

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23792381

研究課題名（和文） 癌発生に並行する周囲間質細胞悪性転化メカニズムの解明

研究課題名（英文） Elucidation of the surrounding stromal cells malignant conversion mechanism that parallels the development of cancer

研究代表者

森川 暁 (MORIKAWA SATORU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：00424169

研究成果の概要（和文）：

マウスおよびヒトがん組織において、がん上皮細胞と周囲間質細胞を培養操作なしで分離・解析することに成功した。このことは間葉系幹細胞を予期的に分離するための表面マーカーが再生医療への応用だけに限らず、がん組織に存在する悪性間質細胞をも分離・評価する解析方法として有用であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In human and mouse cancer tissues, we succeeded in isolating and analysis without culture operation around stromal cells and cancer epithelial cells. This is useful as a method of analyzing surface markers to separate the prospective mesenchymal stem cells is not limited to application to regenerative medicine, to separate and evaluation malignant stromal cells present in the cancer tissue it was suggested.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：間葉系細胞 癌周囲間質細胞

1. 研究開始当初の背景

口腔癌は実質である癌細胞とそれを支持する間質細胞から構成されている。癌組織においては、たとえそれが浸潤部でも、癌細胞（悪性転化上皮細胞）は全体の 50%以下であり、癌組織を構成する細胞の大部分は間質細胞からなる。近年、癌間質における癌関連線維芽細胞 (cancer/carcinoma-associated fibroblasts: CAFs) の存在が注目され、CAFs と非癌部線維芽細胞では遺伝子発現や増殖因子に対する反応性が異なると報告されている。癌の発生・増殖・浸潤・転移機序を解明する上で上皮-間葉相互作用という観点は不可欠であり、多くの癌研究者が CAFs を含む間質細胞の役割に注目している。間質細胞が癌細胞の浸潤・転移を促進している報告例

としては、癌細胞と扁平上皮癌組織から分離した CAFs を加えておくと癌細胞の浸潤が顕著に亢進すること、またヒト乳癌細胞株とヒト骨髄間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells: MSCs) とを一緒に免疫不全マウスの皮下に移植すると、癌細胞単独で移植したときに比べて肺転移が顕著に亢進することが示され、MSCs が遠隔転移を促進しうることが示唆されている。申請者らはこれまでにフローサイトメーター (FCM) による細胞分離技術を活用した組織幹細胞分離に関する研究を精力的に行ってきた。再生医療の分野で注目されている MSCs は、これまで有効な抗原マーカーが知られていなかったために、生体内での動態を詳細に解析することが不可能であった。このような問題点を解決するため、申

請者はマウスでは CD140a(PDGFR α)⁺Sca-1⁺CD45^{Ter119}⁻、さらにヒトでは CD90(Thy-1)⁺CD271(LNGFR)⁺を MSCs 特異的マーカーとして同定し、MSCs およびその他の間葉系細胞分画を直接生体から分離する技術を確立した。これまで間質線維芽細胞が癌細胞により変化を受ける(教育される)悪性転化メカニズムを詳細に解析した報告は少ない。その原因の一つとして、これまでの MSCs をはじめとする癌間質細胞の実験系が培養によって樹立された細胞(血液細胞も含む雑多な間質細胞集団)を用いて行われてきたことが原因としてあげられる。そこで申請者が確立した FCM による間葉系細胞を各分画に分けて解析する実験系を駆使することで、間質細胞の悪性転化の様子を各病期、各細胞分画に分けてリアルタイムに解析することが可能であると考えられる。各間質細胞分画における癌形成促進因子(血管新生因子・リンパ管形成因子・炎症関連メディエーター)を突き止め、口腔癌や他の消化器癌の間質細胞に焦点を当てた治療戦略への足がかりをつかみたいと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、正常上皮組織から癌が発生していく過程(正常上皮→異形性→前癌病変・前癌状態→癌)と同時に進行していると予想される癌周囲間質細胞の悪性転化メカニズムを、癌形成促進因子に注目して詳細に解析しようと計画した。具体的な研究項目は①癌自然発症型マウスを用いて、癌が発生・増殖・浸潤する各過程における間葉系細胞を、細胞表面抗原を指標にフローサイトメーターにより分離し、その性状を解析する実験系を構築する。②各病期、各間葉系細胞分画における癌形成促進因子を検証する。③癌形成促進因子を遮断することで、癌の浸潤・転移抑制効果をマウスおよびヒトで検証する、の3つであった。上述の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究は癌自然発症型マウスを用いて、癌が発生・浸潤していく過程における正常間質細胞から悪性間質細胞への転化の様子を以下の項目を検討することによって明らかにしようと計画した。

(1) 扁平上皮癌自然発症型マウスの癌発生部位において、上皮細胞が「正常上皮細胞→異形性→前癌病変→癌細胞」へと変化していく各過程で、各病期における癌組織細胞を血球系マーカーである CD45、Ter119、間葉系細胞マーカーである PDGFR α 、Sca-1 にて染色し、FCM を用いてそれぞれの細胞集団の変異を解析する。(2) 扁平上皮癌が進行していく各病期の段階で、上記マーカーを使って各細胞集団に分けられた PDGFR α ⁺Sca-1⁺、PDGFR α ⁺Sca-1⁻、PDGFR α ⁻Sca-1⁺、PDGFR α ⁻Sca-1⁻の各細胞集団を対象に、癌の生存・増殖・浸

潤・転移に寄与すると考えられている血管新生(angiotropin, HGF, bFGF, CYR61, VEGF-A, CTGF)、リンパ管新生(VEGF-C, VEGF-D)、炎症関連遺伝子遺伝子(CXCL1/2/5/12, IL-1/6, CCL3/5, MMP3/12, COX-2, TNF- α)を RT-PCR、定量的 RT-PCR を用いて、またタンパク質発現をウェスタンブロット法、ELISA 法にて解析する。

(3) 病期が進行するに伴い、有意に細胞数が増加する分画、あるいは発現量が上昇する血管新生因子、リンパ管新生因子、炎症促進因子がみつければ、その因子に対する中和抗体、あるいは RNA 干渉(RNA interference: RNAi)によって腫瘍の進展を抑制できるかを検討する。

(4) ヒト前癌病変(白板症・紅板症)、前癌状態、癌組織においてもヒト MSCs マーカーである CD90、CD271 を用いてマウス同様の解析を行う。

3. 研究の方法

マウスおよびヒト扁平上皮癌における、癌細胞周囲間質・間葉系細胞にフォーカスをあてた新規化学療法の開発研究へと展開するため、本研究計画では以下の研究方法を予定した。①扁平上皮癌自然発症型マウスの各病期における間葉系細胞分画を FCM にて解析する。②各病期、各間葉系細胞集団における血管新生因子・リンパ管新生因子・炎症促進因子を調べる。③各癌促進因子に対する中和抗体、あるいはその因子の下流シグナルに対するノックダウン法によって腫瘍の進展を抑制できるかを検討する。④ヒト前癌病変(口腔白板症・紅板症)、前癌状態(口腔扁平苔癬)、口腔扁平上皮癌組織に対して CD90 と CD271 を用いて、FCM および免疫組織化学的手法による解析を行い、各病期、各分画における血管新生因子・リンパ管新生因子・炎症促進因子を調べる。計画した具体的な研究方法を以下に示す。

(1) 扁平上皮癌自然発症型マウスに発生した癌組織から、腫瘍間質を構成する間葉系細胞分画の特異抗原を指標とした FCM による解析。これまで癌幹細胞の細胞表面抗原を同定するために、癌幹細胞に発現している特異的細胞表面抗原マーカーを指標として、FCM にて分離し、採取した細胞の移植実験にてその造腫瘍効果を検討する報告は数多くあった。しかしながら癌組織を構成する血球系細胞(マクロファージ)や、間質・間葉系細胞が癌細胞の生存・増殖・浸潤を支持しているという報告はあるものの、癌組織の間質細胞を直接分離する実験系を確立させ、報告した研究は少ない。このことは間質・間葉系細胞を直接解析することが可能な細胞表面マーカーが同定されなかったことがその原因として上げられる。そこで以下の方法により、腫

瘍間質の遷移を病期毎に観察しその性状を明確にすることを目的とした。

①扁平上皮癌自然発症型マウスの間質細胞悪性転化の様子を調べるため、癌細胞周囲に存在する悪性間質細胞を培養操作なしで直接分離する実験系を確立する。具体的には、扁平上皮癌発生（予定）部位から、上皮および上皮結合組織まで含めた組織を採取し、細胞生存率の高い（機械的）細胞調整法やコラゲナーゼ濃度、処理時間等の条件を設定する。

②最もわかりやすく細胞分画を分けることのできる細胞表面マーカー（CD45、Ter119、PDGFR α 、Sca-1）と蛍光色（FITC、PE、APC等）の組み合わせの条件を検討する。

（2）癌組織中の間葉系細胞分画における血管新生、リンパ管新生、炎症性因子を検索し、CAFsへの教育機構を明らかにする。これまで癌細胞の生存・増殖・浸潤・転移を支持すると報告されている腫瘍内血管新生、あるいは癌とCAFsの関連性についての報告はあるものの、癌細胞が増殖・浸潤していくのと同時に間質細胞による血管新生因子や癌細胞増殖促進因子について、包括的かつ縦断的に解析した研究報告は少ない。またCAFsと呼ばれている一連の癌間質周囲細胞は、実際癌細胞にどのように働きかけるものなのか、またはどのような細胞表面マーカーを発現しているのか等、具体的なことはわかっていない。本研究では癌が増殖していくどの過程で血管やリンパ管ができてくるのか、あるいはどの時点で間質細胞から炎症性サイトカインが有意に上昇し、癌細胞の増殖や転移に働きかけるのかを明らかにする。またその細胞分画が明らかになれば、それをCAFsと同定できると考えた。また転写因子として癌周辺の炎症を起し、癌の増殖を助けると報告されているNF- κ Bは本研究の重要な解析対象であるCXCL1/2、IL-1/6、TNF- α などの炎症性サイトカインを一括して生成させる大きな特徴がある。CAFsを含む、あるいはCAFsを生じる間葉系細胞にて、その発現量が上昇していることが強く予想されるため、腫瘍組織におけるNF- κ Bの発現も確認しようと考えた。

①癌が進行していく各病期、各間葉系細胞分画における血管新生因子（angiopoietin、HGF、bFGF、CYR61、VEGF-A、CTGF）、リンパ管新生因子（VEGF-C、VDGF-D）をRNAレベルではRT-PCR、定量的RT-PCRを用いて、またタンパク質レベルではELISA法、ウェスタンブロッティング法にて時系列でその発現量を調べる。また腫瘍血管細胞やCAFsの起源が骨髄由来MSCsとする報告もある。これを検証するために、癌病変が進行していく過程で採血を行い、FCMにて解析する。申請者はマウス、ヒトともに正常末梢血中にMSCsは存在

しないことを確認していた。

②これまでの予備的実験にて、癌病変における血管新生や癌細胞の転移に関連すると報告されているオステオポンチン（OPN）がヒト口腔扁平上皮癌の浸潤端に接する間質細胞において発現していることを確認していた。OPNを含む炎症促進因子およびサイトカイン（OPN、CXCL1/2/5/12、IL-1/6、CCL3/5、MMP3/12、TNF- α ）がどのタイミング、どの細胞分画で上昇しているのかをRT-PCR、定量的RT-PCR、ELISA法、ウェスタンブロッティング法にて解析する。

（3）血管新生因子、リンパ管新生因子、炎症促進因子に対する中和抗体、あるいはロックダウン法によって腫瘍の進展を抑制できるかを*in vitro*および*in vivo*にて調べる。

①癌細胞支持因子を発現している間葉系細胞集団をFCMにて分離、培養し、RNAiにて関連遺伝子のロックダウン、あるいは中和抗体を利用した発現タンパク質の抑制が可能であるかを培養実験によって調べる。

②癌自然発症型マウスに対し、RNAiおよびタンパク質レベルにて有意に発現が上昇していた因子に対しては中和抗体とRNAi、NF- κ Bに対してはRNAiによる腫瘍抑制効果を確認する。

（4）ヒト前癌病変（白板症・紅板症）、前癌状態（口腔扁平苔癬）、口腔扁平上皮癌における癌細胞周囲間質細胞の同定と、癌の生存・増殖・浸潤・転移促進因子の解析

ヒト前癌病変（白板症・紅板症）、前癌状態（口腔扁平苔癬）およびヒト口腔扁平上皮癌に対して、ヒトMSCsマーカーであるCD90とCD271を指標に、FCMによる解析を行い、各病期および各細胞分画における血管新生因子・リンパ管新生因子・炎症促進因子を調べる。

①ヒト癌病変を正常の状態から前向きに経過を追って観察することは不可能であるが、病理学的はっきり定義されている前癌病変や前癌状態ではCD90⁺CD271⁺、CD90⁺CD271⁻、CD90⁻CD271⁺、CD90⁻CD271⁻のどの分画が有意に増加しているのかをFCMによる解析で確認できると考えた。

②各病期・各分画における血管・リンパ管形成、炎症関連遺伝子およびタンパク質について、マウスの解析にて用いた手法にて調べる。

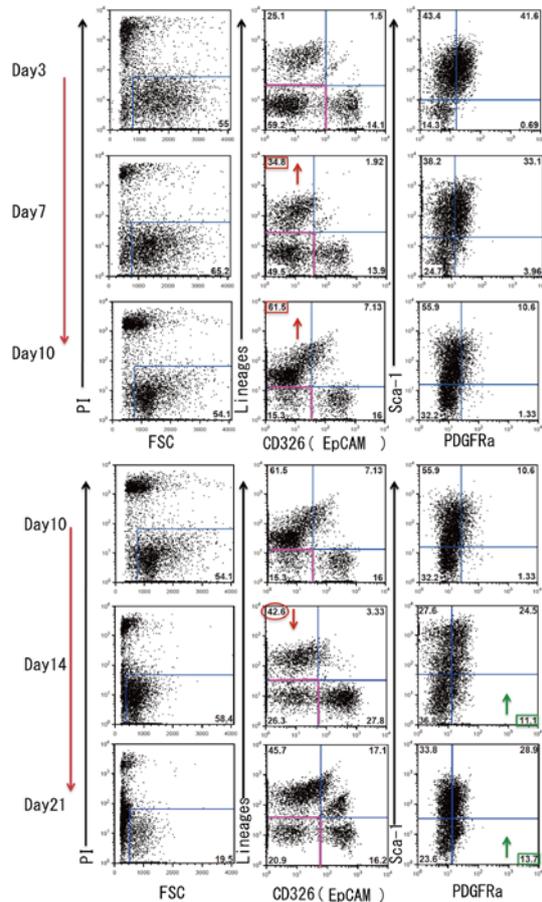
（5）ヒト前癌病変、前癌状態、口腔扁平上皮癌切除標本における悪性間質細胞と血管・リンパ管新生および炎症関連タンパク質の発現領域の解析。各切除検体における、ヒトMSCsマーカーCD90/CD271と血管・リンパ管形成、炎症関連各タンパク質およびNF- κ Bを対象に、癌上皮細胞との位置関係や発現領域、発現量を免疫組織染色によって明らかにする。以上の研究結果が得られれば、現在の増殖性上皮細胞に焦点を当てた化学療法と

組み合わせることで、上皮細胞と間質細胞に標的を持った新規化学療法を開発するきっかけをつかめると考えた。

4. 研究成果

平成 23 年度

扁平上皮癌自然発症型マウスに発生した癌組織から、腫瘍間質を構成する間葉系細胞分画の特異抗原を指標とした FCM による解析を予定した。海外の研究室より、扁平上皮癌自然発症型マウス (K-14-HPV16) を譲渡していただけたところまで契約できたが微生物感染症の審査により、当大学への搬入が困難であると判定された。そのためマウス扁平上皮癌モデルを自然発症型ではなく、浸潤様式 4C のヒト口腔癌細胞株 (OSC-19) を用いて、免疫不全マウス (BALB/c nu/nu) に移植し、そのマウスにおける癌周囲間質細胞の解析を行うこととした。ヒト腫瘍細胞をマトリゲルと一緒に免疫不全マウスに移植し、その病態を解析する手技を確立することに成功した。また、これらの腫瘍組織における間質細胞を解析するために最もわかりやすく細胞分画を分けることができる間葉系細胞表面マーカー (CD45, Ter119, PDGFR α , Sca-1) と蛍光色 (FITC, PE, APC 等) の組み合わせの条件を検討し、CD326 (癌細胞マーカー) -PE、Lineage marker (血球系マーカー) -PE-Cy7、



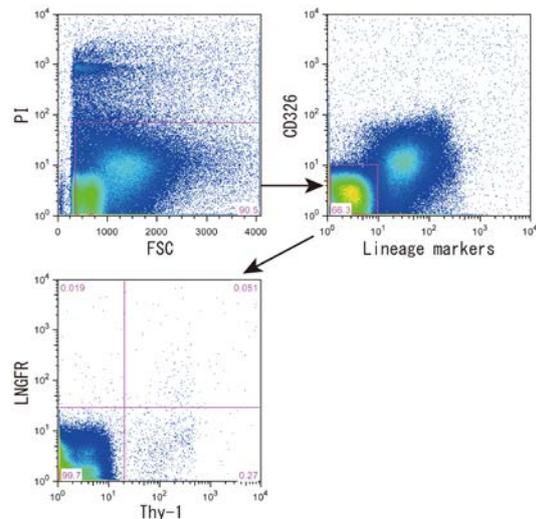
PDGFR α (間葉系幹細胞マーカー) -APC、

Sca-1 (間葉系幹細胞マーカー) -FITC の組み合わせが最も解析しやすい組み合わせであることがわかった。

このマウスの各病期における間葉系細胞分画を FCM にて解析した結果を示す。FCM の解析より、移植後 3~10 日にかけて腫瘍組織の移植による炎症反応と思われる変化が Lineage marker (血球系細胞) 分画の上昇によって確認できた。また、移植後 10~21 日にかけて間葉系細胞分画である CD140a (PDGFR α)⁺Sca-1⁻分画が 1.33%→11.1%→13.7%と上昇していることが確認できた (左下図)。現在この結果を追試中であり、がん組織の増大とともに上昇してきたこの CD140a (PDGFR α)⁺Sca-1⁻分画を血管新生因子や炎症促進因子について解析中である。

平成 24 年度

前年度確立した腫瘍組織を癌細胞と間質細胞に、培養操作を経ることなく、細胞が生存した状態で FCM にて解析する方法をヒト口腔癌切除組織に応用しようと試みた。ヒト癌組織の場合でもマウスと同じように最もわかりやすく細胞分画を分けることができ、かつ細胞生存方法が高い機械的処理方法の条件等を行なった。その結果、CD326 (癌細胞マーカー) -PE、Lineage marker (血球系マーカー) -FITC、LNGFR (=CD271) (間葉系幹細胞マーカー) -APC、Thy-1 (=CD90) (間葉系幹細胞マーカー) -PE-Cy7 の組み合わせが最も解析しやすい組み合わせであることがわかった。現在症例数・検体数を増やし、解析を進めている。今回の研究によってはじめてヒトがん組織から培養操作をすることなく、がん細胞と癌細胞周囲の間質細胞を分けることに成功した (下図)。



今後はこの手法を用いて癌組織における間質細胞が、通常の組織における間質細胞と異なるのかどうか、異なるのであれば、がんの増殖・転移に関係するタンパク質が発現しているかどうかを解析していく予定である。

具体的には炎症促進因子およびサイトカイン (OPN, CXCL1/2/5/12, IL-1/6, CCL3/5, MMP3/12, TNF- α)がどのタイミング、どの細胞分画で上昇しているのかを RT-PCR、定量的 RT-PCR、ELISA 法、ウェスタンブロッティング法にて解析する。

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 1 件)

1. Houlihan DD, Mabuchi Y, Morikawa S, Niibe K, Araki D, Suzuki S, Okano H, Matsuzaki Y. Isolation of mouse mesenchymal stem cells on the basis of expression of Sca-1 and PDGFR α . Nature Protocols 7(12) 2103-11 2012, 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

1. Satoru Morikawa Isolation and functionally distinct mesenchymal stem cells in human bone marrow. American Academy of periodontology (AAP) 98th ANNUAL MEETING, Los Angeles, USA, September 29-October 2, 2012

2. Yo Mabuchi, Satoru Morikawa LNGFR and Thy-1 based prospective isolation of human mesenchymal stem cells reveal functional distinct subpopulations. International Society for Stem Cell Research (ISSCR), 10th ANNUAL MEETING Yokohama, June 13-16, 2012

3. Yo Mabuchi, Satoru Morikawa Single cell isolation elucidates heterogeneity within the human mesenchymal stem/progenitor cell compartment. International Society for Stem Cell Research (ISSCR), 9th ANNUAL MEETING, Canada, June 15-18, 2011

[その他]

<http://dent-os.med.keio.ac.jp/KEIO/>
研究グループの紹介

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森川 暁 (MORIKAWA SATORU)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：00424169