

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20142

研究課題名(和文)腎細胞がん微小環境における骨髄由来間葉系幹細胞の機能解明

研究課題名(英文)Functional analysis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in renal cell carcinoma microenvironment

研究代表者

北野 弘之(Kitano, Hiroyuki)

広島大学・病院(医)・助教

研究者番号：60721933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)にPKH Red Fluorescentにより標識をした。ルシフェラーゼ安定発現株の腎細胞癌株であるCaki-1を用いて同所移植モデルマウスを作成し、尾静脈から標識したMSCを経静脈投与した。現在、共焦点顕微鏡を用いた免疫染色により、MSCの分化した細胞を特定中である。Caki-1とMSCを、IncuCyte Zoom 2015の観察下で共培養した。Caki-1はMSCのCondition mediumによる培養では、細胞増殖能の上昇を認めず、MSCとの直接接触により上昇を認めた。引き続き、遊走能の変化について検討中である。

研究成果の概要(英文)：Bone marrow derived mesenchymal stem cells were labeled with PKH Red Fluorescent. Orthotopically transplanted model mice were prepared using a renal cell carcinoma cell line of a luciferase stable expression strain, and MSCs labeled from the tail vein were intravenously administered. Currently, differentiated cells of MSC are being identified by immunostaining using a confocal microscope. Caki and MSC were cocultured under the observation of IncuCyte Zoom. Caki did not show an increase in cell proliferation ability when cultured under the condition medium of MSC, but was elevated by direct contact with MSC. Subsequently, changes in migratory ability are under consideration.

研究分野：泌尿器科

キーワード：骨髄由来間葉系幹細胞 腎細胞癌 癌微小環境

1. 研究開始当初の背景

近年、がんの増殖・進展において「がん微小環境」という注目すべき概念が提唱されている。間質は、癌関連線維芽細胞 (carcinoma-associated fibroblast : CAF)、細胞外基質、免疫細胞、血管周囲の周皮細胞などにより構成されており、がん発症における役割が解明されつつある。これらの細胞は正常細胞を起源としているため、不安定な遺伝子を持つがん細胞と異なり、薬剤に対して耐性を持ちにくい。そのため、がんの進行を促さず間質細胞を標的とした薬物療法は、長く治療効果が望めるのではないかと考えられている。また、MSC は骨や血管や心筋などの間葉系細胞に分化することが知られている。しかし間質ではどのような細胞に分化するか明らかでなく、例えば、がんの間質で活性化した線維芽細胞である CAF の起源は証明されていない。しかし、最近になりマウス骨髄移植モデルを用いた研究により、骨髄由来細胞が腫瘍組織内に特異的に集積しているという結果から、CAF は骨髄由来の可能性が示唆されており、その役割についても研究が進められている。

私たちは、これまでに腎細胞がんの PDGF-PDGF 受容体を介したがん細胞と間質の相互作用を明らかにしてきた。さらに TK 阻害剤は主にがん細胞ではなく間質を抑制している事を明らかにした。しかし、実際の臨床で使用される TK 阻害剤の治療効果は一時的で奏効率も低く、また間質の反応すべてを包括的に治療標的とすることは難しい。

これらの研究成果を踏まえて、間質細胞に分化する前の前駆細胞である骨髄由来間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell : MSC) が、腎細胞がんの増殖・進展に深く関わっており、治療標的となるのではないかと考え、研究計画をたてた。

2. 研究の目的

近年、がんの増殖と進展には、がん細胞と間

質細胞の相互作用が重要であることが証明された。私たちは、この報告に注目し、腎細胞がんの間質が PDGF 受容体を介して活性化される事を見だし、さらに、癌関連線維芽細胞や周皮細胞が PDGF 受容体を発現し、スニチニブにより抑制される事を証明した。本研究では、これらの成果を踏まえ、より前駆的な骨髄由来間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell : MSC) に着目し、以下の 3 点を明らかにする事を目的とした。

[1] 腎細胞がんの間質において、MSC から分化する細胞の同定

[2] がんの進行における MSC の役割を解明し、がん細胞と MSC の相互作用に関わる物質の同定

3. 研究の方法

(1) 腎細胞がんの間質において、MSC から分化する細胞の同定

(a) 動物モデル作製

ルシフェラーゼ安定発現株の腎細胞癌株 (Caki-1 : 高増殖株) を使用する。

腎被膜下 (同所性移植) に 1×10^6 個の細胞を移植する。IVIS® (Caliper-PerkinElmer) の発光モードにより腫瘍形成を確認したら、尾静脈から蛍光色素 (GFP) により標識された MSC を経静脈投与する。MSC の組織内への取り込みは、IVIS の発光モードを用いて確認する。また MSC に GFP の組み入れが困難であった場合には PKH を用いて標識する。

(b) MSC の分化する細胞の病理学的評価

CAF や周皮細胞は PDGF 受容体と -smooth muscle actin (SMA) や desmin をそれぞれ発現している。そのほか、腎細胞がんでは血管内皮細胞は CD31、リンパ管内皮細胞は LYVE-1 を発現している。GFP を導入した MSC を用いるため、共焦点蛍光顕微鏡を用いた蛍光 2 重免疫染色により、どのような細胞に分化したかを観察する。

(2) がんの進行における MSC の役割を解明

(a) Boyden chamber を用いた MSC の運動能

の解明

Boyden chamber の上室に MSC を下室にがん細胞を培養する。フィルターを通過する MSC を計測して遊走能を評価する。また上下逆に培養し、浸潤能を評価する。

(b) 動物モデルを用いた MSC の機能解明

がん細胞と MSC を混合して同所移植し、がん細胞とヒト線維芽細胞を混合した移植モデルと比較する。混合する MSC の細胞数は 3 群 (1×10^1 、 1×10^3 、 1×10^5) に振り分けて、移植組織の癌細胞数や体積や転移の有無に変化を認めるか、IVIS による評価と病理組織学的に評価する。

また移植組織からがん細胞を分離して、in vivo culture を行う。つまり腎被膜下という臓器環境で MSC の影響を受けたがん細胞株を樹立する。

(3) がん細胞と MSC の相互作用に関わる物質の同定

(a) MSC が、がん細胞の増殖や運動能に及ぼす影響

腎臓で MSC との相互作用を受けた細胞株と、相互作用を受けていない移植前の細胞株を用いて MTT assay と migration/invasion assay を行う。

(b) がん細胞と MSC の間に起こるシグナル経路の解明

がん細胞と MSC を共培養して、あるいはがん細胞のコンディションメEDIUM を MSC の培養液にして MSC がどういった細胞に分化するか経時的に評価する。また MSC の分化には液性因子だけでよいか、がん細胞との接着によるシグナル応答が必要か検討する。

(c) がん細胞と MSC に相互作用する分子を特定する

がん細胞と MSC を共培養することで過剰産生される増殖因子やサイトカインを網羅的に解析する。共培養で得られた培養上清、癌細胞のみの培養上清、MSC のみの培養上清

の 3 群をサイトカインアレイを用いて比較する。さらに確認のため、共培養後の癌細胞と MSC の各々から RNA を抽出して RT-PCR 法を施行、また Western blotting により蛋白発現を確認して、がん細胞、もしくは MSC のどちらが産生しているかを明らかにする。

4. 研究成果

レンチウイルスを用いて GFP を MSC に挿入した。共焦点顕微鏡による観察で、GFP は MSC の遺伝子に組み込まれたが、MSC の細胞増殖能が低く、複数匹のマウスの尾静脈から経静脈的に投与する際に必要な細胞数の確保が困難であった。そのため、PKH Red Fluorescent により標識した MSC を作成した。ルシフェラーゼ安定発現株の Caki-1 を用いていたが、ルシフェラーゼの発光は、マウスの酸素化などの生体状態に大きく影響を受ける事を危惧して、癌細胞に GFP を組み入れた。

まずは、GFP 安定発現株の腎細胞癌株である Caki-1 を 10^6 個ほど、マウスの左腎被膜下に移植した。移植して 2 週間後に IVIS を用いて、腎腫瘍ができていることを確認し、同所移植モデルマウスが作成できていることを確認した。

その後、尾静脈から PKH Red Fluorescent により標識された MSC を 10^4 個ほど経静脈投与したグループと、生食を尾静脈から投与したグループを作成した。IVIS を用いてこの 2 群の尾静脈投与前と 4 週間後の、GFP からの蛍光度を測定した。結果、コントロール群と比較して、MSC を尾静脈から注入した群では有意に GFP の発光の上昇を認めた ($p=0.026$)。MSC を尾静脈から投与した群にて現在、共焦点顕微鏡を用いた免疫染色により、MSC の分化した細胞を特定中である。

次に、MSC が腎癌細胞株に及ぼす機能的に変化を検討した。まずは、Caki-1 と MSC を共培養、Caki-1 を MSC の condition medium を用いて培養、Caki-1 を牛血清の添加した

RPMI1640 medium により細胞培養して、Caki-1 の細胞増殖能について検討した。IncuCyte Zoom 2015 を用いて、経時的な細胞増殖をリアルタイムに評価した。 と は細胞増殖の速度に全く変化を認めなかったが、 は と に比較して、細胞増殖能の上昇を認めた。これより、腎癌細胞株は、MSC との直接接触により細胞増殖が増加する可能性を考えて、IncuCyte Zoom 2015 を用いた Time-lapse imaging をにて観察し、GFP を組み入れた腎細胞癌株 Caki-1 に MSC が接触している状態を確認した。遊走能について、Incucyte Zoom 2015 を用いて観察を継続している。

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 1 件)

Combination therapy using molecular-targeted drugs modulates tumor microenvironment and impairs tumor growth in renal cell carcinoma. Kitano H, Kitadai Y, Teishima J, Yuge R, Shinmei S, Goto K, Inoue S, Hayashi T, Sentani K, Yasui W, Matsubara A. Cancer Med .2017 Oct;6(10):2308-2320

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

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〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者
北野 弘之
広島大学・病院(医)・助教
研究者番号 : 60721933

(2)研究分担者
()

研究者番号 :

(3)連携研究者
()

研究者番号 :

(4)研究協力者
()