

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860609

研究課題名(和文) 悪性胸膜中皮腫細胞と癌間質線維芽細胞間におけるオステオポンチンの役割

研究課題名(英文) Interaction between malignant pleural mesothelioma cells and fibroblasts via enhancement of osteopontin

研究代表者

三好 誠吾 (Miyoshi, Seigo)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20452691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：OPNによる悪性胸膜中皮腫細胞のEMTの変化に焦点を当てて、癌微小環境中の主要な細胞であるCAFと癌細胞との間におけるOPNの役割を解明することを目的とした。2種類の上皮型中皮腫細胞においてOPNの発現を認めた。しかしいずれの細胞株においてもNHLFとの共培養においてEMTとしての形態学的な変化や、E-cadherin、N-cadherin蛋白の発現に差を認めなかった。一方で肺癌細胞株であるA549細胞を使用して同様の検討を行ったところ、形態学的な変化、およびE-cadherinの発現の低下、N-cadherinの発現の上昇を認めた。また共培養における上清中のOPNの濃度は有意な上昇を認めた。

研究成果の概要(英文)：We clarified the role of osteopontin (OPN) in the interaction between fibroblasts and malignant pleural mesothelioma (MPM) cells, especially for the induction of epithelial mesenchymal transition (EMT). Two epithelial MPM cell lines expressed OPN protein. However, we did not confirm the morphological change (like spindle shaped cells), and decrease of E-cadherin expression and increase of N-cadherin expression by coculture of MPM cell lines and human lung fibroblast cell line (NHLF cell). Instead of MPM cell lines, we used non-small-cell lung cancer cell line (A549), and evaluated in the same way as the above methods. A549 cells cocultured with NHLF cells showed increased EMT signaling compared to non-cocultured cells. In addition, the concentrations of OPN in the cocultured supernatant showed significantly increased compared to those in the non-cocultured supernatant. We would like to evaluate the changes of EMT signaling by induction of recombinant human OPN in the next experiment.

研究分野：呼吸器学

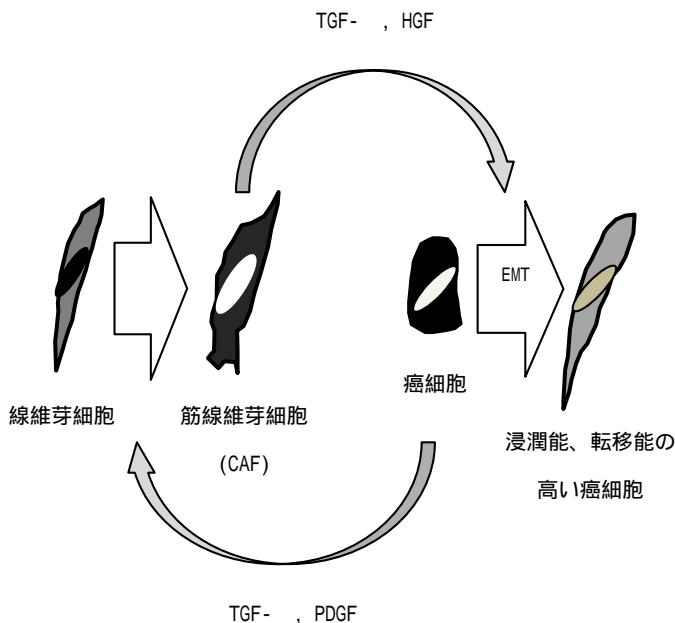
キーワード：上皮間葉移行 オステオポンチン

1. 研究開始当初の背景

癌間質は線維芽細胞、炎症細胞、腫瘍血管、さらに細胞外マトリックスによって構成されている。その中でも癌間質線維芽細胞(以下 CAF)は癌間質の主要な構成細胞であり、癌細胞と CAF の共培養や、マウスへの混合移植モデルを活用した研究によって、癌細胞と CAF は互いに癌の進展を多面的に促進させていることが証明されている。CAF の多くは筋線維芽細胞のマーカーである α -SMA を発現していることが知られている。線維芽細胞から筋線維芽細胞(CAF)への分化には癌細胞からの刺激が関与している。特に癌細胞から産生される TGF- β によって線維芽細胞から筋線維芽細胞(CAF)への分化が誘導され、PDGF によって遊走や増殖が促進される。さらに CAF は TGF- β や HGF などを生産し、癌細胞の上皮間葉移行(EMT)に関与していることが報告されている(図. 1)。

一方で OPN は、骨組織のマトリックスを構成する非コラーゲン性蛋白であり、TGF- β の刺激により、OPN が誘導されることが報告されている。また腫瘍組織における OPN の役割としては、腫瘍細胞のアポトーシスの抑制、接着能、遊走能の増強などが報告されている。また腫瘍微小環境に対しては、MMP2 や uPA の発現の増加や、血管内皮細胞の誘導などを介した腫瘍血管新生の増加などの報告がある。申請者らは腫瘍組織における TGF- β の作用の一部が OPN を介した作用ではないかと考えた。血清 OPN は悪性胸膜中皮腫において、活動性の指標になることがすでに報告されており、OPN が悪性胸膜中皮腫の病態に関与していると考えられるが、癌微小環境に対しての機序自体はいまだ不明な点が多い。

【図. 1】

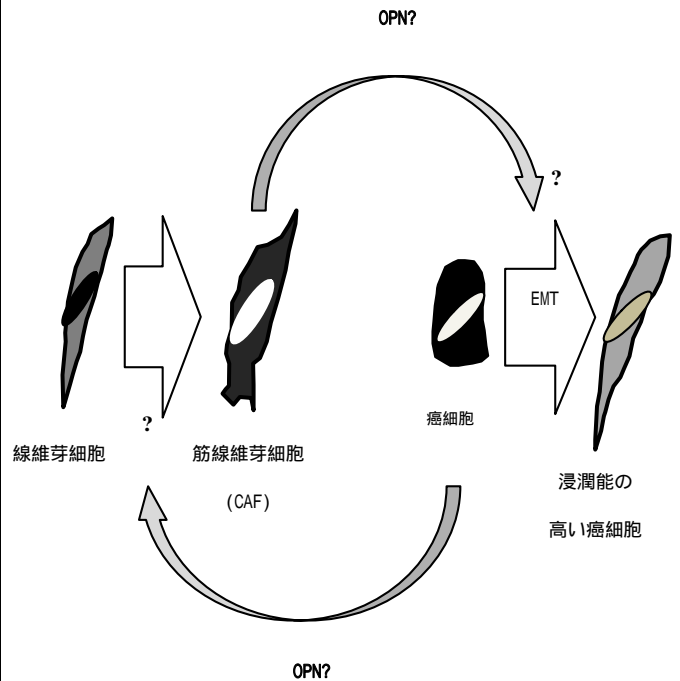


2. 研究の目的

OPN による癌細胞の EMT の変化に焦点を当て

て、癌微小環境中の主要な細胞である CAF と癌細胞との間における OPN の役割を解明することを目的とした(図. 2)。

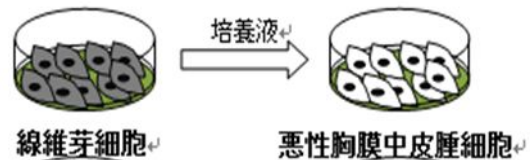
【図. 2】



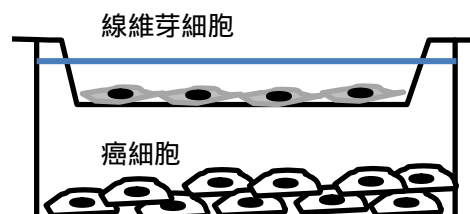
3. 研究の方法

(1) まず悪性胸膜中皮腫細胞および、線維芽細胞の OPN の発現を Western Blot 法で確認する。

(2) 線維芽細胞を無血清培地で培養した上清(condition medium: 以下 CM)を用いて中皮腫細胞を培養し、上記因子の発現の変化を蛍光免疫細胞染色で評価し、E-Cadherin、N-Cadherin、OPN の発現の変化を control 群(通常の無血清培養液で培養した群)と比較する。またその際の上清中の OPN の濃度を ELISA 法で比較する。



(3) 同様に共培養用のキットを用いて、線維芽細胞と中皮腫細胞の共培養を行い、同様の検討を行う。



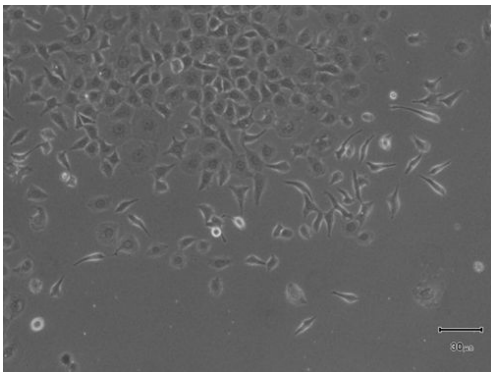
4. 研究成果

(1) 中皮腫細胞における OPN の発現

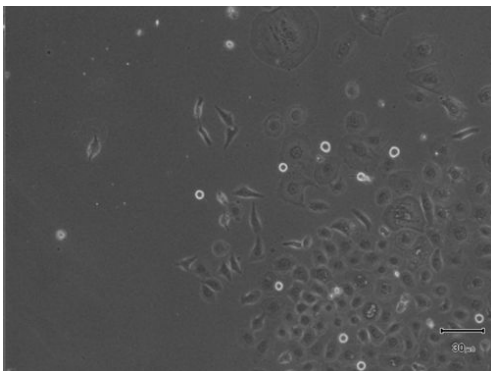
NCI-H2452(上皮型)、ACC-MESO-4(上皮型)の2種類の悪性胸膜中皮腫細胞を使用した。いずれの細胞株においても Western Blot 法で OPN の発現を認めた。

(2) CM で培養した際の中皮腫細胞の EMT の変化

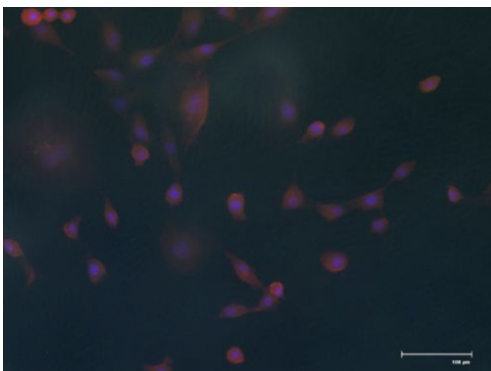
線維芽細胞は NHLF 細胞株を使用した。CM を用いて中皮腫細胞を培養したが、EMT としての細胞の顕微鏡的形態学的変化は認めなかった。また、蛍光免疫細胞染色においても、CM による培養群、control 群で E-cadherin、N-cadherin の変化は同等に認め、両者に差を認めなかった。



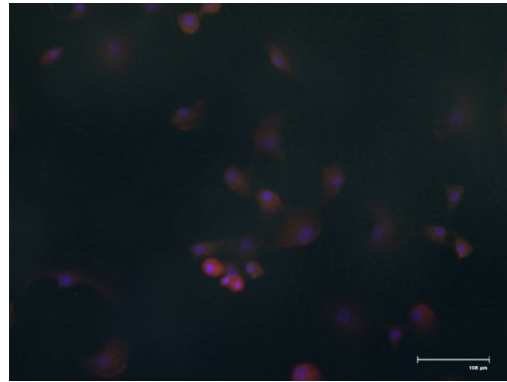
無血清培地で培養(ACC-MESO-4)



CM で培養(ACC-MESO-4)(いずれも紡錘形の細胞に変化している)



無血清培地で培養した際の免疫蛍光細胞染色(ACC-MESO-4)(緑, E-cadherin; 赤, N-cadherin; 青, 核)



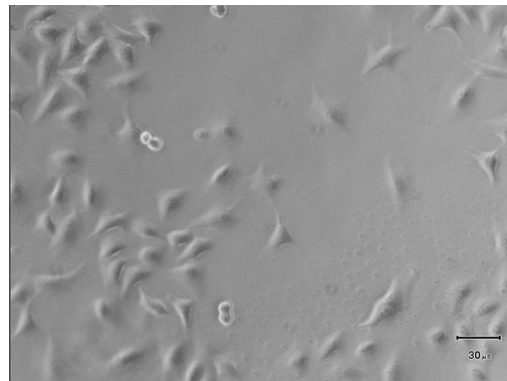
共培養下での免疫蛍光細胞染色(ACC-MESO-4)(緑, E-cadherin; 赤, N-cadherin; 青, 核)

(3) 線維芽細胞との共培養下での悪性胸膜中皮腫細胞の EMT の変化

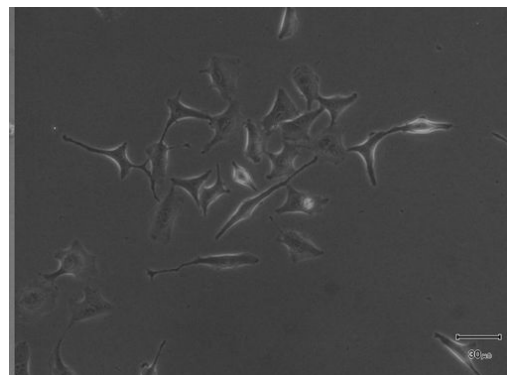
共培養用のキットを用いて検討を行ったが、同様の結果であった。

(4) 肺癌細胞株での EMT の変化と OPN の関連の可能性

・上皮型の悪性胸膜中皮腫細胞では EMT の変化を見ることができなかつたため、細胞株を肺癌の A549 に変更し、同様の検討を行った。NHLF との共培養により、3 日目で形態学的な変化を認め、また E-cadherin の発現の低下、N-cadherin の発現の上昇を認めた。また上清中の OPN の濃度上昇を認めた。

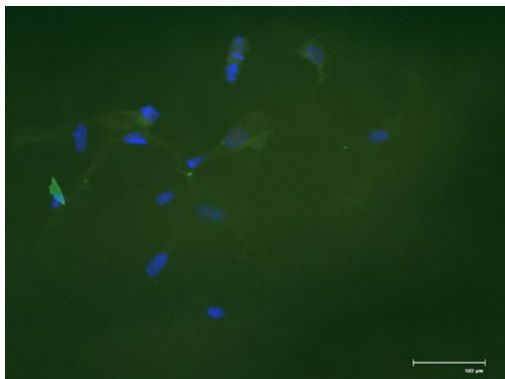


無血清培地で培養

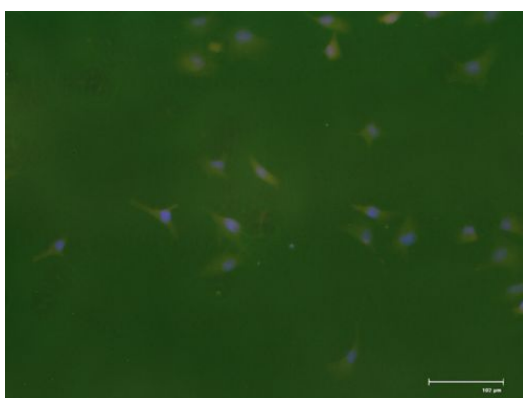


NHLF との共培養(無血清培地よりもより紡

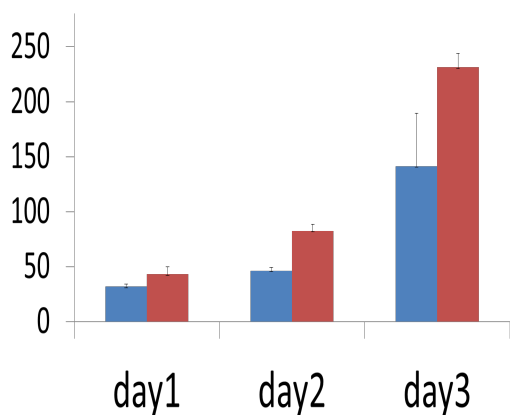
錘形に変化している)



無血清培地で培養した際の免疫蛍光細胞染色(緑, E-cadherin; 赤, N-cadherin; 青, 核)



共培養下での免疫蛍光細胞染色(緑, E-cadherin; 赤, N-cadherin; 青, 核)



培地上清中の OPN の濃度(ng/ml) (青, 無血清培地で培養; 赤, 共培養で培養)

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三好 誠吾 (Miyoshi, Seigo)
愛媛大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 20452691

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし