

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 31 年 2 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460464

研究課題名(和文) 正常上皮細胞との接着によるがん幹細胞の発生メカニズムの解明

研究課題名(英文) Induction of cancer stem-like properties by adhesion with epithelial-like feeder cells

研究代表者

宮武 由甲子 (YUKIKO, MIYATAKE)

北海道大学・医学研究科・助教

研究者番号：10421984

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)：成人T細胞白血病/リンパ腫(ATL)は、非常に強い臓器浸潤性や治療抵抗性を示す極めて予後不良な末梢性T細胞腫瘍である。我々はATL細胞が正常上皮細胞との接着によって、細胞周期静止やアポトーシス抵抗性といった「がん幹細胞の特性」を獲得することを見出した(Am J Pathol, 2013)。この現象はATLのみならず、上皮組織浸潤をきたした悪性腫瘍における治療抵抗性獲得機序の理解にも繋がると考える。本研究では、この現象の普遍性を高めるために、ATLの他に難治性固形がんの膵がんに焦点をあて、正常上皮細胞との接着によって誘導されるがん幹細胞の発生機序を解明した。

研究成果の概要(英文)：Adult T cell leukemia / lymphoma (ATL) is a very poor prognostic peripheral T cell lymphoma with very strong invasiveness into tissues and consequent drug resistance. We found that ATL cells acquire "cancer stem cell-like properties such as cell cycle arrest and apoptosis resistance by adhesion with normal epithelial cells (Am J Pathol, 2013). We think that this phenomenon leads to understanding not only of ATL but also the mechanism of drug resistance acquisition in malignant tumor which caused tissue invasion. In this study, in order to raise the universality of this phenomenon focusing on pancreatic cancer of intractable solid cancer, the mechanism of the development of cancer stem cell-like cells induced by adhesion to epithelial-like feeder cells. Finally, we aimed to establish a novel therapeutic concept capable of responding to a wide range of refractory cancers targeting "prevention of cancer stem cell development" induced by adhesion with normal epithelium.

研究分野：実験病理

キーワード：HTLV-1 ATL がん幹細胞 膵癌

1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (ATL) は、成人 T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) の感染によって引き起こされる極めて予後不良の悪性 T 細胞性白血病/リンパ腫である。ATL は皮膚や肺、消化管など様々な臓器への組織浸潤が非常に強いのが特徴である。組織浸潤をきたした白血病/リンパ腫細胞は、非常に強い治療抵抗性を獲得していることは経験として知られており、ATL 治療の妨げの大きな要因となっているが、そのメカニズムについては、今までほとんど注目されてこなかった。それゆえ、研究代表者は、どうして組織浸潤した白血病/リンパ腫細胞が難治性特徴を獲得するのかという疑問に対して、その機序を解明することは、ATL の新たな効果的治療法開発へと繋がると考えた。さらに、ATL をはじめ多くの難治性造血器腫瘍及び固形がんにおいても、化学療法や放射線療法の施行によって、かえって治療抵抗性のがん細胞を新たに生み出し、それが再発、転移の原因となって難治度を高めてしまうことがしばしばであるため、同様の現象が起きていると仮説を立てた。

がん幹細胞は、治療抵抗性獲得のカギとなり得る「細胞周期の静止期」を保ちつつ増殖維持能を保有するが未だ不明な点が多く、腫瘍微小環境 (ニッチ) との相互作用によるがん幹細胞の発生メカニズムに至っては、ほぼ未踏の領域とよい。しかしながら、現在、がん幹細胞を標的とした効果的な新規のがん治療法の開発が急務となっている。研究代表者は、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤によって誘導されるウイルス転写の賦活化といったような ATL 細胞におけるエピジェネティックな変化 (ゲノム不安定性) を抑制し、それによって誘導される細胞死から ATL 細胞を保護する働きがあることを偶然見出した。さらに、正常上皮細胞に接着した ATL 細胞が、細胞周期静止状態、アポトーシス抵抗性、がん幹細胞マーカー CD44 の発現亢進といった「がん幹細胞様の特性」を獲得する現象を報告した (Miyatake Y et al, Am J Pathol, 182:1832-42, 2013)。

2. 研究の目的

先行研究結果を踏まえて、がん微小環境を構成する正常上皮細胞によって誘導されるがん幹細胞様 ATL 細胞の発生に至る分子メカニズムを解明した。最終的には、ATL のみならず膵がんなどの難治性固形がんにも応用し得る周囲上皮組織-腫瘍間の細胞間相互作用による、がん幹細胞の発生メカニズムの解明とその阻止を標的とした新しい治療コンセプトの確立を目指した。

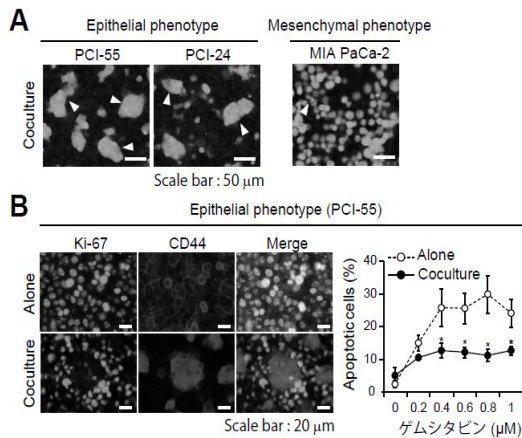
3. 研究の方法

研究代表者が発見した『正常上皮細胞に接着した腫瘍細胞が、がん幹細胞様の特性を獲得する』現象の分子メカニズムを解明し、それに関する治療標的分子の決定を試みた。その後、正常上皮-腫瘍細胞間の相互作用によるがん幹細胞発生の阻止を標的とした様々な難治性がんへ応用可能な新規の難治性がん治療コンセプトの確立を図った。本研究計画は 2 つの連動した研究グループで遂行した。グループ A では、ATL をはじめとする難治性造血器腫瘍に焦点を当てた。グループ B では難治性固形がん、特に膵がんに焦点を当て、正常上皮細胞との接着によるがん幹細胞化の機序の解明を行った。

4. 研究成果

研究代表者は、上皮系フィーダー細胞との直接共培養によって ATL 細胞に誘導される足場依存性の細胞凝集塊 (Anchorage-dependent multicellular aggregates; Ad-MCAs) の形成が、がん幹細胞マーカーの CD44 を強発現し、多剤耐性因子である MDR1 の発現亢進を示すフェノタイプの ATL 細胞の拡大につながることを見出した。Ad-MCA 形成には ATL 細胞の NF- κ B シグナル経路の活性化が関与し、NF- κ B 阻害剤によって Ad-MCA の形成は劇的に阻害され、CD44 high ATL 細胞の拡大も阻止された。しかし、NF- κ B シグナル経路非依存性の Ad-MCA 形成を伴わない ATL 細胞のフィーダー細胞への接着は残存した。これらの細胞は pro-metastatic protein である vimentin を発現亢進させおり、ATL 細胞の MCA の足場、つまり、フィーダー層へのアンカー (錨) として作用していることが示唆された。Witthaferin A (WFA) 処理による Vimentin フィラメントの攪乱は、ATL 患者由来新鮮 ATL 細胞のフィーダー層への接着および Ad-MCA の形成を有意に抑制した。以上の結果より、このような上皮系フィーダー細胞を使用した invitro モデルは、ATL 細胞が細胞凝集塊として組織浸潤する可能性を示唆し、その際に、より悪性度の高いフェノタイプに変換し得ることを意味していると考ええる。つまり、生体内では組織浸潤した ATL 細胞は容易にいわゆる「がん幹細胞」様の特性を獲得し得ることが示唆され、このような周囲微小環境による ATL 細胞のフェノタイプの変換は、将来、臨床の場において循環型 ATL 細胞と浸潤型 ATL 細胞に対して各々異なる治療戦略の必要性を示唆しているものと考えられる。本成果は、論文 1 および著書 1, 2 にて報告した。

さらに申請者は、同様の現象は PDAC 細胞においても確認した。具体的には、7 種の CD44



【図1】PDAC 細胞集団化によるさらなる治療抵抗性の獲得
 癌の転移や悪性度に関する上皮間葉転換 (EMT) が誘導されていない上皮系形質の PDAC 細胞は、上皮系フィーダー細胞との共培養によって、直径約 100 μm の細胞集合体となり足場依存性多細胞凝集塊 (矢頭) が誘導されるが、間葉系形質の PDAC 細胞では誘導されなかった (A)。PDAC 細胞集合体は、スローセルサイクルとなり、抗癌剤ゲムシタピンへの抵抗性を強めた (B)。

陽性ヒト膵癌細胞株の CD44v パターンを RT-PCR 法にて解析したところ、PCI-55 細胞、PCI-24 細胞、PCI-43 細胞では CD44v3-10high/CD44slow 型、PCI-6、PCI-35 では CD44v8-10high/CD44slow 型、MIA PaCa-2 細胞、PANC-1 細胞では CD44vlow/CD44shigh 型を示した。また、PCI-55、PCI-24、PCI-43 は GM への感受性を示したが、他の細胞株では抵抗性を示した。CD44vhigh/CD44slow 膵癌細胞は HEK293T と一晩直接共培養すると、表面に CD44 を強発現した強固な足場依存性多細胞凝集塊 (Ad-MCAs) を形成した。特に、CD44v3-10high/CD44slow 細胞では単独培養時と比較し、CD44v8-10 の発現亢進を認め、顕著な GM 抵抗性の亢進も認められた。また、PCI-55 では免疫染色において CD44v9 発現の亢進が観察された。一方、CD44vlow/CD44shigh 細胞はそのような現象は認められなかった。さらに、CD44v3-10high/CD44slow 細胞と NHDF が共培養しても形成せず、GM 抵抗性も獲得していなかった。Ad-MCAs を形成した CD44v3-10high/CD44slow 細胞では Ki-67 発現が非常に低下していたことから、細胞静止状態に移行していることが示唆された。重症複合免疫不全 (SCID) マウスに腹腔内移植された PCI-55 細胞は、移植後 1 日で腹膜上に同様の Ad-MCAs を形成し、本現象が *in vivo* でも起こり得ることを確認した。さらに、マイクロアレイ法による網羅的解析を行い、癌幹細胞様特性の獲得に関する分子群の探索を行った。これらのトランスクリプトーム解析の結果、Ad-MCA 形成には約 500 の遺伝子が劇的に変化し、膵癌細胞の Ad-MCA 形成には、多数の遺伝子が複雑に関与していることが示唆された。現在、個々の遺伝子について詳細に解析を行っている。

今回、フィーダーとして用いた HEK293T 細胞は、細胞生物学研究において世界中で広く

使用されており遺伝子改変が容易な非常に扱いやすい細胞であり、今後、本共培養システムを用いることによって、周囲微小環境による癌細胞の難治性性質獲得に関わる詳細な分子機序の解明に貢献する可能性がある。なお、本成果については現在論文再投稿中である。

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 8 件)

1. Miyatake Y (corresponding author), Sheehy N, Ikeshita S, Hall WW, Kasahara M: Anchorage-dependent multicellular aggregate formation induces CD44 high cancer stem cell-like ATL cells in an NF-kappa B- and vimentin-dependent manner. *Cancer Lett.* 357(1):355- 363, 2015, DOI: 10.1016/j.canlet.2014.11.055 (査読有り)
2. Mohamed RH, Sutoh Y, Itoh Y, Otsuka N, Miyatake Y, Ogasawara K, Kasahara M: The SKINT1-like gene is inactivated in hominoids but not in all primate species: implications for the origin of dendritic epidermal T cells. *PLoS One* 10(4):e0123258, 2015, DOI: 10.1371/journal.pone.0123258 (査読有り)
3. Kiuchi S, Ikeshita S, Miyatake Y (corresponding author), Kasahara M: Pancreatic cancer cells express CD44 variant 9 and multidrug resistance protein 1 during mitosis. *Exp. Mol. Pathol.* 97(1): 171- 175, 2015, DOI: 10.1016/j.yexmp.2014.12.001 (査読有り)
4. Kasahara M. The next top models. Ancient immunity. *Cell* 163, 19, 2015 (invited review) <http://www.cell.com/cell/pdf/S0092867415011253.pdf> (DOIなし) (査読無し)
5. Yamada Y, Tomaru U, Ishizu A, Ito T, Kiuchi T, Ono A, Miyajima S, Nagai K, Higashi T, Matsuno Y, Dosaka-Akita H, Nishimura M, Miwa S, Kasahara M: Decreased proteasomal function accelerates cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in mice. *Lab Invest.* 95(6):625-634, 2015, DOI: 10.1038/labinvest.2015.43 (査読有り)
6. Ikeshita S, Miyatake Y (corresponding author), Otsuka N, Kasahara M: MICA/B expression in macrophage foam cells infiltrating atherosclerotic plaques. *Exp. Mol. Pathol.* 97(1):171-175, 2014, DOI: 10.1016/j.yexmp.2014.07.002 (査読有り)
7. Venkatesh B, Lee AP, Swann JB, Ohta Y,

Flajnik MF, Kasahara M, Boehm T, Warren WC : Elephant shark genome provides unique insights into gnathostome evolution. Venkatesh et al. reply. Nature 511(7508):E9-10, 2014, DOI: 10.1038/nature12826 (査読有り)

8. Venkatesh B, Lee AP, Ravi V, Maurya AK, Lian MM, Swann JB, Ohta Y, Flajnik MF, Sutoh Y, Kasahara M, Hoon S, Gangu V, Roy SW, Irimia M, Korzh V, Kondrychyn I, Lim ZW, Tay BH, Tohari S, Kong KW, Ho S, Lorente-Galdos B, Quilez J, Marques-Bonet T, Raney BJ, Ingham PW, Tay A, Hillier LW, Minx P, Boehm T, Wilson RK, Brenner S, Warren WC: Elephant shark genome provides unique insights into gnathostome evolution. Nature 505(7482):174-179, 2014, DOI:10.1038/nature12826 (査読有り)

〔学会発表〕(計 25 件)

1. 池下隼司, 宮武由甲子, 大塚紀幸, 笠原正典: アテローム性動脈硬化症とヒト NKG2D リガンド MICA/B との関わりについての検討. 第 25 回日本組織適合性学会大会, 北海道大学 (北海道・札幌市) 2016.10.22. -24 (口演)
2. 池下隼司, 宮武由甲子, 太田悠介, 楊剣, 大塚紀幸, 笠原正典: 足場依存性多細胞凝集塊 (Ad-MCA) を形成した膵癌細胞は治療抵抗性を獲得する. 第 114 回北海道癌談話会例会, 札幌医大 (北海道・札幌市) 2016.9.3 (口演)
3. 池下隼司, 宮武由甲子, 木内静香, 朴鐘建, 大塚紀幸, 笠原正典: 上皮系形質を持つ膵管腺癌細胞は細胞分裂時に CD44v9 と MDR1 の発現を亢進させる. 第 105 回日本病理学会総会, 仙台国際センター (宮城県・仙台市), 2016.5.12. -14 (口演)
4. Noriyuki Otsuka, Youka Aoki, Namiko Yamamoto, Tomohiko Miyazaki, Yukiko Miyatake and Masanori Kasahara: Contribution of the NKG2D system to murine placental development. 第 44 回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市), 2015.11.18-20 (ポスター発表)
5. 池下隼司, 宮武由甲子, 笠原正典: 上皮系フェノタイプを持つ膵癌細胞では細胞分裂時に CD44v9 と MDR1 の発現が亢進する. 第 74 回日本癌学会学術総会, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市), 2015.10.8-10.10 (口演)
6. 池下隼司, 木内静香, 宮武由甲子, 笠原正典: 膵管腺細胞は細胞分裂時に CD44v9 と MDR1 の発現を亢進させる. 第 112 回北海道癌談話会例会 (腫瘍系分科会), 北海道大学医学部学友会館「フラテ」(北海道・札幌市), 2015.9.12 (口演)
7. 宮武由甲子, Noreen Sheefy, 池下隼司, William W.Hall, 笠原正典: 成人 T 細胞白血病細胞は多細胞凝集塊の形成によって CD44high がん幹細胞様細胞が出現する. 第 104 回日本病理学会総会, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市), 2015.4.30-5.2 (口演)
8. 池下隼司, 宮武由甲子, 朴鐘建, 大塚紀幸, 笠原正典: 上皮系ニッチにおいて多細胞凝集塊 (MCA) を形成した膵癌細胞は治療抵抗性を獲得する. 第 104 回日本病理学会総会, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市), 2015.4.30-5.2 (口演)
9. 朴鐘建, 宮武由甲子, 池下隼司, 大塚紀幸, 笠原正典: 膵がん細胞は血管内皮細胞との細胞接触を介してがん幹細胞マーカーを発現する. 第 104 回日本病理学会総会, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市), 2015.4.30-5.2 (ポスター発表)
10. 池下隼司, 宮武由甲子, 木内静香, 朴鐘建, 大塚紀幸, 笠原正典: 上皮系フェノタイプを持った膵癌細胞では細胞分裂時に CD44v9 と MDR1 の発現が亢進する. 第 104 回日本病理学会総会, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市), 2015.4.30-5.2 (ポスター発表)
11. 大塚紀幸, 青木葉香, 山本菜見子, 宮崎智彦, 宮武由甲子, 笠原正典: 胎盤形成への NKG2D システム関与とそのメカニズムの検討. 第 104 回日本病理学会総会, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市), 2015.4.30-5.2 (ポスター発表)
12. 青木葉香, 大塚紀幸, 山本菜見子, 宮崎智彦, 宮武由甲子, 笠原正典: 胎盤形成への NKG2D システム関与とそのメカニズムの検討, 第 29 回日本生殖免疫学会総会・学術集会, 東京大学伊藤国際学術研究センター (東京都文京区), 2014.12.13 (口演)
13. Yukiko Miyatake, Noreen Sheefy, William W.Hall, Masanori Kasahara: CD44 high cancer stem cell-like ATL cells are expanded by anchorage-dependent multicellular aggregate formation through NF- B signaling. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会, 国立京都国際会館 (京都府・京都市), 2014.12.10-12 (口演)
14. 青木葉香, 大塚紀幸, 宮崎智彦, 宮武由甲子, 笠原正典: 胎盤における NKG2D リガンド発現意義の検討. 第 47 回北海道病理談話会 (病理分科会), 旭川グランドホテル (北海道・旭川市), 2014.10.11 (口演)
15. 宮武由甲子, Sheefy Noreen, 池下隼司, Hall William W., 笠原正典: 成人 T 細胞白血病細胞の足場依存性 multicellular aggregate (MCA) formation によるがん幹細胞様細胞の拡大. 第 47 回北海道病理談話会 (病理分科会), 旭川グランドホテ

- ル(北海道・旭川市), 2014.10.11 (口演)
16. 宮武由甲子, Noreen Sheefy, William W.Hall, 笠原正典: 成人 T 細胞白血病/リンパ腫細胞は足場依存性多細胞凝集塊形成によって CD44 強陽性がん幹細胞様特性を獲得する. 第 73 回日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市), 2014.9.25-27 (口演)
17. 朴鐘建, 宮武由甲子, 笠原正典: 血管内皮細胞との直接共培養は膵がん細胞に PSF1 と CD44vari-nat9 の発現を誘導する. 第 73 回日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市), 2014.9.25-27 (口演)
18. Rania Hassan Mohamed, 須藤洋一, 伊藤靖, 大塚紀幸, 宮武由甲子, 小笠原一誠, 笠原正典: SKINT1 様遺伝子は類人猿では不活性化されているが旧世界猿では機能を保持している. 第 23 回日本組織適合性学会大会, 長崎大学医学部キャンパス(坂本キャンパス)(長崎県・長崎市), 2014.9.13-15 (口演)
19. 池下隼司, 宮武由甲子, 朴鐘建, 大塚紀幸, 笠原正典: 上皮系ニッチに多細胞凝集塊(MCA)を形成した膵癌細胞は治療抗体性を獲得する. 第 110 回北海道病理談話会例会(腫瘍系分科会), 札幌医科大学医学部北第一講義室(北海道・札幌市), 2014.9.13 (口演)
20. 宮武由甲子, Noreen Sheefy, 池下隼司, William W. Hall, 笠原正典: ATL 細胞は NF- κ B シグナル経路を介した足場依存性の multicellular aggregate (MCA) formation によってがん幹細胞様特性を獲得する. 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会, 東京大学医科学研究所 1 号館講堂(東京都港区), 2014.8.22-24 (示説)
21. 宮武由甲子, Noreen Sheefy, William W.Hall, 笠原正典: 成人 T 細胞白血病/リンパ腫(ATL)細胞は足場依存性 multicellular aggregate (MCA) 形成によってがん幹細胞様特性を獲得する. 第 79 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会, 北海道大学医学部学友会館「フラテ」(北海道・札幌市), 2014.6.19-20 (示説)
22. 朴鐘建, 宮武由甲子, 池下隼司, 大塚紀幸, 笠原正典: 血管内皮細胞との直接共培養は膵癌細胞にがん幹細胞様性質を誘導する. 第 103 回日本病理学会総会, 広島国際会議場・ANA クラウンプラザ(広島県・広島市), 2014.4.24-26 (口演)
23. 池下隼司, 宮武由甲子, 朴鐘建, 大塚紀幸, 笠原正典: 上皮細胞存在下でコロニーを形成した膵癌細胞では CD44 バリエーションの発現パターンが変化する. 第 103 回日本病理学会総会, 広島国際会議場・ANA クラウンプラザ(広島県・広島市), 2014.4.24-26 (口演)

24. 宮武由甲子, Sheefy Noreen. Hall W.William. 笠原正典: 成人 T 細胞白血病/リンパ腫(ATL)細胞は正常上皮細胞との相互作用によってがん幹細胞化が誘導される. 第 103 回日本病理学会総会, 広島国際会議場・ANA クラウンプラザ(広島県・広島市), 2014.4.24-26 (口演)
25. 大塚紀幸, 青木葉香, 宮崎智彦, 山本菜見子, 宮武由甲子, 笠原正典: uNK 細胞による NKG2D システムを介した胎盤形成機構の検討. 第 103 回日本病理学会総会, 広島国際会議場・ANA クラウンプラザ(広島県・広島市), 2014.4.24-26 (口演)

〔図書〕(計 2 件)

1. 宮武由甲子 (corresponding author): 正常上皮系細胞との相互作用による ATLL 細胞への癌幹細胞特性の誘導. 『日本臨床』増刊号「リンパ腫学」, 日本臨床社, 177-181, 2015
2. Miyatake Y (corresponding author) and Kasahara M: Anchorage-dependent multicellular aggregate formation induces CD44 high cancer stem cell-like phenotypes in adult T-cell leukemia/lymphoma cells. Inflammation and Immunity in Cancer, 75-84, Springer, 2015

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 細胞培養基材、がん細胞集合体及び該基材を用いたその製造方法、並びに該がん細胞集合体を用いた薬剤のスクリーニング方法

発明者: 宮武由甲子、繁富香織、岡嶋孝治、笠原正典

権利者: 北海道大学

種類: 特願

番号: 2017- 725121

出願年月日: 2017 年 3 月 31 日

国内外の別: 国内

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〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮武 由甲子 (MIYATAKE, Yukiko)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：10421984

(2)研究分担者

笠原 正典 (KASAHARA, Masanori)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30241318

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし