

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461937

研究課題名(和文) 新しい癌細胞初代培養系(CTOS法)を用いた癌細胞の休眠状態と放射線感受性の検討

研究課題名(英文) Radiation sensitivity in dormant tumor cells using a novel primary culture system

研究代表者

遠藤 洋子(Endo, Hiroko)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター(研究所)・研究所・研究員

研究者番号：20359300

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌患者由来のスフェロイド(CTOS)は、低酸素かつ増殖因子非存在下で可逆的な休眠状態に陥る。大腸癌CTOSは高分化型腺癌の性質を維持しており、培養条件によって幹細胞性/分化マーカーの遺伝子発現は大きく変化する。

本研究では、大腸癌CTOSの放射線感受性試験を樹立し、休眠状態のCTOSの放射線感受性と幹細胞性/分化の関連を検討した。休眠状態のCTOSは通常培養条件下と比較して放射線抵抗性を示すが、腸管上皮細胞の幹細胞性マーカーと分化マーカーを同時に高発現していた。休眠状態のCTOSでは、分子酸素の欠乏に加えて、幹細胞性/分化の揺らぎという生物学的要因が放射線抵抗性を誘導する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：CTOS (cancer tissue-originated spheroid) from colorectal cancer patients entered a reversible dormant status when cultured in hypoxia and growth factor deprived conditions. CTOS retained the characteristics of highly differentiated adenocarcinoma, and the expression of stemness or differentiation genes changed drastically depending on the culture conditions.

In the present study, we established a radiation sensitivity assay using colon cancer CTOS. CTOS in dormant status showed radiation resistance compared to the normal culture conditions, and dormant CTOS showed high expression of stemness and differentiated genes at the same time. In addition to the well-known radio-resistant mechanism, such as cell cycle arrest and hypoxia, dormant CTOS might gain the radiation resistance through the fluctuation of stemness and differentiation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：大腸癌 放射線感受性 休眠状態

1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織内の低酸素環境は、がんの治療抵抗性や浸潤能の亢進など、がんの悪性化と深く関わっている。特に放射線治療においては、分子酸素の欠乏やがん細胞の細胞分裂の低下が放射線抵抗性を誘導すると考えられている。近年、Hypoxia inducible factor 1 (HIF1) によってマーキングされた低酸素領域の癌細胞が、放射線治療後に再び増殖することが示された (Harada 2012 Nature Commun)。つまり、癌細胞は低酸素下で可逆的に休眠状態 (dormant status) になり、血流の改善などによって再酸素化された場合には再び増殖を始めて、腫瘍再発の原因となることが実証された。

癌細胞が低酸素下で可逆的に休眠状態に陥るメカニズムを研究することは、放射線治療の効果を向上させるために極めて重要である。しかし、従来の二次元培養の実験系では、多くの癌細胞株は低酸素下でも細胞増殖を停止せず、長期の休眠状態を in vitro で再現することができない。癌細胞の休眠状態と放射線感受性を研究するための、新しいプラットフォームが必要である。

我々が新しく確立した癌細胞初代培養系 Cancer Tissue Originated Spheroid 法 (CTOS 法) は、cell-cell contact を維持したまま癌細胞塊を調製するもので (図 1)、臨床腫瘍検体から高い純度と viability で癌細胞の初代培養が可能である。(Kondo 2011 PNAS, Endo 2013 JTO)。これまでに、大腸癌、肺癌、膀胱癌、子宮頸癌、膵癌、および乳癌などから CTOS が得られている。

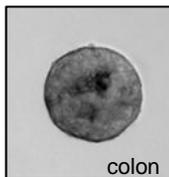


図 1. 大腸がん CTOS

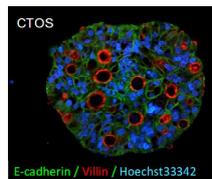


図 2. 三次元培養で分化した大腸がん CTOS

< 休眠状態と癌幹細胞性 >

腫瘍内のがん細胞は一様な細胞集団ではなく、増殖能や治療反応性にも大きな差があると考えられる。このがん細胞の heterogeneity をがん幹細胞 (Cancer Stem Cell: CSC) 仮説の視点からみると、腫瘍内のがん細胞は CSC を頂点とした hierarchy を形成しており、CSC のみが自己複製能と多分化能を持ち、治療抵抗性および再発の原因となる。一方、CSC は固有の亜集団として存在するのではなく、癌細胞の中で可塑的に変化する「幹細胞性」という性質を指しているという考え方も報告されている (Vermeulen 2010 Nat Cell

Biol)。

大腸がん CTOS を三次元培養すると、管腔側に Villin の発現を伴う極性を持った腺管構造 (分化形質) を観察することができる (Kondo 2011 PNAS 図 2)。この分化形質を示す CTOS もマウスに造腫瘍性があることから、CTOS 内の癌細胞は幹細胞様細胞と分化細胞を内包した heterogeneous な細胞集団であり、癌組織における癌細胞そのものが再現されている可能性がある。大腸がんはほとんど分化型腺癌であることから、CTOS は未分化な細胞株を使った研究とは異なった、より実際の大腸がんに近い実験系となり得る。

大腸がんの CTOS を低酸素 (1%O<sub>2</sub>)、growth factor 非存在下で培養すると、CTOS は可逆的な休眠状態に陥った (図 3、Endo 2014 PLoS ONE)。この休眠状態の CTOS は、腸管上皮幹細胞性マーカーである LGR5 が高発現しており、かつ分化マーカーである ALPi の発現も上昇していた (図 4、未発表データ)。つまり、CTOS は増殖に伴って分化する細胞集団であるが、休眠状態の CTOS には「幹細胞性」と「分化」という相反する性質が共存している可能性が示唆された。

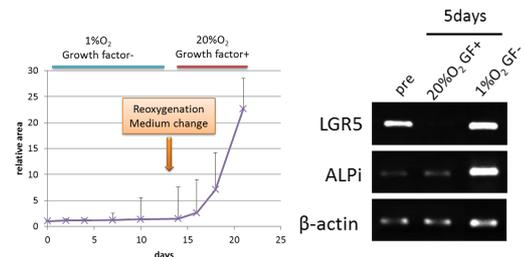


図 3. CTOS の休眠状態と再増殖

図 4. 培養条件の違いによる遺伝子発現の差

2. 研究の目的

CTOS は臨床腫瘍検体の heterogeneity を反映した実験系であり、かつ分化を観察できる系である。CTOS をプラットフォームとすることで、癌の休眠状態と幹細胞性・分化、および放射線感受性について新たな知見が得られることが期待される。

一般的に、正常の腸管上皮幹細胞は分裂能が高く放射線感受性であるのに対し (Potten 2009 Cell Prolif) CSC は放射線抵抗性であると報告されている (Bao 2006 Nature, Kawamoto 2012 Exp Ther Med)。「休眠状態の CTOS の放射線抵抗性は、CTOS 内の癌細胞が示す幹細胞性と分化の共存と関連している」との仮説をたて、本研究では CTOS の休眠状態の誘導、および幹細胞性・分化の可塑性を制御するシグナルを解析し、癌細胞の放射線治療抵抗性のメカニズムを解析する。

### 3. 研究の方法

#### (1) CTOS の調製

大阪府立成人病センターにてインフォームド consentにより同意を得られた患者より提供を受けた外科の手術検体より、マウスゼノグラフトモデルを作製した。マウス移植腫瘍を機械的、酵素的に分散し、フィルターを通して大きな断片を取り除いた。その後、さらに 100  $\mu$ m、40  $\mu$ m のセルストレイナー (BD FALCON) を通過させ、セルストレイナーの上に残った小断片 (Organoid) を StemPro® hESC (GIBCO) 中で培養した。

#### (2) CTOS を用いた放射線感受性試験

CTOS をマトリゲル growth factor reduced (GFR) に 1 CTOS/well ずつ、96well plate に撒き、StemPro で培養した。X 線照射装置 (日立) を用いて X 線を照射した。放射線感受性は、14 日後に 5 倍以上の増殖を示した CTOS 数で評価した。

#### (3) 遺伝子発現解析

CTOS を 20%O<sub>2</sub> または 1%O<sub>2</sub>、増殖因子存在下または非存在下で培養し、遺伝子発現の変化を RT-PCR で検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 大腸癌 CTOS の休眠状態の誘導

大腸癌患者由来 CTOS (C45) を 20%O<sub>2</sub> または 1%O<sub>2</sub>、増殖因子存在下または非存在下で培養し、CTOS の増殖を調べた。大腸癌 CTOS は 1%O<sub>2</sub>、増殖因子非存在下で休眠状態が誘導された (図 5, Endo 2014 PLoS ONE)。この休眠状態は可逆的であり、再酸素化して増殖因子を加えることで、再び活発に細胞増殖を開始した (図 6)。

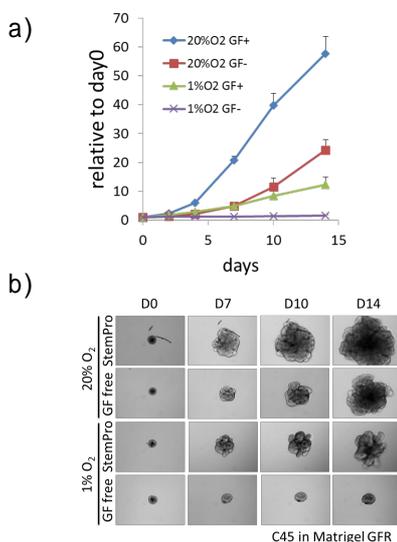


図 5. 各培養条件における CTOS の増殖率 (a) と位相差顕微鏡写真 (b)

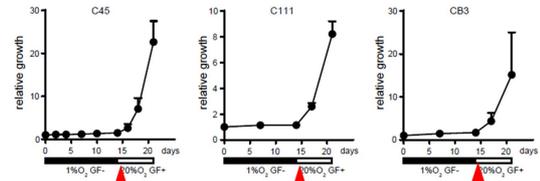


図 6. 再酸素化 (赤矢印) による CTOS の再増殖

#### (2) 休眠状態の CTOS における分化/幹細胞性遺伝子の発現

C45 を各培養条件で培養し、分化/幹細胞性マーカーの遺伝子発現を RT-PCR で検討した (図 7、未発表データ)。Preliminary な検討 (図 4) と同様に、休眠状態の CTOS は幹細胞性マーカーの発現が高く保たれ、かつ分化マーカーの発現も継続的に増加した。しかし、これらの遺伝子発現の変化は、20%O<sub>2</sub>、増殖因子非存在下でも同様に起こることから、低酸素による影響ではなく、増殖因子欠乏という条件が誘導したものであると考えられた。

また、CTOS の遺伝子発現の変化は培養条件によって著しく変動し、かつ可塑的であることが示唆された。

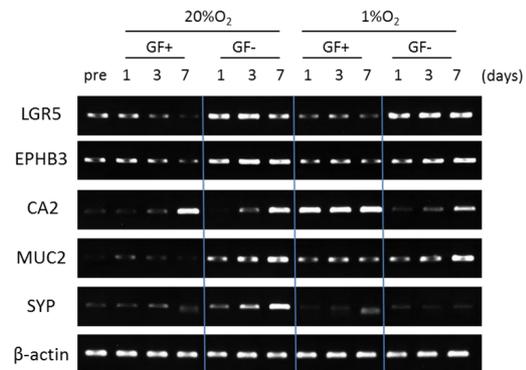


図 7. 各培養条件による継続的な遺伝子発現の変化

#### (3) 休眠状態の CTOS における Cancer Stem Cell marker の発現

大腸癌の Cancer Stem Cell marker として、CD133, CD44, ALDH 等が報告されている。C45 を各培養条件で 7 日間培養し、CSC マーカーの発現をフローサイトメーターで測定した (図 8)。その結果、CD44, ALDH は低酸素で発現が低下する傾向にあり、CD133 は 1%O<sub>2</sub> GF+ で高発現するものの、休眠状態 (1%O<sub>2</sub> GF-) では発現が低下した。

いずれのマーカーも、休眠状態の CTOS で幹細胞性が上昇しているという結果は得られなかった。

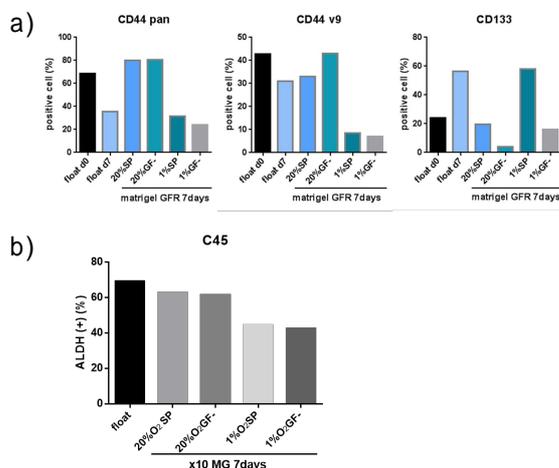


図8. 各培養条件下でのCSCマーカーの発現(a)とALDH活性(b)

#### (4) CTOS を用いた放射線感受性試験の確立

従来の癌細胞株を用いた放射線感受性試験は、コロニー形成試験で行うのが一般的である。しかし、CTOSは単細胞化することで急激に細胞死するので(Kondo 2011 PNAS) 癌細胞株と同様のコロニー形成試験は困難である。そこで、新たに放射線による分裂死を評価するCTOSの実験系を立ち上げた。CTOSを96ウエルプレートに1CTOS/ウエルで撒き、9Gy照射後14日目に5倍以上大きくなったCTOSの数を評価した。

通常培養条件下では、9Gyの照射で約10%程度のCTOSが再増殖する。

まず、休眠状態のCTOSと通常培養条件下のCTOSの放射線感受性を比較した。7日間1%O<sub>2</sub>、増殖因子非存在下でpre-cultureしたCTOSを、再酸素化し、9Gyを照射した。その後、増殖因子含有培地(StemPro)に培地交換し、再増殖を促した。その結果、休眠状態にあったCTOSは、通常培養条件下のCTOSに比べて再増殖するCTOSの割合が高く、放射線抵抗性であることが確認された(図9、未発表データ)。

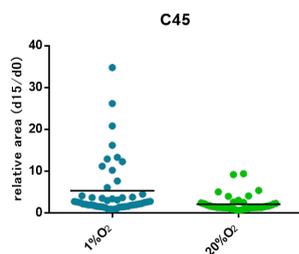


図9. 休眠状態(1%O<sub>2</sub>)と通常培養条件(20%O<sub>2</sub>)のCTOSの9Gy照射後の再増殖

以上の結果より、低酸素、増殖因子非存在下で休眠状態にある大腸癌CTOSは、腸管上皮細胞の幹細胞性マーカーと分化マーカーの遺伝子を同時に高発現していることが確認できた。しかし、この遺伝子発現の変化は低酸素によるものではなく、むしろ増殖因子非存在下という培養条件がもたらしたものであることも明らかとなった。

休眠状態にあるCTOSは放射線抵抗性であるが、従来の癌幹細胞マーカーであるCD44、CD133、ALDH等の発現はむしろ低く、休眠状態のCTOSが癌幹細胞的性質を強く発現しているとは言えなかった。

しかし、分化型腺癌の特徴を維持している大腸癌CTOSは癌細胞の分化度と放射線感受性を研究するうえで有用なプラットフォームである。今後、低酸素にとらわれることなく、癌の分化状態の変化と放射線感受性についてさらに検討を進める。

#### 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5件)

Yoshida T, Okuyama H, Nakayama M, Endo H, Tomita Y, Nonomura N, Nishimura K, Inoue M.

Dynamic Change in p63 Protein Expression during Implantation of Urothelial Cancer Clusters.

**Neoplasia**. 査読(有) 2015 Jul;17(7):574-85. doi: 10.1016/j.neo.2015.07.004.

Kimura M\*, Endo H\*, Inoue T, Nishino K, Uchida J, Kumagai T, Kukita Y, Kato K, Imamura F, Inoue M.

\*equally contributed

Analysis of ERBB ligand-induced resistance mechanism to crizotinib by primary culture of lung adenocarcinoma with EML4-ALK fusion gene.

#### **J Thorac Oncol**. 査読(有)

2015 Mar;10(3):527-30. doi: 10.1097/JTO.0000000000000381.

Nakajima A, Endo H, Okuyama H, Kiyohara Y, Kimura T, Kamiura S, Hiraoka M, Inoue M.

Radiation sensitivity assay with a panel of patient-derived spheroids of small cell carcinoma of the cervix.

**Int J Cancer.** 査読(有)  
2015 Jun 15;136(12):2949-60.  
doi: 10.1002/ijc.29349.

Yoshida T, Okuyama H, Nakayama M,  
Endo H, Nonomura N, Nishimura K,  
Inoue M.

High-dose chemotherapeutics of  
intravesical chemotherapy rapidly induce  
mitochondrial dysfunction in bladder  
cancer-derived spheroids.

**Cancer Sci.** 査読(有)2015 Jan;106(1):69-77.  
doi: 10.1111/cas.12567.

Endo H, Okuyama H, Ohue M, Inoue M.

Dormancy of cancer cells with suppression  
of AKT activity contributes to survival in  
chronic hypoxia.

**PLoS One.** 査読(有)  
2014 Jun 6;9(6):e98858.  
doi: 10.1371/journal.pone.0098858.

[学会発表](計7件)

遠藤洋子  
MIG6 contributes to hypoxia-induced  
dormancy in primary cultured lung  
cancer cells with EGFR active  
mutation  
第74回日本癌学会学術総会  
平成27年10月8日、名古屋国際会議場

遠藤洋子  
MIG6はEGFR活性変異型肺がん細胞の  
低酸素による休眠状態誘導に寄与する  
第13回がんとハイポキシア研究会  
平成27年6月5日、国立遺伝学研究所(三  
島)

遠藤洋子  
肺がん初代培養細胞における低酸素下休  
眠状態の誘導メカニズム  
第12回がんとハイポキシア研究会  
平成26年11月21日、ホテルマリターレ  
創世佐賀

遠藤洋子  
Assessment of individual resistant  
mechanism for ALK kinase inhibitor  
using a primary culture system  
第73回日本癌学会学術総会  
平成26年9月25日、パシフィコ横浜

遠藤洋子  
低酸素環境下における癌細胞の休眠状態  
の誘導

第2回癌と代謝研究会  
平成26年7月10日、東京理科大学

遠藤洋子  
癌細胞初代培養系(CTOS)における低  
酸素による休眠状態の誘導  
第11回がんとハイポキシア研究会  
平成25年12月13日、東北大学

遠藤洋子  
Neuregulin1 / HER3 signaling  
promotes the growth of primary cancer  
cells of lung adenocarcinoma in vitro  
第72回日本癌学会学術総会  
平成25年10月3日、パシフィコ横浜

[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]  
大阪府立成人病センター ホームページに  
掲載  
[http://www.mc.pref.osaka.jp/omc2/bioche  
mistry.html](http://www.mc.pref.osaka.jp/omc2/biochemistry.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

遠藤 洋子(Hiroko Endo)  
地方独立行政法人 大阪府立病院機構  
大阪府立成人病センター(研究所)・  
研究所・研究員  
研究者番号: 20359300

### (2) 研究分担者

井上 正宏(Masahiro Inoue)  
地方独立行政法人 大阪府立病院機構  
大阪府立成人病センター(研究所)・  
研究所・部長  
研究者番号: 10342990

### (3) 連携研究者

なし