

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月15日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590370

研究課題名（和文）骨髄由来間葉系幹細胞とがん細胞の相互作用：幹細胞性獲得と浸潤・転移能におよぼす影響

研究課題名（英文）Biological significance of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in tumor microenvironment

研究代表者

仙波 秀峰（SEMBA SHUHO）

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：00302092

研究成果の概要（和文）：がん微小環境における骨髄由来間葉系幹細胞の役割を検討し、がんの進展過程における「がん幹細胞性の回復」に密接に関与することを明らかにした。がん細胞と間葉系細胞との間の接触が WNT5A や TGF $\cdot\cdot$  を刺激するメカニズムについて検討を行った。

研究成果の概要（英文）：Bone marrow-derived mesenchymal stem cells-mediated activations of the WNT and TGF $\beta$  signaling pathways were thought to provide advantageous microenvironments for cancer progression by supporting the re-acquisition and maintenance of cancer stem cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：人体病理

キーワード：がん幹細胞・骨髄由来間葉系幹細胞・がん微小環境

## 1. 研究開始当初の背景

がん細胞が原発巣から他臓器へ遠隔転移を形成する過程には、原発巣からの離脱、周囲間質への浸潤、血管内への侵入、遠隔臓器への侵入、転移臓器での増殖と生着といった、多種多様な関門を通過する必要がある。このような条件を全て満たす細胞が誕生するための仮説として、「確率的モデル（stochastic model）」と「階級制モデル（hierarchical model）」が提唱されている。そのうち後者は、近年の分子生物学的研究により明らかとなった胚性幹細胞や体性幹細胞に基づいた新たな概念で、自己複製能と多分化能を有する“がん幹細胞（cancer stem cell）”が転移す

るという考えである。特に、転移形成過程におけるがん細胞の幹細胞性（stemness）の重要性は国内・国外の研究者の注目するところであり、その理解は新たながんの診断確立と治療開発に大きな一歩となると期待されている。

## 2. 研究の目的

スキルス型胃癌におけるがん-間質相互作用の研究を通じ、がん細胞と線維芽細胞との接着が各々の増殖充進に相互作用を及ぼすことを明らかにした研究実績に基づき、骨髄由来間葉系幹細胞のがん細胞に及ぼす影響、この2つを研究の大きな柱とした。特に、下

に記すの3点に焦点を絞り、研究・解析を遂行した。

- (1) 骨髄由来幹細胞とがん細胞の相互作用による発現遺伝子変化の解明、
- (2) 骨髄由来幹細胞とがん細胞の接着による転移形成能亢進の変化、
- (3) 骨髄由来幹細胞ががん細胞の幹細胞性獲得に及ぼす影響、

### 3. 研究の方法

ヒト由来胃癌細胞 MKN-7 と骨髄由来間葉系幹細胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cell [BM-MSC]) を共培養した後、磁気ビーズ法にて両者を分離、細胞増殖や発現遺伝子の変化について検討を行った。また、MKN-7 細胞に見られる発現遺伝子の網羅的解析は cDNA マイクロアレイを行い、大きな発現の変化を示すものをスクリーニングした。さらには、上記実験にて明らかになった分子に関しては、各種免疫組織化学的検討を行い、各種実験の成果を確認した。

### 4. 研究成果

#### 骨髄由来間葉系幹細胞が胃癌細胞に及ぼす影響

CAF の起源となる細胞としては未だ議論の余地が残されているが、近年 BM-MSC の (cancer-associated fibroblast [CAF]) としての役割がにわかに研究者たちの議論の中心になっている。そこで、BM-MSC との共培養による胃癌細胞の性質の変化について検討を試みた。MKN-7 とヒト由来 BM-MSC である UE6E7T-12 細胞を 1:1 の割合で単純に混合・共培養行くと、MKN-7 細胞は UE6E7T-12 細胞と高頻度に接触し、それを足場とした増殖を示した。興味深いことに、UE6E7T-12 細胞を GFP でラベルすると、MKN-7 細胞との接触が UE6E7T-12 細胞に形態的变化を誘導し、線維芽細胞様の紡錘形細胞突起を延長させるようになり、CAF への分化・成熟を示唆する  $\alpha$ -smooth muscle actin 発現も誘導されていた。軟寒天培地で MKN-7 細胞と UE6E7T-12 細胞を混合した際には、MKN-7 細胞の凝集を亢進させる結果が得られた。

MKN-7 細胞と UE6E7T-12 細胞の混合共培養後、両者を上皮マーカー EpCAM を用いて細胞分離後細胞数を計測すると、UE6E7T-12 細胞との共培養により MKN-7 細胞の増殖促進効果が確認され、MKN-7 細胞の増殖亢進は液性因子を介してではなく BM-MSC との直接的接触が引き金となったと考えられた。尚、この時 UE6E7T-12 細胞の増殖は見られない。以上より、BM-MSC は胃癌細胞の増殖にとって有利な足場を提供し、細胞凝集と増殖を促進する作用があると考えられた。

#### 骨髄由来間葉系幹細胞による発現遺伝子の

#### 変化

RT-PCR による MKN-7 細胞の遺伝子発現解析を行ったところ、上皮系マーカー E-cadherin には大きな発現の変化は認められなかったが、間葉系マーカー vimentin と EMT を司る転写因子 Snail の発現上昇とがん幹細胞性マーカー CD133 発現レベルの増加が観察された。CD133 はグリオーマや乳癌、大腸癌をはじめ様々なヒト悪性腫瘍でがん幹細胞を識別するためのマーカーとして有用であることが報告されているが、BM-MSC は胃癌細胞に epithelial-mesenchymal transition (EMT) とがん幹細胞性回復に作用する可能性が示唆された。電子顕微鏡での CD133 陽性 MKN-7 細胞、CD133 陰性 MKN-7 細胞の観察を行うと、CD133 陽性細胞では細胞表面に特徴的な微絨毛構造が観察されたが、CD133 陰性細胞には見られなかったことから、がん幹細胞に特徴的な細胞表面の構造と考えられた。また、分離前の MKN-7 細胞と UE6E7T-12 細胞の共培養を行った際、UE6E7T-12 細胞との直接的接触を示す MKN-7 細胞にもこの微絨毛構造が見られ、この細胞は CD133 陽性 MKN-7 細胞であり、BM-MSC との直接的接触ががん幹細胞性を回復させたというひとつの傍証となった。

マウス皮下への接種実験では、UE6E7T-12 細胞単独ではマウス皮下に腫瘍を形成することはないが、MKN-7 細胞と UE6E7T-12 細胞の混合した群では高い造腫瘍能が見られ、腫瘍の大きさは MKN-7 細胞のみを接種した群と比べても顕著であった。MKN-7 細胞と UE6E7T-12 細胞の混合したものを接種した群では腫瘍内部に UE6E7T-12 細胞由来の線維成分の増生を伴っており、高い造腫瘍性は BM-MSC が CAF として作用している可能性を示唆するものであった。この時にも、BM-MSC 近傍に CD133 陽性 MKN-7 細胞が局在しており、両者が直接的に接触する状況がマウス皮下腫瘍の形成に一役買ったものと考えられた。

#### 骨髄由来間葉系幹細胞による胃癌細胞のがん幹細胞性再獲得機構

UE6E7T-12 細胞との接触は MKN-7 細胞の内部にどのような細胞内シグナル伝達経路が活性化されたのか検討するため、cDNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を試みた。MKN-7 細胞 (original) に加え、CD133 抗体を用いて分離した CD133 陽性 MKN-7 細胞、CD133 陰性 MKN-7 細胞を用い、UE6E7T-12 細胞との共培養時に共通して発現誘導される遺伝子を解析した結果、細胞同士のコンタクトにより特異的に発現誘導される 65 個の共通遺伝子を同定した。Wingless-type MMTV integration site family, member 5A (WNT5A) 遺伝子、及び transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )-induced (TGFBI) 遺伝子に着目した。MKN-7 細胞と UE6E7T-12 細胞、両者の共培養

条件下での WNT5A、TGF- $\beta$ 1 発現を免疫組織化学的に検討したところ、WNT5A は BM-MSc との接触が引き金となり MKN-7 細胞発現が誘導され、同時に TGF- $\beta$ 1 は BM-MSc に特異的にのみ発現誘導され、培養上清中の TGF- $\beta$ 1 濃度も共培養により上昇した。

それでは、本当に WNT シグナルと TGF- $\beta$  シグナルが MKN-7 細胞のがん幹細胞性回復に有効に作用するのであろうか。そこで、CD133 陰性 MKN-7 細胞をリコンビナント WNT5A (500ng/ml) で 48 時間処理すると CD133 mRNA レベルは 26 倍にも発現増加すると同時に、CD133 陽性 MKN-7 細胞割合は 4.8%に増加した (コントロール: 0.9%)。同様に TGF- $\beta$ 1 (10ng/ml) も CD133 mRNA レベルを 51 倍に上昇させ、CD133 陽性 MKN-7 細胞割合は 3.2%へと増加させた。BM-MSc との共培養は WNT5A と TGF- $\beta$ 1 発現を増加させるのみならず、これらの下流で作用する  $\beta$ -catenin、Smad4 発現亢進を引き起こしたが、WNT5A 阻害剤 XAV939、TGF- $\beta$  阻害剤 SB431542 はこれら分子の核内移行を妨害し、CD133 陽性 MKN-7 細胞回復を抑制した。以上より、BM-MSc が提供するがん微小環境は直接的コンタクトするがん細胞自身の WNT5A 発現を亢進させ、また一方 BM-MSc からの TGF- $\beta$ 1 分泌も促進される。これら WNT5A のオートクライン作用、TGF- $\beta$ 1 のパラクライン作用がそれぞれがん幹細胞性再獲得を生じていることが明らかとなった。

我々の解析では、BM-MSc マーカー CD271 陽性 BM-MSc はスキルス型胃癌間質に高頻度に検出されたが、高分化型管状腺癌症例には CD271 陽性 BM-MSc は認められなかった (図 3 B)。特に、スキルス型胃癌症例は高い WNT5A 発現、I 型 TGF- $\beta$  レセプター (TGFBR1) 発現を示し、がん細胞は高い WNT5A 発現と共に、高い TGF- $\beta$  に対する感受性を有するものと推測された。更に、CD133 陽性がん細胞はスキルス型胃癌内に多く認められたことより、BM-MSc は胃癌細胞のがん幹細胞性再獲得のために有利ながん微小環境を提供し、胃癌細胞の浸潤能や転移能に代表される悪性度、特にスキルス型胃癌への転換を促進させている可能性がある。この様に、胃癌の増殖・進展過程において BM-MSc との接触が胃癌細胞に EMT やがん幹細胞性回復させ、これは WNT・TGF- $\beta$  シグナルの活性化によるものであることが明らかとなった。スキルス型胃癌で特に BM-MSc がその悪性度を増している可能性も考えられたことより、将来 WNT5A や TGF- $\beta$  を標的とした胃癌治療の開発が望まれる。

## 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 10 件)

- ① 仙波秀峰、骨髄由来間葉系幹細胞によるがん幹細胞性再獲得機構、顕微鏡、査読無 46 巻、2011、89-94
- ② 仙波秀峰、胃癌細胞と線維芽細胞・間葉系幹細胞の相互作用、胃がん perspective、5 巻、2012、14-23
- ③ Ysura, Semba S, Yokozaki H. Biological significance of tumor budding at the invasive front of human colorectal carcinoma cells. *Int J Oncol* 41, 2012, 201-210、査読有
- ④ Semba S, Chiba S, Ku Y, Yokozaki H, Hori Y. Hypoxia induces tumor aggressiveness and the expansion of CD133-positive cells in a hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ -dependent manner in pancreatic cancer cells. *Hashimoto O, Shimizu K, Pathobiology* 78, 2011, 181-192、査読有
- ⑤ Watanabe T, Semba S, Yokozaki H. Regulation of PTEN expression by the SWI/SNF chromatin-remodelling protein BRG1 in human colorectal carcinoma cells. *Br J Cancer* 104, 2011, 146-154、査読有
- ⑥ Semba S, Mizuuchi E, Yokozaki H. Requirement of phosphatase of regenerating liver-3 for the nucleolar localization of nucleolin during the progression of colorectal carcinoma. *Cancer Sci* 101, 2010, 2254-2261、査読有
- ⑦ Maeda N, Semba S, Nakayama S, Yanagihara K, Yokozaki H. Loss of WW domain-containing oxidoreductase expression in the progression and development of gastric carcinoma: clinical and histopathologic correlations. *Virchows Arch* 457, 2010, 423-432、査読有
- ⑧ Matsukawa Y, Semba S, Kato H, Koma Y, Yanagihara K, Yokozaki H. Constitutive suppression of PRL-3 inhibits invasion and proliferation of gastric cancer cell in vitro and in vivo. *Pathobiology* 77, 2010, 155-162、査読有
- ⑨ Masuda R, Semba S, Mizuuchi E, Yanagihara K, Yokozaki H. Negative regulation of the tight junction protein tricellulin by snail-induced epithelial-mesenchymal transition in gastric

carcinoma cells. Pathobiology 77, 2010,  
106-113

- ⑩ Semba S, Kodama Y, Ohnuma K,  
Mizuuchi E, Masuda R, Yashiro M,  
Hirakawa K, Yokozaki H. Direct  
cancer-stromal interaction increases  
fibroblast proliferation and enhances  
invasive properties of scirrhus-type  
gastric carcinoma cells. Br J Cancer 101,  
2009, 1365-1373.

〔学会発表〕（計0件）

〔図書〕（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

仙波 秀峰 (SEMBA SHUHO)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：00302092

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし