

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 31 日現在

機関番号：34533

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700889

研究課題名（和文） 悪性中皮腫の多剤耐性獲得におけるヒアルロン酸が誘発する
上皮間葉転換の意義研究課題名（英文） The role of Hyaluronan-triggering epithelial to mesenchymal
transition on multidrug resistance in malignant mesothelioma cells.

研究代表者

大野 喜也 (OHNO YOSHIYA)

兵庫医療大学・薬学部・助教

研究者番号：40509155

研究成果の概要（和文）：

低分子～中程度分子量のヒアルロン酸に上皮間葉転換の誘導活性が示唆され、悪性中皮腫細胞と共培養するとの薬剤抵抗性が増強された。また、CD44 の中和は薬剤感受性を改善した。EMT マーカーを発現する悪性中皮腫スフェロイド中から薬剤抵抗性を示す癌幹細胞様亜集団を見いだすことができ、それらはヒアルロン酸合成遺伝子発現が亢進しており、ヒアルロン酸合成阻害剤存在下では癌幹細胞様亜集団の消失が認められた。これらからヒアルロン酸による上皮間葉転換と癌幹細胞形質の制御を通じて薬剤抵抗性との関連が示唆される。

研究成果の概要（英文）：

Low ~ intermediate molecular weight hyaluronan (HA) triggered epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and enhanced chemoresistance in malignant mesothelioma cells. Additionally, chemosensitivity of mesothelioma cells were resulted in a slight improvement by blocking of HA-CD44 signaling. Subpopulation equipped with cancer stem cells (CSCs)-associated properties were founded in mesothelioma spheroids expressing EMT markers. CSC-like subpopulation showed up-regulation of hyaluronan synthases (HAS) and were suppressed in the presence of hyaluronan synthases inhibitor, 4-methylumbelliferone (4MU). These results suggested that hyaluronan mediated regulation of EMT- and CSCs- properties related with chemoresistance on malignant mesothelioma cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：癌、ヒアルロン酸、接着分子、上皮間葉転換

1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫はアスベスト曝露との関連が強く示唆され、今後の患者数の大幅な増加が懸念されている。しかし、現在のところ悪性中皮腫は既存の治療法に対して抵抗性を示し、予後不良である。そのため、新規治療薬の開発と薬剤抵抗性獲得のメカニズム解明が急務である。

悪性中皮腫では上皮成長因子受容体 (EGFR) の恒常的な活性化が広く見られる。それにも関わらず、悪性中皮腫に対する新規 EGFR 阻害剤の phase II clinical trial の成績は悪い。この事実は、悪性中皮腫には EGFR 阻害剤に耐性を獲得するメカニズムが存在することを示唆する。悪性中皮腫は患者の血清や胸水中からヒアルロン酸が大量に検出される特徴を持つ。

ヒアルロン酸は N-アセチルグリコサミンとグルクロン酸の単純な繰り返し構造によって構成される細胞外マトリクス構成成分である。ヒアルロン酸は分子量に依存した活性を示す。特に低分子ヒアルロン酸は癌細胞の増殖や浸潤・転移、および上皮間葉転換に関与することが示唆されている。悪性中皮腫は組織学的に上皮型、肉腫型、混合型の3種類に分類される。肉腫型および混合型は上皮型と比較して予後が悪い。これらは上皮間葉転換が薬剤抵抗性獲得に関与していることを示唆する。

近年、薬剤抵抗性を示す細胞の本体として癌幹細胞が注目されている。癌幹細胞は強い造腫瘍性を備える少数の亜集団であり、ヒアルロン酸受容体である CD44 は癌幹細胞のマーカーとして広く用いられている。さらに、上皮間葉転換が誘導された細胞中から幹細胞性を備える細胞亜集団を見出すことができ、上皮間葉転換との関連が報告されている。

以上の背景から悪性中皮腫薬剤抵抗性におけるヒアルロン酸と上皮間葉転換の意義について検討を試みた。

2. 研究の目的

本研究では、悪性中皮腫におけるヒアルロン酸誘発上皮間葉転換の薬剤抵抗性獲得への意義を明らかにし、薬剤抵抗性獲得に関与するヒアルロン酸シグナルの遮断を標的とした創薬基盤の構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) 悪性中皮腫細胞株を各種分子量 (オリゴマー、低分子量、中程度分子量、高分子量) のヒアルロン酸存在下にて培養を行い、E-カドヘリン、N-カドヘリン、beta-カテニンについて免疫染色を行い、上皮間葉転換の誘導について評価した。

(2) ヒアルロン酸、ヒアルロン酸合成阻害剤または抗 CD44 中和抗体の存在下におけるゲフィチニブなど増殖阻害材の悪性中皮腫細胞に対する増殖阻害活性をホルマザン法にて解析した。

(3) 超低接着表面プレートを用いて、無血清培地中にて3~5日間スフェア培養を行った。悪性中皮腫スフェロイドの遺伝子発現量を RT-PCR または定量 PCR にて解析した。また、癌幹細胞の細胞表面マーカーおよび機能的マーカーをフローサイトメトリ-解析した。

4. 研究成果

(1) 悪性中皮腫細胞をヒアルロン酸存在下にて培養を行ったところ、E-Cadherin の発現が消失し、N-Cadherin の発現と beta-Catenin の核への集積が見られたことからヒアルロ

ン酸による上皮間葉転換の誘導が示された。そこで鎖長の異なるヒアルロン酸分子種を用いて検討を行ったところ、低分子～中程度分子量のヒアルロン酸に上皮間葉転換の誘導活性が示唆された。

そこでヒアルロン酸共存かにおける悪性中皮腫の細胞増殖阻害作用に対する感受性をホルマザン法にて検討した。その結果、上皮間葉転換の誘導活性が示唆されたヒアルロン酸分子種の共存下では、EGFR 阻害剤であるゲフィチニブの細胞増殖阻害作用に対する感受性が減弱することが明らかとなった。

(2)ヒアルロン酸受容体 CD44 の関与について抗 CD44 中和抗体を用いて検討を行った。まず抗 CD44 中和抗体が単独で悪性中皮腫細胞の増殖に影響を与えるのかについて、異なるヒアルロン酸産生系を有する悪性中皮腫細胞株数種類を用いて検討した。その結果、いずれの細胞株においても抗 CD44 中和抗体単独では細胞増殖を阻害しなかった。しかし抗 CD44 中和抗体共存下ではゲフィチニブ感受性が改善させる傾向にあった。さらにそれはヒアルロン酸マトリクス形成能が高い細胞において顕著であった。悪性中皮腫の薬剤抵抗性獲得において、ヒアルロン酸/CD44 が積極的に関与していることが示唆された。

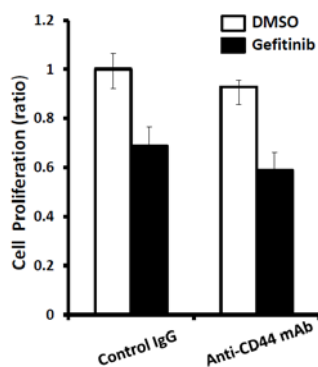


Fig.1 gefitinibの増殖阻害活性に対する抗CD44中和抗体の影響

(3)EMT が誘導された細胞中から強い造腫瘍性と薬剤抵抗性を示す癌幹細胞様集団を見出すことができる。そこで無血清培地にて足場非依存的なスフェア培養を行うことで癌幹細胞様の性質を有する細胞を濃縮し、その性質を検討した。

悪性中皮腫スフェロイドは接着培養した時と比較して snail や twist, vimentin などの EMT マーカーを発現し間葉系性質を示すと同時に、ヒアルロン酸合成遺伝子の発現も上昇していた。さらに、悪性中皮腫スフェロイドは幹細胞性に関与する転写因子を発現し、薬剤抵抗性を示す傾向にあった。とくに、スフェア培養によって CD44 陽性 ALDH 陽性亜集団が濃縮されることを見いだした。そこでこれらとヒアルロン酸との関係を検討する目的で、ヒアルロン酸合成阻害剤存在下においてスフェア培養したところ、悪性中皮腫スフェロイド中の CD44 陽性 ALDH 陽性亜集団の消失が認められた。これらからヒアルロン酸による強い造腫瘍性と薬剤抵抗性を示す癌幹細胞様亜集団の制御が示唆される。現在詳細を検討中である。

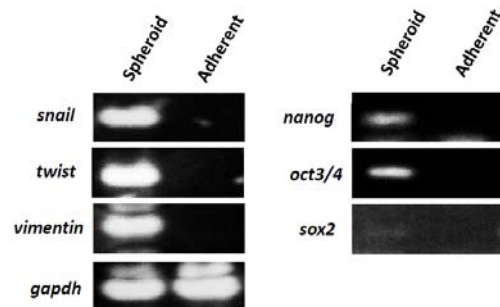


Fig.2 悪性中皮腫スフェロイドと接着培養したときの遺伝子発現変動

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 4 件)

(1) Hara K., Ueda S., Ohno Y., Tanaka T., Yagi H., Okazaki S., Kawahara R., Masayuki T., Enomoto T., Hashimoto Y., Masuko K. & Masuko T.

NIH3T3 cells over-expressing CD98 heavy chain resist early G1 arrest and apoptosis induced by serum starvation.

Cancer Sci., in press 査読有

(2) Masuko .K, Okazaki S., Satoh M., Tanaka G., Ikeda T., Torii R., Ueda E., Nakano T., Danbayashi M., Tsuruoka T., Ohno Y., Yagi H., Yabe N., Yoshida H., Tahara T., Kataoka S., Oshino T., Shindo T., Niwa S., Ishimoto T., Baba H., Hashimoto Y., Saya H. & Masuko T.

Anti-tumor effect against human cancer xenografts by a fully human monoclonal antibody to a variant 8-epitope of CD44R1 expressed on cancer stem cells.

PLoS One., 7, e29728, 2012, 査読有

(3) Ohkawa M., Ohno Y., Masuko K., Takeuchi A., Suda K., Kubo A., Kawahara R., Okazaki S., Tanaka T., Saya H., Seki M., Enomoto T., Yagi H., Hashimoto Y. & Masuko T.

Oncogenicity of L-type amino-acid transporter 1 (LAT1) revealed by targeted gene disruption in chicken DT40 cells: LAT1 is a promising molecular target for human cancer therapy.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 406, 649-655, 2011. 査読有

(4) Masuko T, Ohno Y., Masuko K, Yagi H, Uejima S, Takechi M, Hashimoto Y.

Towards therapeutic antibodies to membrane oncoproteins by a robust strategy using rats immunized with transfectants expressing target molecules fused to green fluorescent protein.

Cancer Sci., 102, 25-35, 2011. 査読有

[その他]

ホームページ等

<http://www2.huhs.ac.jp/~h080065y/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 喜也 (OHNO YOSHIYA)

兵庫医療大学・薬学部・助教

研究者番号：40509155