

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：35311

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640014

研究課題名(和文) 脳転移癌の微小環境においてアストロサイトが果たす役割の研究

研究課題名(英文) Roles of astrocytes in brain micro environment for metastasized cancer cells

研究代表者

坂口 卓也 (SAKAGUCHI, Takuya)

倉敷芸術科学大学・生命科学部・教授

研究者番号：80192590

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)： 癌は周辺の正常細胞に支援され悪性度を増すと示唆されている。本研究では脳転移頻度の高いヒト肺癌の細胞株を培養ラット脳スライスへ播種し脳細胞との相関を検討した。肺腺癌細胞はスライスへ生着後腺管構造を形成し、特異的に周辺に集積したアストロサイトとの相関が示唆された。より悪性度の高い肺小細胞癌細胞についても検討したが、スライスへ生着しなかった。

次に癌の再発に関与すると示唆される薬剤排出能を持つ治療抵抗性の細胞を肺小細胞癌細胞から分取した。この細胞は自身および他種細胞を生み出す能力である自己複製能および分化能そして造腫瘍能を反映するコロニー形成能を所有しており、癌幹細胞を含むことが示唆された。

研究成果の概要(英文)： Cancer cells are suggested to increase their malignancy depending on supports from neighboring normal cells. We transplanted a cell line of lung fiber cancer, which frequently metastasizes to the brain, to cultured rat brain slices. They adhered to the slices, formed typical glandular structures. Astrocytes, brain stroma cells, specifically surrounded them, suggesting correlation between these types of calls. A line of more malignant small cell lung cancer (SCLC) was similarly transplanted, but they did not adhere to the slices.

Subsequently we sorted cells which are suggested as cancer stem cells from the SCLC, based on drug-efflux ability leading rebellant. These cells had self-renewal and differentiation ability, producing themselves and different cells respectively, and colony formation ability reflecting tumorigenicity. The results suggest that cancer stem cells of the SCLC might have been sorted and their relation with astrocytes is needed to investigate in next step.

研究分野：神経科学

キーワード：肺癌 転移 癌幹細胞 アストロサイト 培養脳スライス

1. 研究開始当初の背景

癌の治療が困難である理由はそれが転移と再発を起こす能力を持つことであり、これらの現象の背後に在る機構を解明することが出来れば癌早期発見および治療につながる事が期待される。

近年、癌の転移は癌細胞自身の能力だけに依存するのではなく周辺に存在する間質細胞との相関に基づくことが示唆されて来た。本来は生体に寄与する役割を持つ筈の細胞が癌細胞との関連を持ちそれを支援する側につくことにより、癌細胞の悪性度が増すことが示唆されている。

これまで、末梢組織においては線維芽細胞が癌細胞を支援する役割を果たす存在であることが示唆されて来た。だが癌転移標的の一つである脳においては、この細胞が存在しない。脳では線維芽細胞に代わって、神経膠細胞の一種であり本来は神経細胞を様々な形で支援する立場にあるアストロサイトがこの役割を果たすことが示唆されている(文献)。

一方癌の再発については、その主要原因として治療抵抗性と造腫瘍能を併せ持つ細胞の存在が想定されて来た。その候補として近年提唱されているのが、幹細胞の特徴を所有する癌幹細胞である(文献)。

本研究においては、癌の転移と再発に関連する現象を詳細に解析する為の *in vitro* 標本として培養した脳スライスを応用することを試みた。解析の対象としては、日本国内においても罹患率および脳転移頻度が高い肺癌の細胞株を選択している。これを用い、脳スライスとの共培養系の確立および細胞株からの癌幹細胞の分取を試みた。

2. 研究の目的

(1) 第一の目的は、脳に転移した肺癌細胞の動態と脳微小環境を構成する細胞の反応を解析することである。その為、ヒト肺癌細胞株と培養ラット脳スライスの共培養系確立を試みた。

異種間共培養ではあるが、これが成立すると考える理由は本来脳の免疫系は他臓器に比べ寛容だという認識に在る。とは言え、脳に異物が存在すると循環系からマクロファージが動員され異物を排除する像が観察されて来た。

だが未熟なラットから調整した脳スライスを数週間培養した標本においては循環系が欠如している筈なので、一層免疫系による他種細胞の排除が低下する。この仮定に基づき、標本の作製を試みた。

(2) 癌の再発には、幹細胞の特徴と造腫瘍能を所有する癌幹細胞が転移後に分化し癌細胞を生み出すプロセスが重要な役割を果たすと示唆されている。ヒト肺癌細胞株から癌幹細胞を含むと想定される細胞分画を分取し、幹細胞の特徴と造腫瘍能を持つか否かを

解析した。

3. 研究の方法

(1) ヒト肺癌細胞を株化した A-549、そしてより悪性度の高い肺小細胞癌細胞を株化した S2 を対象として用いた。

A-549 については、green fluorescent protein、mCherry、Venus による生細胞染色を行った細胞と非染色の細胞を併用している。これらを生後1週ラットから培養した脳スライスへと播種した後スライスへの生着を組織学的に検討すると共に、生細胞染色を行った細胞については蛍光顕微鏡での経時的観察を行った。

なお培養スライスの源としては、一個の脳から複数のスライスを調整することが出来る海馬を選択している。

肺癌細胞生着が認められた培養スライスを固定し、パラフィン包埋後に薄切し細胞像と蛋白発現を解析した。蛋白発現解析には免疫組織化学を用い、ヒト上皮細胞を標識する抗 cytokeratin 抗体、宿主のアストロサイトと神経細胞をそれぞれ標識する抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体と抗 β -tubulin 抗体、細胞の増殖能を反映する抗 Ki-67 抗体を用いている。

S2 については、非染色細胞の培養スライスに対する生着を検討した。

(2) 癌幹細胞は抵抗性を持つので治療後も残存し、癌再発の原因となると考えられている。治療抵抗性の基盤は薬剤排出能であり、この特徴を利用する細胞の分取が試みられて来た。細胞膜透過蛍光色素 Hoechst 33342 を細胞に取り込ませ紫外線レーザーで励起し、放射光の低い細胞を薬剤排出能の高い side population (SP) 細胞として分取する方法が癌幹細胞の特定に用いられている。

我々の研究室は紫外線レーザーを搭載するタイプの蛍光表示式細胞分取器 (FACS) を所有しなかった為、FACS Aria (Becton, Dickinson and Company) 装備の紫色レーザーを用いて SP 細胞を分取する系を確立した。子宮体癌細胞株 HEC-50B についての解析を行い、分取された SP 細胞が癌幹細胞の特徴を持つことを確認している。

だがこの機器が故障した為近紫外線レーザーでの蛍光励起を行い得る FACS Aria III (同前) を導入し、これを肺癌細胞株からの SP 細胞分取に応用した。

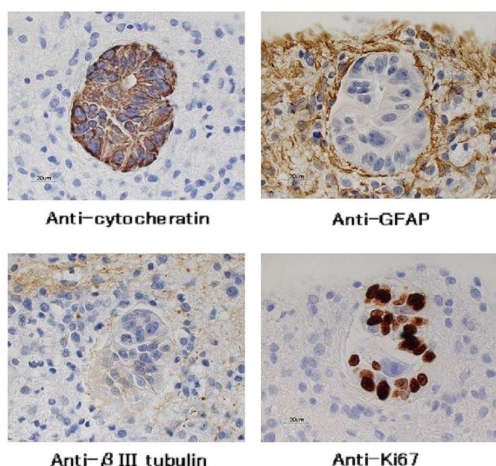
肺癌細胞の SP 細胞が癌幹細胞の特徴を持つか否かを、下記の指標を用い検討している。まず分取された SP 細胞を3週間再培養し、薬剤排出能の低い main population (MP) 細胞が出現すれば SP 細胞は分化能を持つ細胞を含むと判断した。次に SP 細胞と MP 細胞を低密度でアガロース・ゲル内において培養し、コロニーを形成する能力を比較し造腫瘍能の指標としている。

4. 研究成果

(1) ヒト肺腺癌細胞株である A-549 は安定してスライスに生着し、培養日数が延長すると共にスライス組織内部に存在する像が観察された。

生細胞染色を行った標本では、生着後にスライス内で細胞が移動する像を認めている。細胞には増殖も認められたが、スライスでは無く通常の培養皿内での増殖に比べると、その速度は低下していた。この結果は、生体内での癌細胞の動態を再現するものだと考えられる。従って、この標本は癌細胞の浸潤を解析する *in vitro* モデルとなり得ることが示唆された。

併せて、スライスにおいて A-549 が腺癌の特徴である腺管構造を形成する現象を認めている。先の結果と併せ、この標本においては生体に近い現象を再現することが出来ると解釈されるだろう。



図には、スライスに播種後 2 週間経過した A-549 の像を示している。上段は、抗 cytokeratin 抗体で標識された A-549 (左) と抗 GFAP 抗体で標識されたアストロサイト(右)。下段は、抗 β III-tubulin 抗体で標識された神経線維(左) と抗 Ki-67 抗体で標識された増殖能を持つ細胞 (右) の像である。

A-549 は 2 週の間には腺管構造形成を果たし、周辺にはアストロサイトが集まっていたことから両者の相関が示唆された。だが神経線維と A-549 との間については、空間的相関を示す像が認められていない。腺管を形成した A-549 は増殖活性を維持しており、これ以降も増殖の続くことが示唆された。

一方ヒト肺小細胞癌の細胞株である S2 を播種した場合においては脳スライスへの生着が成立せず、アストロサイトなどとの関連を解析するまでには至らなかった。S2 は本来培養系において浮遊している細胞であり、接着能の低いことが原因であろう。接着培養を行い得る A-549 に観察された様な現

象を解析する為には、S2 をスライスに播種し生着させる技術の検討が必要である。

(2) 次に、ヒト肺癌細胞株からの癌幹細胞の分取を試みた。薬剤排出能に基づく解析の結果、A-549 からは $0.24 \pm 0.05\%$ (平均 \pm 標準偏差、解析細胞総数に対する割合) の SP 細胞が分取された。S2 からは、 $0.27 \pm 0.06\%$ の SP 細胞が分取されている。

この内 S2 の SP 細胞を 4 週間再培養すると 99% 以上を MP 細胞が占有するに至り、SP 細胞は分化能を持つ細胞を含むことを確認した。

次に個々の細胞を観察出来る形で S2 の SP 細胞をアガロース・ゲルに包埋し培養すると、3 週間後にはそれぞれが増殖しコロニーを形成することを確認している。コロニーの細胞数は、 3.00 ± 1.56 個であった。MP 細胞を同様に培養した場合この値は 1.00 ± 0.00 個であり、増殖に基づくコロニー形成を全く認めていない。

これらの結果から、S2 の SP 細胞には分化能および造腫瘍能の基盤となる増殖能を持つ細胞が含まれることが判明した。従って、そこには癌幹細胞の存在することが示唆される。

本研究では、脳に転移した肺癌細胞とアストロサイトなどが構成する脳微小環境の相関を培養下で解析する系を構築することが出来た。生体内では困難な細胞の経時的観察を行えるなどの利点があり、疾患の詳細な解析への応用が期待できる。

ただ、特に治療が困難な肺小細胞癌細胞の株である S2 と脳スライスの共培養確立は成功に至っていない。S2 からは安定して癌幹細胞と示唆される細胞を分取出来たので、その脳スライスとの共培養が課題である。

< 引用文献 >

Talmadge JE, Fidler IJ. AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. *Cancer Research* 70(14): 5649-5669, 2010.

Ebber JD, Treisman DM, Zorniak M, Kutty RG, Clark PA, Kuo JS. The cancer stem cell paradigm: a new understanding of tumor development and treatment. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 14 (6): 621-632, 2010.

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)

Tomiyasu S, Miyamoto T, Mori M, Yaguchi T, Yakushiji H, Ohno S, Miyake Y,

Sakaguchi T, Ueda M, Ohno E. Isolation of side population cells from endometrial cancer cells using a violet laser diode. Human Cell 査読有 27 (1): 36-42. 2014.

〔学会発表〕(計 1 件)

坂口 卓也、西森 誠、三宅 康之、大野 英治．培養ラット脳スライスに播種したヒト肺癌細胞と宿主アストロサイトの相互関係．第 53 回日本臨床細胞学会秋季大会．2014 年 11 月 08 日．下関市市民会館 (山口県下関市)

〔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〕

無し。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂口 卓也 (SAKAGUCHI, Takuya)
倉敷芸術科学大学・生命科学部・教授
研究者番号：80192590

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

三宅 康之 (MIYAKE, Yasuyuki)
倉敷芸術科学大学・生命科学部・准教授
研究者番号：00368747

大野 英治 (OHNO, Eiji)
九州保健福祉大学・生命医科学部・教授
研究者番号：40276176