

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590430

研究課題名(和文)大腸癌肝転移を促進する骨髄間葉系幹細胞を標的とする治療

研究課題名(英文)Targeting of mesenchymal stem cell associated with colorectal cancer liver metastasis

研究代表者

大森 斉 (Ohmori, Hitoshi)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：80213875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄間葉系幹細胞(MSC)は、癌組織に動員され癌細胞と相互作用を通じて癌の進展・転移に関与すると考えられ、がん研究の焦点の一つとなっている。報告者らは、MSCが癌細胞が産生分泌するサイトカインHMGB1により腫瘍内に誘導され、腫瘍内では腫瘍が分泌するTGF- β を多量に含んだECMであるバイグリカンとHMGB1により幹細胞が維持されることを明らかにした。このような状態は大腸癌では粘液腫状間質として病理組織学的に認識され、糖尿病合併大腸癌肝転移症例に多く認められる。HMGB1の吸着・中和によるMSC動員阻害は腫瘍増大・転移を抑制し、MSC標的化の有効性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Bone marrow-derived mesenchymal stem cell (MSC) enhances cancer progression and metastasis, which is one of cutting edges of cancer research. We reported that cancer cells-secreted HMGB1 employs MSC into tumors. Their stemness is retained by HMGB1 and TGF- β -containing biglycan, which is cancer-derived extracellular matrix. This tissue status is often observed microscopically in diabetes-complicated colorectal cancer metastasizing to the liver. Absorbance or neutralization of HMGB1 inhibits employing MSC to suppress tumor growth and metastasis. These findings suggest that the targeting of MSC might be a promising method against cancer progression.

研究分野：基盤研究(C)(一般)

科研費の分科・細目：6908

キーワード：骨髄間葉系幹細胞 大腸癌 肝転移 脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

癌間質内に存在する紡錘型細胞の形質は癌研究の注目点の一つであり、線維芽細胞、筋線維芽細胞、血管内皮細胞、血管周皮細胞などが含まれると考えられてきた。近年、幹細胞生物学が急速な進展を示し、同時に、癌組織内に骨髄由来細胞が多く分布し、癌の進展に重要な役割を果たすことが明らかになってきた。当初は骨髄血管内皮前駆細胞が注目されたが、その後、骨髄由来の間葉系幹細胞が癌間質に認められるとの報告が続き、その役割に注目が集まっている。

2. 研究の目的

癌間質内の紡錘型細胞に骨髄間葉系幹細胞が含まれることが知られるようになり、その癌の進展への関与と機序に注目が集まっている。報告者らも大腸癌間質内骨髄間葉系幹細胞数が肝転移とよく相関することを見出している。本研究では、骨髄間葉系幹細胞を腫瘍内に誘導する走化物質の同定、骨髄間葉系幹細胞の分化促進因子の同定と分化による腫瘍促進作用の解明、逆に、骨髄間葉系幹細胞の幹細胞性を維持したままの状態における腫瘍促進作用の解明を行い、その結果をもとに、骨髄間葉系幹細胞を標的とする癌制御法を確立することを目標とする。

報告者らは、大腸癌肝転移に相関する新たな病理組織学的所見の発見に取り組んでいて、腫瘍間質が小紡錘型細胞に富み、間質粘液を伴う「粘液腫状間質」を示す症例に有意に肝転移が多いことに気付いた。このような「粘液腫状間質」内に見られる紡錘型細胞の形質を免疫染色で確認すると、CD133 や Oct3/4 といった幹細胞マーカー陽性で CD73 の間葉系マーカー、および、CD13 といった骨髄細胞マーカーにも陽性である間葉系幹細胞が疑われるものが多く認められた。このことから間葉系幹細胞様間質細胞が大腸癌の肝転移を促進する作用を有することが強く考えられた。研究分担者である北台らは骨髄間葉系幹細胞と癌細胞を混じて動物に投与したとき有意に転移が促進されることを報告している。

では、骨髄間葉系幹細胞はどのようにして癌組織に誘導されるのか？癌細胞内で骨髄間葉系幹細胞は何らかの分化を示し癌の進展を促進するのか？一方、骨髄間葉系幹細胞としての形質が癌間質内で確認される以上幹細胞性を維持した状態で何らかの機能を果たしていると考えられるがそれは何か？この骨髄間葉系幹細胞を標的とした治療法は開発できないのか？本研究はこれらの疑問に解答を提出することを目的としている。

近年、癌における間葉系幹細胞の役割は癌研究の焦点の一つとなっており、PubMed を mesenchymal stem cell と cancer のキーワードで検索すると 2010 年のみで 330 を超える文献がヒットする。癌間葉系幹細胞研究は大きく 2 つの流れに分けられる。一つは

Epithelial-mesenchymal transitions (EMT) との関連からの研究、もう一方が癌に動員された骨髄由来間葉系幹細胞の研究である。癌間質内の紡錘型細胞の一部は EMT による癌細胞に由来すると考えられ、EMT を生じた癌細胞は癌幹細胞としての形質を有すると考えられている。このような EMT は癌の進展・転移、薬剤耐性に強く関連すると考えられている。これに対し、骨髄由来間葉系幹細胞は癌組織内に遊走・移行し、癌間質内に到達し、そこで何らかの役割を果たしている。

本研究では、骨髄内の間葉系幹細胞を活性化し、骨髄から癌組織へと誘導する遊走因子の同定とその抑制法の発見、および、骨髄由来間葉系幹細胞の癌組織における役割を血管新生、宿主癌免疫の抑制、癌幹細胞への影響と癌幹細胞からの影響という観点から解明し、それらの阻害薬を創薬する基礎的発見を行うことを研究の到達点と考えている。とくに、骨髄間葉系幹細胞遊走因子の報告は乏しいが、報告者らは HMGB1 をはじめとする癌細胞により分泌されるサイトカインが骨髄間葉系幹細胞に走化作用を有することを見出し学会報告している。癌間質内の骨髄由来間葉系幹細胞の役割として特に注目されるのが、骨髄由来間葉系幹細胞が癌幹細胞の stemness の維持や EMT/MET を制御する幹細胞ニッチの形成に関与するというものである。一方、癌細胞が癌間質内の骨髄由来間葉系幹細胞を教育し転移関連腫瘍間質の形成をもたらすとの仮説もある。報告者らも癌による転移標的臓器への preconditioning を報告している。本研究では、これの知見を考慮しつつ骨髄由来間葉系幹細胞を中心とする癌間質の微小環境を解明し、骨髄由来間葉系幹細胞を標的とする癌進展・転移制御法を開発する。

3. 研究の方法

本研究の 3 本の柱は、骨髄間葉系幹細胞を腫瘍内に動員する機序の解明、腫瘍内において骨髄間葉系幹細胞の幹細胞性を保持する機序の解明、および、としてを標的とする治療法の考案とその可能性の検討である。

では、骨髄間葉系幹細胞に作用を有するサイトカイン、増殖因子等の同定のため、DNA アレイを用いた網羅的解析を行い、有望な因子を選択する。骨髄間葉系幹細胞細胞株をこれらの因子で処理した時の増殖、幹細胞性、間葉系分化マーカーの発現を検討する。また、浸潤アッセイにより走化性の有無を検討する。さらには、骨髄を標識細胞に置換したマウスを用いた、走化因子浸透スポンゼルの皮下移植による in vivo での走化性確認、走化因子産生皮下腫瘍形成による走化性の検討を行い、走化因子の抗体による中和、ノックダウンによる発現抑制、受容体の阻害やノックダウンなどによる骨髄間葉系幹細胞動員抑制の有無を検討する。

では、 で検討した因子の中で走化性を示さないが幹細胞性の保持・分化抑制に関連する因子を抽出し検討を行う。これとは別に、すでに骨髄間葉系幹細胞を多く含むことを明らかにした大腸癌における粘液腫状間質内に含まれる因子を検討し、上記の因子とのオーバーラップの有無を検討する。この幹細胞性保持因子についても保持因子の抗体による中和、ロックダウンによる発現抑制、受容体の阻害やロックダウンなどによる骨髄間葉系幹細胞分化抑制の有無を検討する。

では、 に示したような各因子を標的とする治療実験を *in vitro*、*in vivo* で行うとともに、すでに腫瘍内骨髄間葉系幹細胞数に影響を与えることを見出している脂肪酸を用いた実験を行う。すなわち、食餌としてこのような脂肪酸を投与した時の骨髄間葉系幹細胞の腫瘍内での変化、投与スケジュールとの関係を検討する。また、このような脂肪酸に特異的なマイクロ RNA についても同定を試みる。

4. 研究成果

1) 間葉系幹細胞が癌の進展転移に関与することが最近明らかにされてきた。一方、間葉系幹細胞の動員・分化などを制御する因子については明らかではない。われわれは、癌における間葉系幹細胞の関与についてその制御因子の観点から検討を行った。

癌細胞が分泌する因子の中で骨髄間葉系幹細胞に作用するものを検討するため、CT26 マウス皮下腫瘍系において間葉系細胞の移行が高度であったリノール酸処理と無処理で癌細胞における遺伝子発現プロファイルの変化を DNA アレイにて検討した。すると、TGF β 、TGF α 、HMGB1 などが抽出された。HMGB1 は癌細胞から分泌され RAGE を受容体とし MAPK や NF κ B を活性化することが知られている。間葉系幹細胞細胞株 (MSC) を HMGB1 処理すると増殖促進が認められる。MSC は RAGE を発現しており、低濃度 HMGB1 処理では ERK1/2 リン酸化が亢進し CD44、nucleostemin (NS)、CD73 の発現は保たれていた。これに対し、高濃度 HMGB1 で処理すると ERK1/2 とともに p38 リン酸化が亢進し、CD44、NS の発現は低下する。さらに、経時的に癌関連線維芽細胞マーカーである SMA、TSP-1 発現の誘導が認められた。ERK1/2・p38 リン酸化及び SMA、TSP-1 発現誘導は RAGE siRNA 処理により抑制された。HMGB1 を用いた走化アッセイを行うと、MSC の移動が促進された。HMGB1 を浸透させたスポンゼルを BALB/c マウス皮下に埋め込み、ゼル内に侵入する細胞を検討すると、24 時間後には間葉系幹細胞マーカー陽性細胞が認められ、その後、経時的に癌関連線維芽細胞マーカー陽性細胞が増加した。埋め込み後、HMGB1 抗体を投与するとゼル内への侵入細胞数は減少した。CT26 マウス大腸癌細胞を BALB/c マウス皮下に接種し生成した皮下腫瘍内に浸潤する間葉系幹細胞マーカー陽

性細胞・癌関連線維芽細胞マーカー陽性細胞を検討すると、HMGB1 抗体投与により両者は減少した。しかし、CD34・CD133 陽性細胞数に有意な変化は認められなかった。マウス骨髄細胞を採取し HMGB1 を用いた走化アッセイを行い、移動した細胞のマーカーを検討すると、ほとんどが間葉系幹細胞マーカー陽性であり、造血系幹細胞マーカー陽性細胞はごく少数であった。

この系を用いて、腹腔内に 2 本鎖 DNA 結合鉄磁性体マイクロ分子を投与したところ、血漿中 HMGB1 濃度は 12% に減少し、腫瘍内に移行した骨髄間葉系幹細胞も 18% に減少した。この HMGB1 吸着除去システムを 1 回 / 週行ったところ、皮下腫瘍系では腫瘍増大は 3 週間後には 24% に抑制された。また、脾内接種による肝転移系では、接種時から 3 日間 HMGB1 吸着除去システムを施行したところ、転移数は 9% に減少した。このように、HMGB1 旧チャック除去が癌の進展抑制に著効を示した。

2) 大腸癌において、粘液腫状の間質を伴う症例が見られ、間質内紡錘型細胞における CD133 陽性細胞の増加、肝転移との相関が認められることを報告してきた。今回、われわれは、この間質の性質について検討を行った。Biglycan (BG) は TGF β 3 型受容体ともいわれる TGF β 結合性ムコ多糖体であり細胞間マトリックスの成分として知られる。この BG の大腸癌間質における産生を 50 例の大腸癌について免疫染色を用いて検討した。BG の発現は 38 例 (76%) に見られ、stage との間に相関が認められた。大腸間質を、粘液腫型と通常型の 2 型に分類し、BG 発現との関連を検討すると、粘液腫型では全例に BG 発現が認められたのに対し、通常型では 24 例 (67%) に見られ粘液腫型で有意に高かった。骨髄間葉系幹細胞マーカーとしても知られる CD73 陽性の間質内紡錘型細胞数を測定すると、間質内 BG 発現と相関が見られ、stage D、粘液腫型間質症例で有意に高かった。また、BG 発現領域では CD73 陽性細胞も多く認められた。このように、大腸癌の粘液腫状間質では BG が高レベルに含まれており、BG に結合した TGF β が骨髄間葉系幹細胞の維持に関与することが示唆された。この粘液腫状間質の頻度を糖尿病合併大腸癌・非合併大腸癌と比較すると、糖尿病合併大腸癌で有意に多く認められた。HMGB1 は糖化促進に伴い分泌が増加し、骨髄間葉系幹細胞の動員をもたらしていると考えられた。このことから、骨髄間葉系幹細胞の大腸癌への動員は、大腸癌の糖尿病における悪性形質獲得機序の一つと考えられた。

3) リノール酸 (LA) やエライジン酸 (EA) などの生理活性を有する脂肪酸が、大腸癌の転移を促進することをすでに報告して来たが、今回はこれらの脂肪酸と腫瘍内の幹細胞への影響をマウス皮下腫瘍モデルを用いて検討した。CT26 マウス大腸癌細胞を同系の BALB/c 雄性マウス皮下に接種し、その後週 1 回 1mg/マウスの LA、EA または溶媒の 50% エタノール

を胃内投与し4週後に安楽殺し腫瘍を検討した。体重や主腫瘍径は群間に有意差はなかったが、総腫瘍重量および転移はEA群、LA群、対照群の順に多かった。また、1回の経口投与でEAでは幹細胞のマーカである血中nucleostemin mRNAレベルが上昇していた。Oct3/4陽性CT26細胞はEA群・LA群ともに対照群を上回ったが、CD133CT26細胞はLAで最も多かった。Oct3/4・CD73陽性、CD133・CD73陽性間質細胞(=骨髄間葉系幹細胞)は、LA群、EA群、対照群の順に多く見られた。EA群では、リン酸化EGFRレベルおよびMIB1 indexは他群より亢進していた。このように、間欠的に摂取される脂肪酸が腫瘍内の癌幹細胞および骨髄間葉系幹細胞に影響を与えることが示唆された。さらに、の報告も見られ一定しない。われわれは、マウス皮下腫瘍モデルを用いてICRと高脂肪食や高トランス脂肪酸食などの食事内容が腫瘍進展にもたらす影響について検討した。CT26マウス大腸癌皮下腫瘍モデルに週1回24時間飲水のみICRとし4週間施行した。また、食餌はCE-2食(C群)と10%エライジン酸食(E群)を用いた。腫瘍重量およびMIB1陽性癌細胞はEI群>E群>CI群>C群の順に高かった。CD133陽性、NS陽性癌細胞の経時的变化を検討すると、ICR-では有意な変動は認められなかったが、ICR+ではICR後の食事再開後1日目にピークを有するNS陽性癌細胞の増加がCI群・EI群に見られ、EI群で有意に高かった。これに対し、CD133陽性癌細胞はICR中に軽度増加したがICR後に正常に回復した。12週までICRサイクルを繰り返すと、EI群ではNS陽性癌細胞が徐々に増大した。以上のように、間欠的カロリー制限は食物中のがん幹細胞作動性物質の作用を増強し、がん促進効果を示す可能性が示唆された。

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21件)

- 1) Kurihara M, Ohmori H (他6名4番目) Protumoral roles of melanoma inhibitory activity 2 in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 108:1460-9, 2013.
- 2) Sasahira T, Ohmori H (他8名5番目) Trk B and C are tumor progressive and metastatic marker in colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 44:1098-1106, 2013.
- 3) Sasaki T, Ohmori H (他8名9番目) Increased phosphorylation of AKT in high-risk gastric mucosa. *Anticancer Res* 33:3295-300, 2013.
- 4) Sasaki T, Ohmori H (他8名9番目) AKT activation and telomerase reverse transcriptase expression are concurrently associated with prognosis of gastric cancer. *Pathobiology* 81:36-41, 2013.
- 5) Sasahira T, Kuniyasu H (他5名7番目) Trks

are novel oncogenes involved in the induction of neovascularization, tumor progression, and nodal metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Clin Exp Metasta* 30:165-176, 2013.

- 6) Luo Y, Kuniyasu H (他7名9番目) High mobility group box 1 released from necrotic cells enhances regrowth and metastasis of cancer cells that have survived chemotherapy. *Eur J Cancer* 49:741-751, 2013.

- 7) Shinagawa K, Kitadai Y (他9名2番目), Stroma-directed imatinib therapy impairs the tumor-promoting effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in an orthotopic transplantation model of colon cancer. *Int J Cancer* 132:813-23, 2013.

- 8) Sasaki T, Ohmori H (他6名7番目) Significance of epithelial growth factor in the epithelial-mesenchymal transition of human gallbladder cancer cells. *Cancer Sci* 103:1165-71, 2012.

- 9) Shimomoto T, Ohmori H (他5名3番目) AGE induce RAGE in the colonic mucosa of azoxymethane-injected Fischer 344 rats fed with a high-linoleic acid and high-glucose diet. *J Gastroenterol* 47:1073-83, 2012.

- 10) Shimomoto T, Ohmori H (他7名2番目) Diabetes-associated angiotensin activation enhances liver metastasis of colon cancer. *Clin Exp Metasta* 29:915-925, 2012.

- 11) Sasahira T, Kuniyasu H (他5名7番目) Downregulation of miR-126 induces angiogenesis and lymphangiogenesis and targets VEGF-A in oral cancer. *Br J Cancer* 107:700-6, 2012.

- 12) Luo Y, Kuniyasu H (他4名6番目) High MMP-to-E-cadherin ratio measured by bicolor fluorescent in situ hybridization is associated with lymphangiogenesis and lymph node metastasis in prostate cancer. *Urol Oncol-Semin Ori* 30:306-313, 2012.

- 13) Ito Y, Kuniyasu H (他10名12番目) Involvement of HMGB1 and RAGE in IL-1 β -induced gingival inflammation. *Arch Oral Biol* 57:73-80, 2012.

- 14) Nakamura S, Kitadai Y (他13名、8番目), Long-term clinical outcome of gastric MALT lymphoma after eradication of *Helicobacter pylori*: a multicentre cohort follow-up study of 420 patients in Japan. *Gut* 61:507-13, 2012.

- 15) Ohmori H (他3名1番目) Non-histone nuclear factor HMGB1 as a target in colorectal cancer. *Expert Opin Ther Tar* 15:183-193, 2011.

- 16) Luo Y, Ohmori H (他5名2番目) Anti-angiotensin and hypoglycemic treatments suppress liver metastasis of colon cancer cells. *Pathobiology* 78:285-290, 2011.

- 17) Sasahira T, Kuniyasu H (他4名6番目) Downregulation of runt-related transcription factor 3 (RUNX3) associated with poor prognosis of adenoid cystic and mucoepidermoid carcinomas of the salivary gland. *Cancer Sci*

102:492-497, 2011.

18) Takaki M, Kuniyasu H(他 6 名 8 番目) In vitro enhanced differentiation of neural networks in ES gut-like organ from mouse ES cells by a 5-HT4-receptor activation. *Biochem Biophys Res Commun* 406:529-533, 2011.

19) Bhawal UK, Kuniyasu H(他 6 名 8 番目) Basic helix-loop-helix transcription factor DEC1 negatively regulates CyclinD1. *J Pathol*, 224:420-429, 2011.

20) Sumida T, Kitadai Y (他 8 名 2 番目), Anti-stromal therapy with imatinib inhibits growth and metastasis of gastric carcinoma in an orthotopic nude mouse model. *Int J Cancer*. 128:2050-62, 2011.

21) Takata K, Kitadai Y (他 29 名 5 番目), Primary gastrointestinal follicular lymphoma involving the duodenal second portion is a distinct entity: a multicenter, retrospective analysis in Japan. *Cancer Sci* 102:1532-6, 2011.

〔学会発表〕(計 8 件)

1) Shimomoto T, Ohmori H (他 5 名 3 番目), Association between advanced glycation end products (AGE) and the receptor for AGE in colon carcinogenesis of azoxymethane-injected Fischer 344 rats fed with a high-linoleic acid and high-glucose diet. Society of Toxicology's 53rd Annual Meeting and ToxExpo, Phoenix, AZ, 2014.3.23-27

2) Luo Y, Ohmori H (他 3 名 3 番目), Cancer usurps skeletal muscle as an energy repository. 104th Annual Meeting of American Association for Cancer Research, San Diego, 2014.4.5-9

3) Luo Y, Ohmori H (他 6 名 7 番目), HMGB1 released from necrotic cells enhances regrowth and metastasis of cancer cells that have survived chemotherapy. Merinoff World Congress 2013:HMGB1, New York, NJ, USA, 2013.10.9-13

4) Luo Y, Ohmori H (他 7 名 8 番目), HMGB1 released from necrotic cells enhances regrowth and metastasis of cancer cells that have survived chemotherapy. The 18th Japan-Korea Cancer Research Workshop, Gifu, 2013.11.29-12.1

5) Luo Y, Ohmori H (他 8 名 7 番目), AKT activation and telomerase reverse transcriptase expression are concurrently associated with prognosis of gastric cancer. 4th JCA-AACR Special Joint Conference - The Latest Advances in Gastric Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics -, Urayasu, 2013.12.16-18

6) Luo Y, Ohmori H (他 8 名 3 番目), Angiotensin in colorectal cancer metastasis. 103rd Annual Meeting of American Association for Cancer Research, Chicago, 2012.3.31-4.4

7) Ohmori H (他 2 名 1 番目), Non-histone nuclear factor HMGB1 as a target in colorectal cancer. *Expert Opin Ther Tar* 15:183-193, 2011

8) Luo Y, Ohmori H (他 2 名 8 番目),

Determinants of the epithelial-muscle axis on embryonic stem cell-derived gut-like structures. *Pathobiology* 77(5):253-259, 2010.

〔図書〕(計 2 件)

1) Kuniyasu H, Ohmori H (他 2 名 4 番目), HMGB1 alters the immunity and metabolism of cancer-burden patients. In: *Current Research in Cancer* 7, 2013, eds. Sunitha M, Research Media, Kerala, India, 2013.

2) Luo Y, Ohmori H (他 2 名 2 番目), HMGB1 induces drug resistance in cancer cells In: *Current research in cancer* 5, 2011, eds: Sunitha M, Research Media, Kerala, India, 2011

〔その他〕

ホームページ

奈良県立医科大学分子病理学講座

<http://www.naramed-u.ac.jp/~molepath>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大森 斉 (OHMORI HITOSHI)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：80213875

(2) 研究分担者

國安弘基 (KUNIYASU HIROKI)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：00253055

北台靖彦 (KITADAI YASUHIKO)

広島大学・医歯薬学大学院・准教授

研究者番号：10304437

(3) 連携研究者

藤井 澄 (FUJII KIYOMU)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：30284189

千原良友 (CHIHARA YOSHITOMO)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：40405395

笹平智則 (SASAHIRA TOMONORI)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：90405374

佐々木隆光 (SASSAKI TAKAMITSU)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：00382284