

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18591838
 研究課題名(和文) 子宮内膜間質細胞と共培養した不死化卵巣表層上皮細胞の細胞形質の変化に関する研究
 研究課題名(英文) Cell transformation of the immortalized ovarian surface epithelial cells co-cultured with endometrial stromal cells

研究代表者

大竹 秀幸(OHTAKE HIDEYUKI)
 熊本大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：60336237

研究成果の概要：

本研究は、不死化卵巣表層上皮細胞株(imOSE)の樹立を行い、次に imOSE に卵巣癌で発現がある癌遺伝子を複数導入する事で癌化(cOSE)を達成した。そこで、本研究の目的である内膜間質細胞(ES)と癌化した細胞株の共培養を行うため、両細胞を SCID マウスに移植したが、腫瘍の形成は確認できなかったため、ES の代わりに腫瘍形成しやすい間質細胞である hMSCs を用いて同マウスに共移植した。その結果、腫瘍の形成が確認された。cOSE を用いたが、間質細胞との共培養で OSE に腫瘍形成という形質変化が確認された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：婦人科学分野

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

卵巣に発生する子宮内膜症は卵巣癌の発生源地として認識されているが、卵巣子宮内膜症の発生だけではなく腫瘍化の過程についても、その機序は解明されていない。われわれは、これまでに子宮内膜症や卵巣癌の母細胞と考えられている卵巣表層上皮細胞(Ovarian Surface epithelial cells, OSE)に着目し、同細胞の不死化株の確立(Maeda, T. et al. Br J Cancer 93: 116-123, 2005, Nitta, M. et al. Gynecol Oncol. 81:10-17, 2001)や、子宮内膜間質細胞(endometrial stromal cells, ES)との共培養で同細胞の腺細胞への

形質変化を証明(Ohtake, H. et. al. Fertil Steril. 71:50-55, 1999)している。

2. 研究の目的

研究の目的は、子宮内膜症の発生期序ならびに、子宮内膜症から発生する卵巣癌の発癌過程を捉える事を目的とした。これまでわれわれは Primary の OSE は ES との共培養で形質変化を証明 Ohtake, H. et. al. Fertil Steril. 71:50-55, 1999)していることから、さらに不死化した OSE を用いることで、子宮内膜症の腫瘍化を見据えて、不死化した OSE と ES と共培養し、OSE の形質変化観察するこ

ととした。

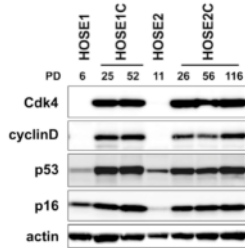
3. 研究の方法

a) 新たな OSE の採取

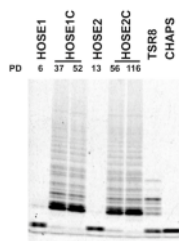
これまでわれわれが樹立した不死化 OSE 株を用いて研究を行う予定であったが、同細胞株は樹立の際の技術的な問題で、十分な遺伝子導入が不可能な形質であった為、新たに遺伝子導入が可能な不死化 OSE 細胞株を樹立することとした。施設の倫理委員会で承認を得て、書面で説明と同意を行った上で、医学的適応で採取された卵巣より OSE を採取した。OSE の採取は、Scraping method (Nakamura M *et al.* Virchow Arch, 424:59-67, 1994)に従った。

b) 不死化 OSE 細胞株の樹立

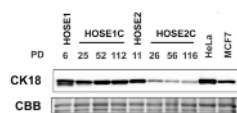
採取された初代 OSE 細胞にレンチウイルスベクターを用いて変異 Cdk4、cyclinD1、hTERT の3つを導入し不死化細胞株(HOSE)を樹立し、ウェスタンブロッティングにより導入した Cdk4、サイクリン D1 の発現を確認した。



さらに、TRAP assay により初期培養 OSE 細胞では認められなかったテロメラーゼ活性が不死化細胞株では確認した。

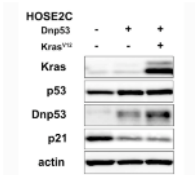


これら不死化細胞株は初期培養、不死化細胞株共にサイトケラチン 18 の発現が陽性を確認した。

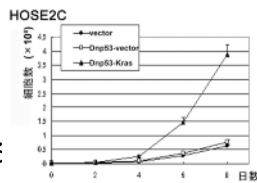


c) ドミネガ p53 と活性型 Kras 両方を導入

不死化細胞株に p53 のドミナントネガティブ変異体であるドミネガ p53 (Dnp53)、と活性型 Kras(Kras^{V12}) 両方を導入した。

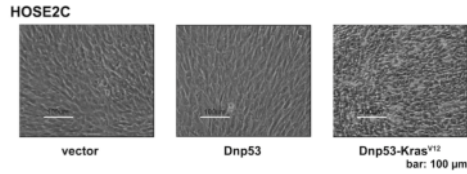


ドミネガ p53 と Kras の両方を導入した細胞では、ドミネガ p53、vector control とくらべ、増殖速度が亢進してゐることを確認した。



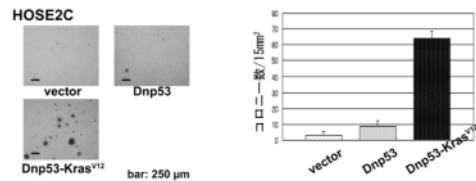
d) saturation density の評価

Dnp53、Kras^{V12} の導入 HOSE2C 細胞株の saturation density が高くなっていることを確認した。



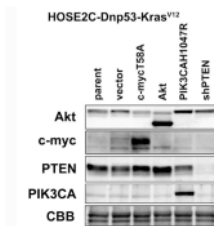
e) 足場非依存性の増殖能

Dnp53、Kras^{V12} の導入 HOSE2C 細胞株は足場非依存性増殖能を獲得したが、この細胞をヌードマウスに移植しても腫瘍の形成は認められなかった。

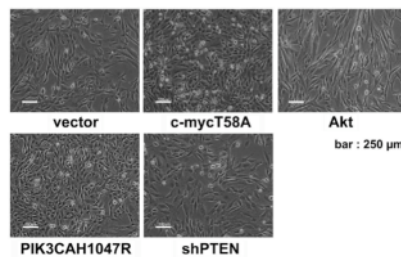


f) 癌化させるために必要な遺伝子を特定

癌化させるために必要な遺伝子を特定するために、Dnp53-Kras^{V12} 共発現細胞株にさらに遺伝子導入を行ないました。卵巣癌でこれまで多くの遺伝子異常が同定されてきていますが、その中でも比較的高頻度に異常が報告されている c-myc 変異体、AKT 変異体、PIK3CA 変異体、PTEN 特異的 shRNA を導入した。導入遺伝子の発現の確認はウェスタンブロッティングで行った。導入した Akt 変異体は内在性の Akt よりも分子量が約 400dp 小さいことより発現を確認し、PTEN 蛋白はベクターコントロール細胞と比べ約 30%まで発現が低下を、PIK3CA の導入でも PTEN 蛋白の若干の発現低下を認めた。

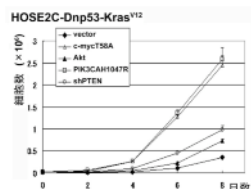


g) 遺伝子導入後の細胞形態の変化



c-mycT58A と PIK3CA を導入した細胞では、細胞が円形・小型で上皮様を示し、特に c-myc 導入細胞で顕著であった。一方、Akt を導入した細胞ではより線維芽細胞に近い形態をとり、shPTEN を導入で形態学的変化はみられなかった。

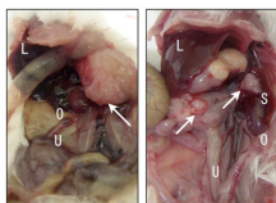
h) 遺伝子追加導入後の細胞の増殖曲線



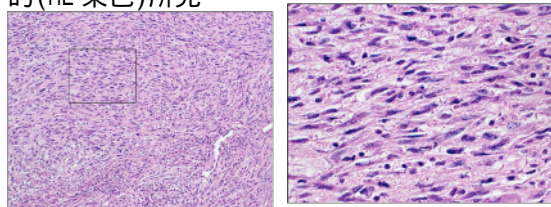
c-mycT58A と PIK3CA を導入した細胞は細胞の増殖速度が亢進していました。これらの細胞株をヌードマ

ウスの皮下に移植したところ、Akt を追加導入した細胞のみが腫瘍を形成しました。

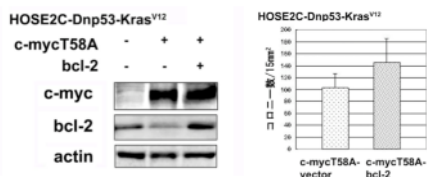
i) SCID マウスの腹腔内への HOSE2C-Dnp53-Kras^{V12}-Akt 細胞株の移植



j) HOSE2C-Dnp53-Kras^{V12}-Akt 細胞株より SCID マウスの腹腔内に形成された腫瘍の組織学的(HE 染色)所見

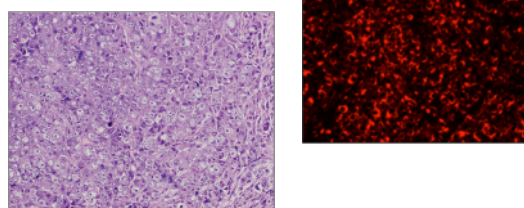


k) HOSE2C-Dnp53-Kras^{V12}-c-mycT58A 細胞株への bcl-2 遺伝子の導入

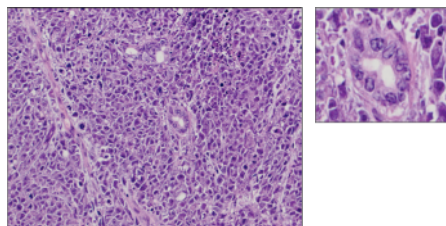


bcl-2 の追加導入により足場非依存性の増殖能は亢進した。

l) c-myc と bcl-2 を共に導入した細胞のマウスへの移植

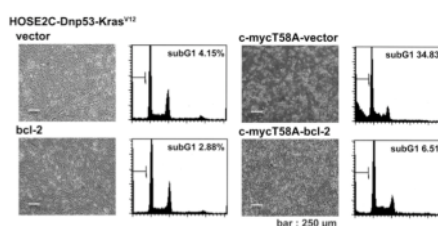


腫瘍形成がみられ組織学的(HE 染色)と免疫染色で評価した。蛍光免疫染色でサイトケラチンの発現を確認した。



腫瘍の一部には管腔構造を認めた。

m) HOSE2C-Dnp53-Kras^{V12} 細胞株における細胞周期の解析



c-myc の導入によりアポトーシスが誘導されるが、bcl-2 はそのアポトーシスを抑制した。

o) OSE 癌化研究のまとめ

今回の研究により、Rb 経路の不活化(Cdk4, cyclinD1 の導入)とテロメラーゼの活性化(hTERT の導入)の二つの異常が正常 OSE 細胞に起こることによって、不死化に至る可能性が推測された。この不死化した細胞に p53 遺伝子を導入したのみでは癌化にいたらず、Kras 遺伝子、Akt 遺伝子、c-myc 遺伝子、bcl-2 遺伝子などの複数の遺伝子異常が加わることはじめて腫瘍が形成され、p53 遺伝子の変異により、遺伝子安定性に寄与する p53 の機能が喪失し、多段階に遺伝子変異を蓄積することによって癌化にいたる可能性が示唆された。

p53 遺伝子不活化が関与する de novo 発癌が想定されている卵巣癌においても、p53 遺伝子不活化のみでは癌腫形成には至らず、複数の遺伝子異常が加わることで腫瘍を初めて形成し、卵巣癌の発癌には複数の遺伝子変化の蓄積が必要であると考えられた。

以上により、導入遺伝子の違いにより、形成された腫瘍の組織型に違いが見られたものの、それぞれの組織で異常が報告されている遺伝子を導入するだけでは、ヒトの卵巣癌に類似した分化した組織型を形成するには至らなかった。長期平皿培養により、OSE に存在すると考えられる幹細胞の性質が変化した可能性も考えられ、培養条件を検討し、元の細胞の性質を保ったまま卵巣に移植することが出来ないか今後の研究の課題であ

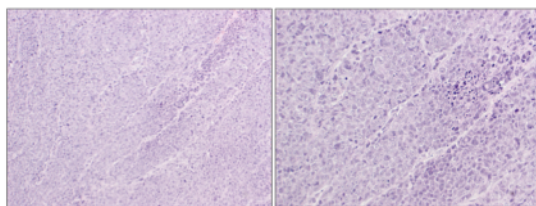
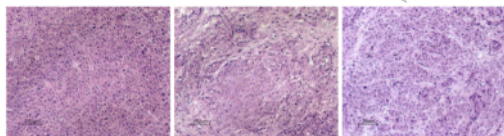
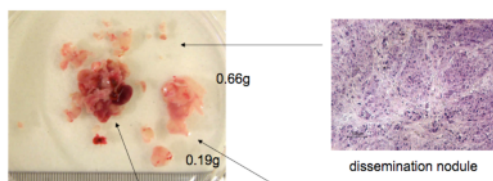
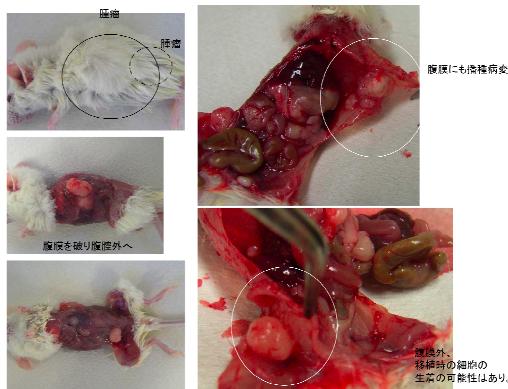
る。

p) マウスで腫瘍形成する HOSE2 Dnp53-Kras^{V12}-c-mycT58-Bcl-2 と子宮内膜間質細胞(ES)とのマウスでの共培養

不死化 ES 細胞を金沢大学医学部の京先生より提供を受け (Kyo S, et al. Am J Pathol. 2003; 163:2259-69.) 腫瘍形成を認めた HOSE2 Dnp53-Kras^{V12}-c-myc T58-Bcl-2 との共培養を SCID マウス (腹腔内への移植) で施行したが、手技的な問題か、腫瘍形成がみられなかった。

q) マウスで腫瘍形成する HOSE2 Dnp53-Kras^{V12}-c-mycT58-Bcl-2 と hMSC

不死化 ES 細胞に代えて、多分化能を有するヒト間葉系幹細胞 (human Mesenchymal Stem Cell: hMSC) を用いてマウスの皮下ならびに腹腔内への共培養研究を施行し腫瘍の形成が確認された。



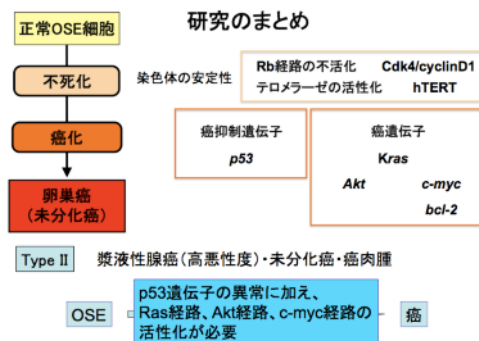
得られた腫瘍を組織学に検討したが、組織学的には腺管の形成等の腫瘍細胞の形質変化は認められなかった。

4. 研究成果

今回ウイルス癌遺伝子をもちいず OSE を不死化することに初めて成功し、この細胞株に卵巣癌で異常の見られる複数の遺伝子を導入することにより in vitro での発癌モデルを確立した。

一方、当初の予定通り、OSE と内膜間質細胞の共培養での OSE の形質変化を検討する研究においては、in vitro での共培養が手技的に困難であるため、マウスでの共培養 (共移植) を施行したが ES 細胞との共培養では腫瘍は形成されなかった。

ES にかえて hMSC 細胞を用いてマウスで共培養を行ったが、腫瘍形成は認められたものの、共培養によると考えられる細胞の形質変化はみられなかった。



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)

Sasaki R, Narisawa-Saito M, Yugawa T, Fujita M, Tashiro H, Katabuchi H, Kiyono T. Oncogenic transformation of human ovarian surface epithelial cells with defined cellular oncogenes. Carcinogenesis. 2009 ;30:423-31.

[学会発表](計1件)

佐々木瑠美、田代浩徳、大竹秀幸、片淵秀隆、ヒト正常卵巣表層上皮細胞を用いた上皮性卵巣癌の発癌機構の解析、第60回日本産科婦人科学会学術講演会、平成20年4月13日、パシフィコ横浜

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大竹 秀幸 (OHTAKE HIDEYUKI)
熊本大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：6 0 3 3 6 2 3 7

(2)研究分担者

片瀨 秀隆 (KATABUCHI HIDETAKA)
熊本大学・大学院医学薬学研究部・教授
研究者番号：9 0 2 2 4 4 5 1

田代 浩徳 (TASHIRO HIRONORI)
熊本大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：7 0 3 0 4 9 9 6

(3)連携研究者

なし