

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462512

研究課題名(和文) 生体親和性多孔性膜(ハニカム膜)を用いた卵巣癌の新規治療戦略と癌幹細胞の樹立

研究課題名(英文) The possibility of 3D porous scaffold honeycomb films for the new strategy of treatment with ovarian cancer

研究代表者

太田 剛(OHTA, Tsuyoshi)

山形大学・医学部・講師

研究者番号：50375341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ハニカム膜は、3D porous scaffoldとも言われ、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、細胞増殖抑制作用はハニカム膜の孔径によって異なり、細胞の大きさと関連があると考えられた。ハニカム膜によって、卵巣癌細胞は丸みを帯び、孔の中に入り込んでいた。接着因子であるビンキュリンの発現は細胞種によって異なることが明らかとなった。細胞外マトリックスの産生量は両面膜で高く、ハニカム膜の細胞接着率を高めるには両面膜が有効であると考えられた。さらに in vivoではハニカム膜によって腫瘍形成が抑制された。

研究成果の概要(英文)：Honeycomb films (HCFs) (3D porous scaffold) exert an influence on cell adhesion and proliferation. The ability of inhibiting cell proliferation by HCFs depended on the diameter of holes, and was related to the size of cancer cells. The cells culturing on 12-16  $\mu\text{m}$  HCFs appeared to be rounded, and settled into the 12-16  $\mu\text{m}$  holes and even divided in these holes. Our data showed that the expression of vinculin relating with cell adhesion was different between SKOV3ip1 and ES2. The duplex HCFs increased the production of extra cell matrix (ECM) compared with the flat films, suggesting that the duplex have the possibility of enhancing cancer cell adhesion to HCFs. In an in vivo ovarian cancer model, 12-16  $\mu\text{m}$  HCFs significantly decreased the tumor weight compared with the control. Further studies are needed to clarify the mechanism of inhibiting cell proliferation by HCFs.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：卵巣癌 ハニカム膜 生体親和性多孔性膜 細胞増殖 細胞接着

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ハニカム膜 (honey-comb film) とは、均一な多孔性膜であり、様々な生体親和性素材から合成することが可能である (Hollister SJ, et al. Nat. Mater 2005)。ハニカム膜は、3D porous scaffolds とも言われ、細胞が接着、増殖していく上での足場となる。使用する生体素材と孔径によりハニカム膜上では、正常細胞は増殖が促進され、癌細胞では増殖が抑制されていることが知られている (Tanaka M, et al. Biochim Biophys Acta 2011)。このハニカム膜の特性を生かし、現在胆管がんの胆道閉塞に対して、ハニカム膜を素材としたステントが開発されすでに臨床応用されている。卵巣癌の再発は腹腔内に播種性病変として発生することが多い。そのため初回可及的腫瘍減量手術後に腹腔内に貼付することで、残存腫瘍の発育と浸潤・転移を抑制し再発を防ぐことができる可能性がある。

(2) ハニカム膜の孔径を変えることで神経幹細胞が、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ている (Tanaka M, et al. Patent application PCT/JP2006/303909)。卵巣がんでも幹細胞の存在が報告され (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。ハニカム膜を用いて、卵巣癌幹細胞を樹立、同定することができれば卵巣癌幹細胞の研究が著しく発展する可能性がある。

## 2. 研究の目的

我々は卵巣癌再発を抑制するための新たな device としてハニカム膜に着目した。ハニカム膜は、癌細胞の増殖を抑制する、癌幹細胞を樹立・同定できる可能性がある。その特性を利用し、初回手術後腹腔内に貼付することで再発を抑制できる新たな治療法を確立できる、さらにその特性から癌幹細胞の機能解析を行うことで治療抵抗性機序の解明につながり、卵巣癌患者の予後を著しく改善できるのではないかという着想に至り、以下の4点を研究目的とした。

(1) ハニ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) ハニカム膜による癌細胞抑制のメカニズムを明らかにする。

(3) ハニカム膜上で癌細胞を培養することで、接着因子・細胞外マトリックスの機能がどのように変化するのかを検討する。

(4) ハニカム膜を用いて癌幹細胞を樹立する。さらに癌幹細胞の機能解析を行い、治療抵抗性の機序を解明する。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト卵巣癌細胞株におけるハニカム膜への接着および増殖抑制効果の検討：ハニカム膜をエア抜きした後、専用培地に24時間浸漬した (プレコンディショニング)。卵巣癌細胞株 (SKOV3ip1) を  $1.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で播種し、3時間及び48時間培養を行った。培養後の細胞を4% Paraformaldehyde-PBS で固定し、スライドガラスに封入し、DAPI (核) および AlexaFluor 488 phalloidin (アクチン) で蛍光免疫染色を行い、共焦点定量イメージサイトメーター-CQ1 (横河電機) にて観察し、核カウントを行った。またハニカム膜にフィブロネクチン (FN) をコーティングする方法としては、Fibronectin (ミリポリ社) 1mg/ml 溶液を 0.01mg/ml に PBS で希釈し、UV 滅菌したハニカム膜を溶液に浸し、37℃ で4H 静置し、その後、培地を入れ20Hのプレコンディショニングを行った。

(2) ハニカム膜による細胞形態変化の検討：上記(1)の方法で播種させた SKOV3ip1 細胞を培養後、1% グルタルアルデヒドで固定し、乾燥させ、走査型顕微鏡 (SEM) (KEYENCE VE-9800) にて観察を行った。

(3) ハニカム膜による細胞接着因子発現変化の検討：上記(1)の方法で培養した SKOV3ip1, ES2 細胞を DAPI (核)、AlexaFluor 488 phalloidin (アクチン)、および Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG (ピンキュリン) で蛍光免疫染色を行い、共焦点定量イメージサイトメーター-CQ1 (横河電機) にて観察し、接着因子の発現変化を検討した。

(4) ハニカム膜による細胞外マトリックス (Extra cell matrix: ECM) 発現変化の検討：ヒト血管内皮細胞 HUVEC と Aortic smooth muscle cell (AoSMC) 細胞を用いてハニカム膜上で HUVEC のみを培養した片面培養とハニカム膜の両面にそれぞれ HUVEC と AoSMC を培養した両面培養を行った。HUVEC の播種後24時間、48時間に上清400ulを培地交換した時の上清、及び培養後の上清全量を回収し、上清サンプルに含まれる浮遊細胞を遠心で除去し、-20℃で保存した。測定前日に4℃に移動して解凍し、Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay Kit (Cloud-Clone社) を用いて collagen type の産生量を測定した。

(5) ハニカム膜による腫瘍形成抑制効果の検討：親水性と柔軟性が高い素材である polyurethane (PU) を用いてハニカム膜を作成した。5~7週令のメスヌードマウスの皮下に卵巣癌細胞 SKOV3ip1 ( $2 \times 10^6$ ) を注入し、腫瘍径が10mmに達した時点で、麻酔下でマウスに皮下切開を加え、形成した腫瘍表面に PU 平膜、PU ハニカム膜 (孔小 (5-8µm)、孔中 (8-12µm)、孔大 (12-16µm)) をそれぞれ貼付し、

皮膚を縫合した。コントロールは手術操作を加えないマウスとした。術後 24 日目に形成した腫瘍を摘出し、腫瘍重量を計測した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ヒト卵巣癌細胞株におけるハニカム膜への接着および増殖抑制効果の検討

Polyethylene terephthalate(PET)で作製した平膜と polyurethane(PU)で作製した平膜およびハニカム膜(孔小(5-8 $\mu$ m)、孔中(8-12 $\mu$ m)、孔大(12-16 $\mu$ m))にフィブロネクチン(FN)のコーティングを行った膜を FN、行わなかった膜を NON と表記した。それぞれの膜に SKOV3ip1 を播種させ、3H, 48H 培養後の細胞数を図 1 に示した。FN をコーティングすることによりそれぞれの膜で NON と比較して 3H での細胞数が増加しており、FN コーティングは初期接着率を上昇させる効果があることが明らかになった。さらに 3H, 48H 培養後の細胞数を比較し、それぞれの膜での増殖率を表 1 に示した。SKOV3ip1 ではハニカム膜の孔径として孔大(12-16 $\mu$ m)において細胞増殖抑制効果が高い可能性が示唆された。ES で同様の実験を行った場合 (data not shown) 孔小(5-8 $\mu$ m)で最も細胞増殖抑制効果が高かった。SKOV3ip1 の核の直径が 15~20 $\mu$ m で細胞面積平均約 1000~2000 $\mu$ m<sup>2</sup>であり、ES2 の核の直径が 10~15 $\mu$ m で細胞面積平均約 300~500 $\mu$ m<sup>2</sup>であることからハニカム膜の細胞増殖抑制効果は孔径と細胞サイズが関連しているのではないかと推察された。

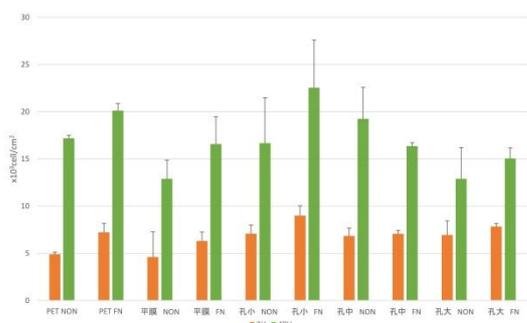


図 1 . ハニカム膜への接着および増殖抑制効果

表 1 . 各膜における増殖率

	増殖率 (%)
PET NON	351.3441
PET FN	278.5064
平膜 NON	279.8095
平膜 FN	263.2312
孔小 NON	235.5019
孔小 FN	250.7317
孔中 NON	281.3462
孔中 FN	231.677
孔大 NON	185.8407
孔大 FN	191.9463

##### (2) ハニカム膜による細胞形態変化の検討

平膜 (FN コーティングなし) およびハニカム膜 (FN コーティングなし、孔小、孔中、孔大) 上で SKOV3ip1 培養し、走査位顕微鏡 (SEM) で観察を行った (図 2)。

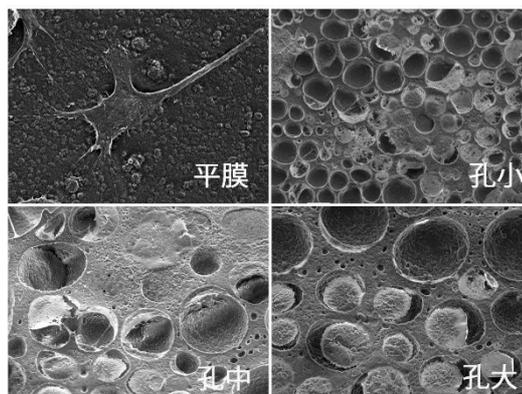


図 2 . 各膜における細胞形態

平膜に比較して孔中、孔大のハニカム膜上で培養することで、細胞は丸みを帯び、孔の中に細胞が入っているものが多くなっていった。孔の中に入っている細胞数は孔大が最も多かった。幹細胞の特徴である sphere の形成は認めなかったが、今後これらの細胞を回収し、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 で確認する予定である。

##### (3) ハニカム膜による細胞接着因子発現変化の検討

SKOV3ip1, ES2 細胞をハニカム膜上で培養後、DAPI (核)、AlexaFluor 488 phalloidin (アクチン) および Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG (ピンキュリン) で蛍光免疫染色を行い、共焦点定量イメージサイトメーター-CQ1 (横河電機) にて観察した (図 3)。

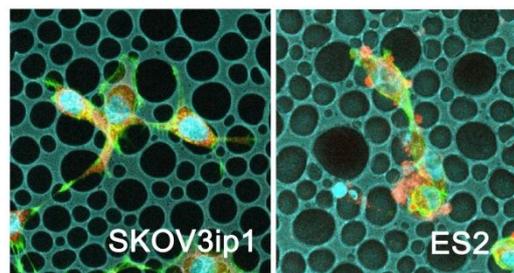


図 3 . 接着因子の発現

SKOV3ip1 ではピンキュリンが細胞全体に発現しているのに対して、ES2 ではピンキュリンが局所で強く発現していた。ピンキュリンの発現は細胞の種類によって変化することが明らかとなった。またこのピンキュリンの発現は孔径によってそれぞれの細胞で違いは認めなかった。

##### (4) ハニカム膜による細胞外マトリックス

(Extra cell matrix : ECM)発現変化の検討  
方法(4)に従って実験を行った。各膜における接着細胞数、細胞接着率、培養液中の collagen type 産生量、細胞1個あたりの ECM 産生量を表2に示した。

細胞接着数、接着率は両面膜両面培養で上昇していた。collagen type の産生量も両面膜両面培養で高かったが、これは接着細胞数が多かったためであり、細胞1個あたりの ECM 産生量としては両面膜片面培養が高かった。この結果から ECM の産生量を上昇させるためには、ハニカム膜を両面膜にした方がよいのではないかと推察された。

ただし、collagen type の蛍光免疫染色の結果をみると(data not shown)、細胞表面でも collagen type が発現しており、この発現が両面膜両面培養で高かったことから、ECM についてはさらに検討が必要と考えられた。

表2 . 各膜による ECM 産生量

	①平膜	②平膜	③片面膜 孔小	④片面膜 孔小	⑤両面膜 片面培養	⑥両面膜 片面培養	⑦両面膜 両面培養	⑧両面膜 両面培養
接着細胞数 (cells/well)	3101.0	4501.5	11103.8	16605.8	4701.6	3351.1	49467.3	37963.2
接着率 (%)	1.0	1.5	3.8	5.8	3.2	2.3	34.7	26.6
ELISA for collagen typeIV (ng/ml)	11.1	11.1	13.4	25.9	38.8	17.1	47.2	53.4
細胞1個あたりの ECM産生量(ng/ml)	0.0035	0.0024	0.0012	0.0015	0.0082	0.0051	0.00095	0.0014

#### (5) ハニカム膜による腫瘍形成抑制効果の検討

5~7週令のメスヌードマウスの皮下に卵巣癌細胞 SKOV3ip1(2×10<sup>6</sup>)を注入し、腫瘍径が10mmに達した時点で、麻酔下でマウスに皮下切開を加え、形成した腫瘍表面に PU 平膜 (Flat, n=5) PU ハニカム膜 (孔小(5-8μm) : Small, n=4、孔中(8-12μm) : Medium, n=4、孔大(12-16μm) : Large, n=5)をそれぞれ貼付し、皮膚を縫合した(図4)。コントロールは手術操作を加えないマウスとした(Sham, n=3)。



①腫瘍形成 ②皮膚切開、ハニカム膜貼付 ③皮膚縫合

図4 . 手術時写真

腫瘍径が10mmに達するまでの日数はそれぞれ群で有意差を認めなかった(図5)。

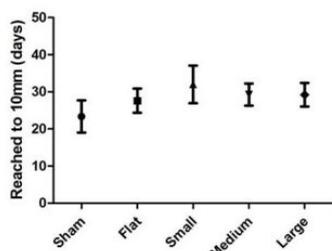


図5 . 10mmに達するまでの日数  
SKOV3ip1ではコントロールに比較して PU 平膜と PU ハニカム膜(孔小、中、大)で腫瘍形成の抑制する傾向を認め、PU ハニカム膜(孔大)ではコントロールと比較し有意差を持って腫瘍形成を抑制した(図6)。

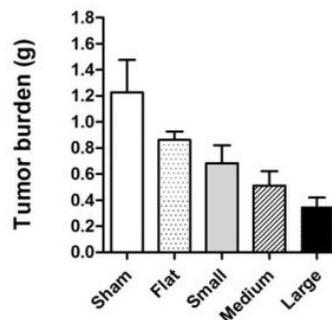


図6 . 摘出腫瘍重量

#### 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6件)

- Matsumura S, Ohta T, Takahashi T, Kurachi H, Nagase S. (他8名、2番目) Activation of estrogen receptor alpha by estradiol and cisplatin induces platinum-resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 2016 Sep 30;0. [Epub ahead of print] DOI: 10.1080/15384047.2016.1235656 (査読有)
- Seino M, Ohta T, Kurachi H, Kitanaka C. (他8名、9番目) Time-staggered inhibition of JNK effectively sensitizes chemoresistant ovarian cancer cells to cisplatin and paclitaxel. *Oncol Rep* 2016;35(1):593-601. DOI: 10.3892/or.2015.4377. (査読有)
- Sakaki H, Ohta T, Kurachi H, Kitanaka C. (他8名、9番目) GSKJ4, A Selective Jumonji H3K27 Demethylase Inhibitor, Effectively Targets Ovarian Cancer Stem Cells. *Anticancer Res* 2015;35(12):6607-14. (査読有)
- Seino M, Ohta T, Kurachi H, Kitanaka C. (他5名、7番目) Differential contribution of ROS to resveratrol-induced cell death and loss of self-renewal capacity of ovarian cancer stem cells. *Anticancer Res.* 2015;35(1):85-96. (査読有)
- Liu Z, Ohta T, Kurachi H. (他5名、3番目) High levels of wilms'tumor 1(WT1) expression were associated with aggressive clinical features in ovarian cancer. *Anticancer Res* 2014;34(5):2331-2340. (査読有)
- Yamanouchi K, Ohta T, Takahashi T, Kurachi H. (他6名、2番目) The Wilms' Tumor Gene WT1 - 17AA/- KTS Splice

Variant Increases Tumorigenic Activity Through Up-Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor in an In Vivo Ovarian Cancer Model. *Transl Oncol.* 2014;7(5):580-9. (査読有)

〔学会発表〕(計4件)

清野 学, 太田 剛, 須藤 毅, 成味 恵, 榊 宏諭, 永瀬 智. JNK 阻害薬を用いた卵巣癌薬剤抵抗性克服の試み. 第58回日本婦人科腫瘍学会 米子コンベンションセンター(鳥取県米子市) 2016.7.8-10

山内敬子, 太田 剛, 松村創平, 高橋俊文, 高橋一広. 卵巣癌におけるWT1variantの腫瘍産生能に関する検討. 第67回日本産科婦人科学会 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2015.4.9-12

太田 剛. 子宮頸部神経内分泌癌 6例の検討. 第66回日本産科婦人科学会 東京国際フォーラム(東京都) 2014.4.18-20

Sohei Matsumura, Tsuyoshi Ohta, Toshifumi Takahashi, Hirohisa Kurachi. Non-sex-cord-stromal ovarian tumors frequently produce and secrete estrogen in postmenopausal women: impact on bone metabolism and abnormal endometrial histology. 第66回日本産科婦人科学会 東京国際フォーラム(東京都) 2014.4.18-20 (IS Award)

〔図書〕(計1件)

太田 剛. 卵巣がん 自覚なく早期発見困難. *がんを知る* 山形大学出版会 2015;p351-352

〔その他〕

ホームページ等

<http://yamagata-obgy.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 剛 (OHTA Tsuyoshi)

山形大学・医学部・講師

研究者番号: 50375341

(2) 研究分担者

高橋 俊文 (TAKAHASHI Toshifumi)

公立学校法人福島県立医科大学・ふくしま

子供・女性医療支援センター・教授

研究者番号: 20302292

倉智 博久 (KURACHI Hirohisa)

山形大学・医学部・非常勤講師

研究者番号: 40153366