

令和元年6月17日現在

機関番号：72609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15280

研究課題名（和文）浸潤性増殖能を指標としたデスモイド腫瘍発症を予防し得る食品因子の探索

研究課題名（英文）Exploration of functional foods for preventing desmoid tumor formation

研究代表者

宮本 真吾（Miyamoto, Shingo）

公益財団法人佐々木研究所・附属研究所・研究員（移行）

研究者番号：50752705

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：デスモイド腫瘍は良性腫瘍に分類される線維腫の一種であり、その細胞は筋線維芽細胞由来であると考えられている。しかし、その標準治療法は未だ確立されていない。そこで本研究では、薬剤スクリーニングに使用するためのデスモイド腫瘍様細胞株を確立することを目的とした。我々は、マウス腸ポリープ間質細胞を用いることで、デスモイド細胞培養株の樹立に成功した。さらに、現在臨床の現場において実際の治療に用いられているcelecoxibの作用について検討したところ、濃度依存的な細胞増殖の抑制作用が認められた。以上の成果は、今後デスモイド腫瘍の治療および予防に有用な食品因子の探索につながる基盤的知見になると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

デスモイド腫瘍の治療では、悪性腫瘍に準じた摘出手術が標準療法とされてきた。しかし、その浸潤能の高さから、手術による除去治療では高い再発率と大きな組織欠損が問題となっている。さらに、外科手術による機械的刺激が更なる腫瘍の再発を引き起こす可能性があることから、発症予防あるいは薬物治療が強く望まれているが、未だ標準的な治療法すら確立されていない。本研究では、*in vitro*および*in vivo*においてデスモイド腫瘍の特徴を有する細胞株の樹立に成功した。これにより、今後デスモイド腫瘍の発症を予防し得る食品因子のスクリーニング等が可能になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Desmoid tumors are benign tumors that arise from myofibroblasts. However, the standard medication strategy against desmoids has not been established yet. Therefore, we aimed to establish the desmoid-like cell lines for drug screening. We attempted to establish the desmoid-like cells that can grow *in vitro* by engrafting tumor-derived stromal alpha-smooth muscle actin-positive fibroblasts to NOD/SCID mice. Two out of four cloned cell lines expressed both vimentin (mesenchymal marker) and alpha-smooth muscle actin and exhibited their massive infiltration into the muscle tissue with an interspersed collagen matrix when engrafted into NOD/SCID mice. Furthermore, celecoxib, clinically used for the desmoid tumor treatment, showed anti-proliferative effects on our established cell lines. In summary, we have successfully established the desmoid-like cell lines which enable the screening of food factors for the prevention and medication of desmoid tumors.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：デスモイド

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

デスモイド腫瘍は軟部組織腫瘍に分類される線維腫の一種であり、筋線維芽細胞由来であると考えられている。1967年 Stoutらはこの疾患を1)分化した線維芽細胞が増殖している、2)細胞間に膠原線維が存在している、3)浸潤性発育形態を呈する、4)悪性所見を欠く、5)転移はないが局所再発がある腫瘍、と定義した。組織学的に良性所見と認めるが、臨床的特性が悪性に近く、転移は認められなくとも増殖が早く、周辺組織に大きく浸潤性の発育をすることから主要組織が圧迫され、死に至ることも多い (Lefevre et al., *Br J Surg*, 2008)。このデスモイド腫瘍の治療では、悪性腫瘍に準じた摘出手術が標準療法とされてきた。しかし、その浸潤能の高さから、手術による除去治療では高い再発率と大きな組織欠損が問題となっている。さらに、外科手術による機械的刺激が更なる腫瘍の再発を引き起こす可能性があることから、発症予防あるいは薬物治療が強く望まれているが、未だ標準的な治療法すら確立されていない。その大きな原因として、一般的には罹患者数が少なく疫学的な情報が収集しにくいことと、デスモイド腫瘍細胞は細胞株としての樹立が難しく、予防や治療に用いる有効な化合物を見いだすためのスクリーニング系が存在していないことが挙げられる。実際これまで行われてきた多くの研究で、デスモイド腫瘍由来の細胞株は樹立できなかつた、と報告されている。

家族性大腸腺腫症 (familial adenomatous polyposis: FAP) は、大腸全域に多数のポリープが発生する遺伝性疾患であり、大腸がんの生涯発症リスクは80~100%と極めて高い。本疾患の原因遺伝子は5番染色体上のAPC (Adenomatous Polyposis Coli) 遺伝子であり、この遺伝子は大腸を含む多くのがんの発生初期段階において変異や欠損により不活化していることから、特に重要ながん抑制遺伝子の一つと考えられている。興味深いことにFAP患者ではデスモイド腫瘍の罹患率が一般集団の約1,000倍にまで上昇することが報告されており (Reitamo et al., *Am J Clin Pathol*, 1982)、FAP患者の死因で大腸がんに次いで多いものがデスモイド腫瘍である。発症原因は不明だが、APC遺伝子変異を背景として、外傷や手術等の機械的刺激が加わった際に発症しやすくなることが知られている。FAP患者においては、大腸がんリスクを低下させるために行う大腸全摘術等によって頻繁にデスモイド腫瘍が発症することから、大腸がんではなくデスモイド腫瘍で死に至るケースも多い。そのため、薬物による治療法の開発はもちろんであるが、食品因子によるデスモイド腫瘍の発症予防が実現した場合、患者のQOLの観点からも非常に貢献度が高いと考えられる。

発がんの化学予防研究で頻用されているApc<sup>Min/+</sup>マウスは、Apc遺伝子に突然変異を有しており、FAP患者と同様、自然発生的に腸管に多数のポリープが生成する。Apc遺伝子変異を原因とするこのポリープ生成過程は、散発性の大腸発がん過程をも再現していると考えられる。我々はこれまでの研究において、Apc<sup>Min/+</sup>マウスに発生した腸ポリープ間質中の線維芽細胞は、デスモイド腫瘍を診断する分子マーカーの一つであるalpha-Smooth Muscle Actin (α-SMA)を強く発現していることを見いだしていた。デスモイド腫瘍が機械的刺激等による活性型筋線維芽細胞のクローン性増殖であるとする、腫瘍細胞の周囲に存在しパラクライン的慢性刺激を腫瘍細胞から与えられ続けている腸ポリープ間質中の線維芽細胞は、デスモイド腫瘍細胞に類似した性質を呈する可能性があるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究ではデスモイド細胞の増殖および浸潤能を指標にしたスクリーニング系の確立を目指し、Apc<sup>Min/+</sup>マウスの腸ポリープからデスモイド腫瘍様細胞の樹立を目的とした。

### 3. 研究の方法

これまでの研究で、一般的なプライマリーカルチャーではデスモイド細胞株の樹立が非常に困難であると報告されている。そこで本研究では、α-SMAを強く発現している腸ポリープ間質中の線維芽細胞を直接ディッシュ上で培養するのではなく、免疫不全マウスであるNOD/SCIDマウスを移植ホストとして用いるXenograft培養経路での細胞株樹立を目指した。具体的には、30~40週齢のMinマウスから小腸ポリープを採取し、洗浄しdispaseで処理した。細胞を洗浄後、マトリゲルとともにNOD/SCIDマウスの皮下に移植した。2ヶ月後に形成された腫瘍を摘出し、*in vitro*での培養を

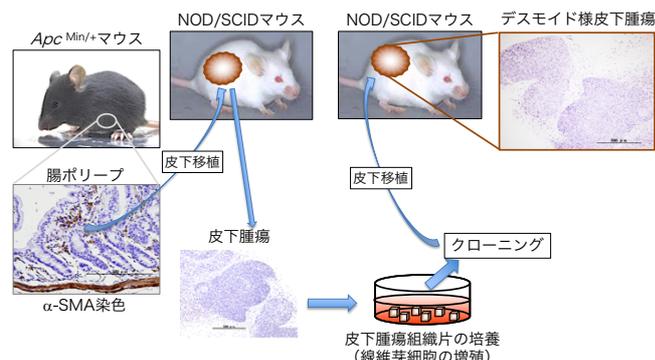


図1. デスモイド腫瘍様細胞の樹立プロトコル

行なった。培養後に得られた細胞を、限界希釈法によりクローニングし、臨床上のデスマイド腫瘍の特徴に合致する細胞株の選択を行った。デスマイド腫瘍を規定する分子マーカーは臨床での診断基準として用いられている $\alpha$ -SMA、vimentin、CD34、c-KIT (Yamaguchi *et al.*, Virchows Arch, 2004) を Western blotting 法や免疫染色法で検討した。得られた細胞株の中で、よりデスマイド腫瘍の特徴に合致する細胞株を再度 NOD/SCID マウスの皮下に移植し、形成される腫瘍の組織像について検討した。また、*in vitro* での細胞増殖およびアポトーシス誘導作用については、それぞれ MTT および AnnexinV アッセイで検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) *in vitro* で培養可能なデスマイド腫瘍様細胞株の樹立

本研究では、まず Min マウス腸ポリープ間質からデスマイド細胞培養株の樹立を試みた。Min マウスの小腸からポリープを摘出し、NOD/SCID マウスの皮下に移植したところ、2 ヶ月で皮下腫瘍が形成された。さらに、この皮下腫瘍断片をディッシュ上で培養したところ、線維芽細胞の強い増殖を確認できた (図 2)。この増殖性線維芽細胞が腫瘍性を持ち、*in vivo* の環境下でデスマイド様腫瘍を再び形成するかを確認するため、再度 NOD/SCID マウス皮下へと移植した。2 ヶ月後に形成された皮下腫瘍の大部分においてデスマイド腫瘍様の組織像を認めた。しかし一方で、これとは違った組織型を呈している部分も一部分に見受けられた。このことから、この時点での細胞は複数種類の細胞由来であり、まだ多様性を有していると考えられた。そこで限界希釈法によるクローニングを行い、臨床上のデスマイド腫瘍の特徴に合致する細胞株の選択を行った。限界希釈後に、強い増殖能を持つクローンの中から、紡錘形である線維芽細胞様のクローンを選択し、さらに培養を行なった。その結果、B2、E9、E11、F3 の 4 種類のクローンを得ることができた。これら 4 種類のデスマイド腫瘍様細胞株におけるマーカー分子の発現を Western blotting 法により検討した。マーカーとしては臨床での診断基準として用いられている $\alpha$ -SMA、vimentin、CD34、c-KIT および cytokeratin 8 を用いた。その結果、E9 および E11 のクローンは、上皮性のマーカーである cytokeratin 8 を発現しておらず、 $\alpha$ -SMA および vimentin を強く発現していることが明らかとなった。

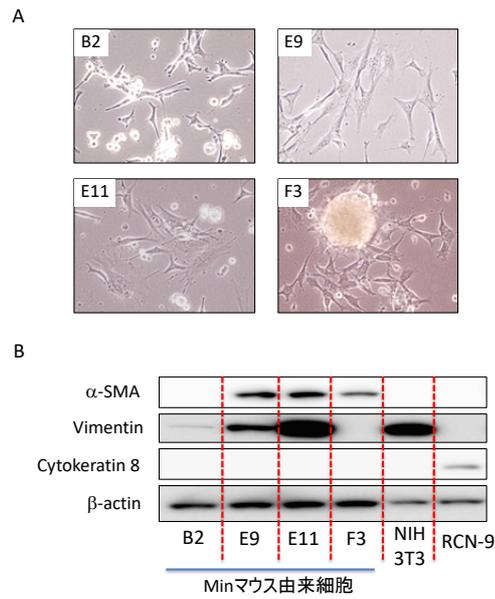


図2. (A) クローニング後の細胞形態と (B) マーカー分子の発現

一方で、簡易的なジェノタイピングにより、これら 4 種類のクローンは、*Apc*<sup>Min/+</sup> マウス固有の変異以外の変異を有している可能性が示されたことから、次世代シーケンシングによる解析を行い、詳細については検討を続けている。

##### (2) *in vivo* デスマイド腫瘍モデルの確立

次に、これらの細胞株を生体に移植した際、臨床で見られるデスマイド腫瘍と同様の特徴を有する腫瘍を形成するかどうかについて検討した。4 種類の細胞株を、それぞれ NOD/SCID マウスの皮下に移植したところ、5 週間で 1 度目の移植と同程度の大きさの皮下腫瘍が形成された。そこで、得られた皮下腫瘍の病理学的解析を行った。H&E 染色により組織を確認したところ、4 種類の細胞株中、特に E9 および E11 の 2 種類において、紡錘形を呈する間質細胞により形成される特徴的な束状配列が見られた。さらに、腫瘍の一部では血管新生や筋組織に浸潤している像を確認することもできた。また、Masson trichrome 染色により、デスマイド腫瘍の特徴である膠原線維の増生 (図 3)、免疫化学染色により vimentin および  $\alpha$ -SMA 陽性、CD34 陰性であることが確認できた。

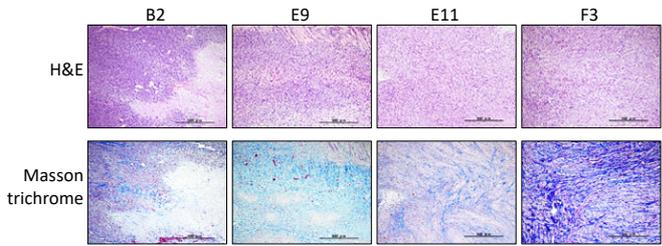


図3. デスマイド様細胞株の移植により形成された腫瘍の組織像

さらに、より自然発症に近い動物モデルを検討するため、*Apc*<sup>Min/+</sup> マウスを開腹/縫合し、人為的に機械的刺激を与えることで、デスマイド腫瘍が形成されるか否かも検討した。野生型および *Apc*<sup>Min/+</sup> マウスに同様の開腹/縫合を行い、5 週間後に処置部の組織を比較検討した。野生型および *Apc*<sup>Min/+</sup> マウスともに、軽度の癒痕形成は認められたものの、*Apc*<sup>Min/+</sup> マウスで特に強い線維芽細胞の増殖や膠原線維の増生等は認められなかった。

### (3) 薬剤によるデスマイド腫瘍様細胞の増殖抑制およびアポトーシス誘導作用の検討

最後に、現在臨床の現場において、実際の治療に用いられている薬剤 (celecoxib および sulindac sulfide) の作用について検討した。上記動物移植モデルにおいてデスマイド腫瘍様の特徴が認められた2種類の細胞株 (E9 および E11) を用いて、薬剤の細胞増殖抑制作用を *in vitro* で検討した。E9 および E11 細胞株を、12.5  $\mu\text{M}$  ~100  $\mu\text{M}$  の celecoxib および 62.5  $\mu\text{M}$  ~500  $\mu\text{M}$  の sulindac sulfide で処理し、48 時間後の細胞生存率を MTT アッセイにより評価した。その結果、両薬剤で濃度依存的な細胞増殖の抑制作用が認められた。さらに、この増殖抑制作用のメカニズムを探るため、AnnexinV および PI を用いてアポトーシス誘導作用についても検討した。E9 および E11 細胞株を、40  $\mu\text{M}$  の celecoxib および 125  $\mu\text{M}$  の sulindac sulfide で処理し、48 時間後の蛍光を Tali イメージベースサイトメーターで測定した。その結果、celecoxib で特に強いアポトーシス誘導作用が認められた。これら2種類の薬剤に対しては、E11 に比べ E9 細胞株の感受性が高いことから、細胞株間における性質の違いも今後の検討課題であると考えられた。

以上の結果から、これら2種類のクローンは、*in vitro* および *in vivo* の両環境において、デスマイド腫瘍としての特徴を維持しており、デスマイド腫瘍の治療および予防に有用な食品因子の探索に有用であることが示唆された。今後、本研究で得られた細胞株を用いた研究により、デスマイド腫瘍の治療および予防に有効な食品因子の探索だけでなく、デスマイド腫瘍発症メカニズムについても明らかになっていくことが期待される。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

宮本 真吾、田村 秀哉、尾沼 若奈、藤井 元、中西 るり、小宮雅美、鱧屋隆博、黒川 友理絵、高橋 麻衣子、武藤 倫弘、「マウスデスマイド腫瘍様細胞株の樹立」、第5回日本家族性大腸腺腫症研究会学術集会、2017年

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

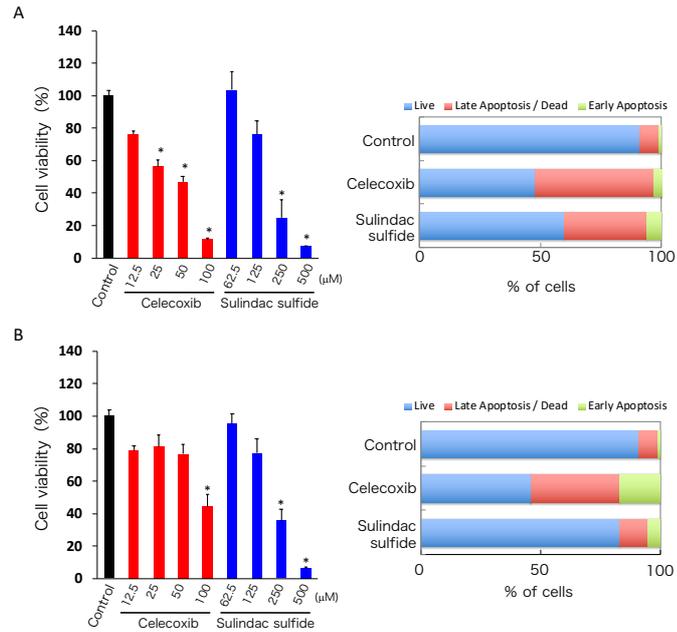


図4. デスマイド腫瘍様細胞株 (A) E9および (B) E11における NSAIDsによる細胞増殖抑制およびアポトーシス誘導作用