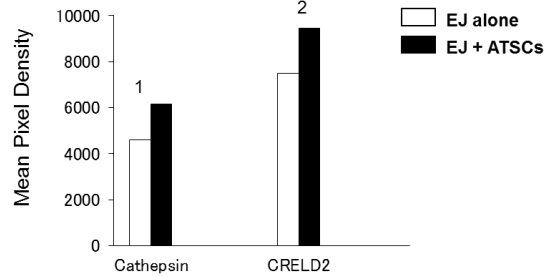
浸潤性膀胱癌



表在性膀胱癌



浸潤性膀胱癌



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)

1. Kawasaki-Nanri Maki, Aoki Shigehisa, Uchihashi Kazuyoshi, Yamamoto Mihoko, Udo Kazuma, Nishijima-Matsunobu Aki, Kakiyama Nahoko, Noguchi Mitsuru, Uozumi Jiro, Toda Shuji, Differential effects of adipose tissue stromal cells on the apoptosis, growth and invasion of bladder urothelial carcinoma between the superficial and invasive types, International Journal of Urology, 査読有, Volume23, Issue 6, 2016, 449-535
DOI:10.1111/iju.13086

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Nanri M, Udo K, Nishijima A, Uchihashi K, Aoki S, Noguchi M, Toda S, Uozumi J : Effects of adipose tissue stromal cells on apoptosis, growth and invasion of superficial and invasive type urothelial carcinomas of the

- bladder. AUA . 82.2014.5.18.Moderated
Poster Session21. ORLANDO
2. Tobu S, Noguchi M, Mori K, Uozumi J :
Changes of the suburothelial
myofibroblasts in
streptozotocininduced diabetes
mellitus model rats. ICS-第44回国際
コチネ学会 . 2014.10.20 - 24. Rio de
janeiro.
 3. Nakao I, Tokuda Y, KusumotoM, Tobu S,
Udo K, Noguchi M, Enaida H, Hatano T,
Uozumi J, : Intra Ocular Pressure
Evaluation during Robot Assisited
Laparoscopic Prostatectomy. 34th
Congress of the Societe internationale
D'Urologie、2014.10.12-16.
 4. Tokuda Y, Udo K, Tobu S, Kakinoki H,
Nanri M, Kurata S, Ichibagase Y,
Takahara K, Noguchi M, Uozumi J : Impact
of initial PSA level on biochemical
failure free survival(BFFS) following
radical prostatectomy for the prostate
cancer detected in community-based PSA
mass screening program in
Saga,Japan. . 34th Congress of the
Societe internationale D'Urologie、
2014.10.12-16.
 5. 南里麻己：脂肪組織間質細胞と膀胱癌
細胞の相互作用についての検討．第23
回泌尿器科分子・細胞研究会．プログ
ラム・抄録集P89．ホテルメトロポリ
タン山形．2014.3.14～15.
 6. 南里麻己：脂肪組織間質細胞と膀胱癌
との相互作用について．2014.4.24.総
会賞応募ポスター .APP-164 第102回
日本泌尿器科学会総会．
 7. 南里 麻己、有働和馬 徳田雄二 西島亜
紀 内橋和芳 青木茂久 野口満 戸田修
二 魚住二郎. Adipose tissue stromal
cells exert differential effects on

the apoptosis, growth and invasion of
bladder urothelial carcinoma between
the superficial and invasive types. 第
65回西日本泌尿器科学会総会．佐
賀.2013.11.2

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

徳田 雄治 (YUJI TOKUDA)
「佐賀大学・医学部・客員研究員」
研究者番号：90315200

(2)研究分担者

戸田 修二 (SHUJI TODA)
「佐賀大学・医学部・教授」
研究者番号：80188755

南里 麻己 (MAKI NANRI)
「佐賀大学・医学部・助教」
研究者番号：00448474

(3)連携研究者

()

研究者番号：