

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300333

研究課題名(和文)新しい初代癌細胞培養法を用いた、癌における破壊・再生連鎖の解析

研究課題名(英文) Malignant conversion of cancer cells by disruption and remodeling of cancer cell-clusters in newly developed primary culture system

研究代表者

井上 正宏 (INOUE, Masahiro)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター(研究所)・研究所・総括研究員(生化学部門長)

研究者番号：10342990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円

研究成果の概要(和文)：創傷治癒と同様に、癌細胞集団の構造破壊とそれに伴う再生が癌の進展に関与している可能性がある。我々が開発した患者癌組織から癌細胞を三次元培養する新しい方法(CTOS法)を用いて、CTOSの構造破壊とその後の再生に着目し、破壊・再生過程を病理学的・分子生物学的に解析した。破壊再生過程で増殖能と幹細胞性が亢進した。破壊再生過程で発現上昇する遺伝子群(破壊再生シグナチャー)は大腸癌患者の予後を反映していた。WNTシグナルとERBBシグナルが重要な役割を果たしていた。以上より腫瘍内の炎症などによる破壊的環境は癌細胞集団の破壊再生連鎖を惹起することで癌の悪性化に寄与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Similar to wound healing, disruption of cancer cell-clusters and afterward regeneration might ignite malignant conversion of cancer cells. We recently developed a novel primary culture system (CTOS method), which enables us 3D culture of cancer cells retaining patient tumor characteristics. In this study, we focused on the process of disruption/remodeling. After disruption, CTOS quickly recovered its shape (remodeling). Stimulation by disruption rendered more proliferation and stemness to the cancer cells. Gene signature, which upregulated after disruption, predicted prognosis of colorectal cancer patients. WNT signaling as well as ERBB signaling was critical in the process. Taken together, destructive microenvironment in a tumor such as inflammation might contribute to the malignant conversion of cancer cells.

研究分野：腫瘍生化学

キーワード：癌 培養 破壊 再生 幹細胞性 WNTシグナル ERBBシグナル

1. 研究開始当初の背景

癌は創傷治癒と類似しており、癌細胞集団の構造破壊とそれに伴う再生(破壊・再生連鎖)が癌の進展に関与している可能性がある。

正常組織では上皮細胞は集団として組織を形成する。つまり、正常上皮細胞は集団として組織化することではじめて極性や分化を示し、さまざまな機能を発揮する。一方、癌は正常細胞の秩序をむしろ破壊する側面を持つため、これまで細胞集団としての特性はあまり注目されてこなかった。正常上皮においては上皮構造の破壊である創傷と、再生過程である治癒は密接に関連している。癌においては、これまで癌幹細胞や上皮間葉移行など再生過程については注目されてきたが、それを破壊・再生の連鎖として捉える視点に欠けていた。

我々は患者癌組織から癌細胞を培養する新しい方法を開発した。細胞細胞間接着を維持したまま無血清・浮遊培養すると、純粋な癌細胞からなる細胞塊(cancer tissue-originated spheroid, CTOS)を調製できる。CTOSは癌細胞集団の三次元的特徴を維持している上に、機械的破壊後に短時間に再生することから、癌細胞集団の破壊・再生連鎖の研究に最適である。CTOSを長期間培養すると増殖能は低下するが、分割操作を加えることにより増殖能の低下を回避できる。このような癌細胞集団の機能は、癌の三次元的性質の多くを失った細胞株の凝集塊を用いた実験では研究しえない。

これまで治療感受性は癌細胞自身の細胞増殖抑制や細胞死の誘導で規定されていると考えられてきた。癌治療自体は癌細胞にとっては破壊的操作であり、それに応じて再生過程が惹起される可能性がある。本研究によって治療による破壊・再生連鎖が明らかになれば、再生能力が治療感受性を規定する新たな因子として浮かびあがる可能性がある。

2. 研究の目的

CTOSを長期間培養すると増殖能は低下するが、分割操作を加えることにより増殖能の低下を回避できることから、癌細胞スフェロイドの構造破壊は何らかの質的变化をもたらすと予想した。本研究ではCTOSの構造の破壊によって惹起される再生に注目して、破壊・再生連鎖の過程を病理学的・分子生物学的に明らかにし、そのマーカーを同定すること、さらに癌の進展・悪性化や治療応答と破壊・再生連鎖の関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

以前に発表した方法に従って、大腸癌CTOSを調製した。ヒト腫瘍あるいはマウス移植腫瘍を機械的に細断し、さらにコラゲナーゼ含有培地で分散した。メッシュフィルターを利用して、直径40-100マイクロメートルの腫瘍断片を回収し、hStemPro培地で培養しCTOSを得た。1週間培養したCTOSを注射針を装着したシリンジにCTOSを含む培地を吸引し吐出する操作を繰り返すことによってCTOSを部分的に破壊した。

CTOSのサイズは位相差顕微鏡写真からCTOS面積を算出するか、ATP含量を測定することで評価した。増殖能の変化はBrdUの取り込み、Ki67の染色陽性細胞比で評価した。幹細胞性はCTOSを単細胞に分散して、単細胞からのスフェロイド形成能を評価した。少数の一定数(10-50)のCTOSをマウス皮下に移植し、腫瘍形成能を評価した。遺伝子の網羅的発現解析はAgilent社のマイクロアレイを用いて行った。PigyBacプラスミドはエレクトロポレーションで導入した。免疫染色、ウエスタンブロット、フローサイトメーターによる解析は以前に発表した方法に従っておこなった。

4. 研究成果

まず、CTOS の機械的破壊に関して同期性・再現性のよい実験プロトコルを確立した。単細胞化せず、細胞塊として部分的に破壊されるように機械的破壊を行い、破壊後の細胞塊のサイズと細胞死を指標に手技の均一化に成功した。次に CTOS 破壊後の経時変化を時・空間的に解析した。CTOS は輝度・透明度が高く、表面が平滑であるが、破壊後表面が粗な不定形の断片となる。破壊後 24 時間以内に急速に球状に復し、数日をかけて再び輝度・透明度が高く、表面が平滑な CTOS になる。

未破壊の CTOS と比較して、破壊後再生した CTOS は一部増殖能が増加するものがあったが、すべて臨床病期 IV の患者腫瘍由来のものであった。一方、スフェロイド形成能は調べた 10 例の CTOS すべてで破壊後に亢進した。また、破壊後に有意にマウス造腫瘍能が亢進した。さらに既報の癌細胞マーカーの発現変化をフローサイトメーターで解析したところ、total CD44 および CD44v9 の発現が破壊後に上昇した。

破壊後の再生過程にある CTOS を経時的にサンプリングし、マイクロアレイ法により遺伝子発現を網羅的に解析し、再生過程で増加する遺伝子群を破壊再生応答遺伝子群とした。次に公共のデータベースを利用して、大腸癌患者のクラスタリング解析を行い、予後不良群で増加する遺伝子群を破壊再生シグナチャーとした。破壊再生シグナチャーは増殖や発生、生体防御に関与する遺伝子を多く含み、正常細胞における創傷治癒過程で上昇する遺伝子群と類似していた。別の大腸癌患者セットで予後解析をしたところ、破壊再生シグナチャーの顕著な患者群は予後不良であった。さらに破壊再生シグナチャーを GSEA 解析したところ、WNT 経路の活性化と有意に関連した (図 1)。

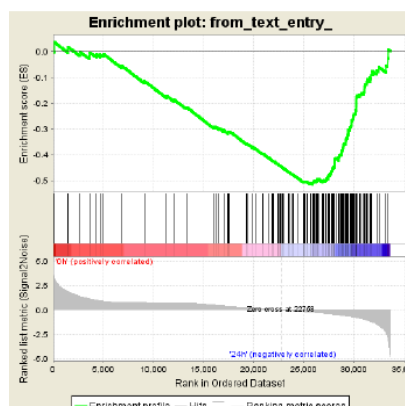


図 1 破壊再生シグナチャーの WNT シグナル GSEA 解析

そこで、破壊再生過程における WNT シグナルの意義を検討した。まず、WNT シグナルレポーターを恒常的に発現する CTOS を作成し、破壊再生過程での経時変化を観察した (図 2)。

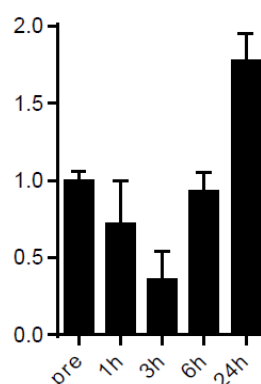


図 2 CTOS 破壊後の TOPFLASH の経時変化

WNT 活性が経時的に上昇することが確認できた。さらに破壊後 24 時間後の CTOS では b-catenin が核内に移行することを明らかにした。WNT 下流遺伝子の発現上昇も観察された。次に WNT シグナルの増殖と幹細胞性への関与を明らかにするために、WNT 阻害剤である XAV を用いて、増殖と幹細胞性への効果を検討したところ、共に WNT 阻害剤によって抑制された (図 3)。以上から、WNT シグナルは破壊再生において機能的であることが明らかになった。

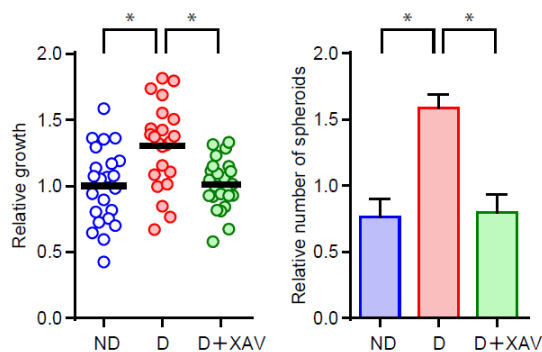


図3 増殖（左）と幹細胞性（右）に対する WNT シグナル阻害効果

これまでに大腸癌をふくむ多くの CTOS 培養で ERBB3 のシグナルを活性化することが重要であることを報告してきた。そこで、破壊再生過程での ERBB3 のシグナルを検討したところ、破壊とともにリガンド (HRG/NRG1) の存在下で ERBB3 のシグナルが劇的に活性化されていた。抗 ERBB3 抗体は増殖とスフェロイド形成能を抑制した。

これまで治療感受性は癌細胞自身の細胞増殖抑制や細胞死の誘導で規定されていると考えられてきた。本研究によって破壊・再生連鎖が明らかになったことから、再生能力が治療感受性を規定する新たな因子として浮かびあがる可能性がある。事実、CTOS にさまざまな治療的破壊（抗がん剤、放射線）を加えた場合、低用量あるいは低線量ではむしろ増殖や幹細胞性が増加した。

前述の破壊再生シグナチャーを用いてヒト腫瘍と CTOS およびマウス移植腫瘍を比較した場合、試験した例すべてでヒト腫瘍においてシグナチャーが明らかに強い。このことは、ヒト腫瘍で見られる破壊的環境が、破壊していない CTOS やマウス移植腫瘍では起こっていないことが示唆された。事実、マウス腫瘍に機械的な創傷を作成した場合、創傷部周辺細胞は b-catenin の核局在や破壊再生シグナチャーに含まれるタンパクの発現が上昇した。

しかし、本研究期間内には免疫不全マウスで十分な炎症を惹起する系を確立するには至らなかった。今後ヒト腫瘍をより反映した新たなモデルの開発が必要であると考えられる。

以上より、癌細胞塊の 3 次元構造の破壊とその後の再生が癌細胞に増殖や幹細胞性などの悪性形質を誘導することが明らかになった。このような現象は従来の樹立癌細胞株の 2 次元培養では観察できないし、樹立癌細胞株を 3 次元培養しても観察できない。今後、CTOS を用いた癌細胞の三次元特性の研究により、新たな癌細胞特性が明らかにされていくと考えられる。

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 8 件)

- 1) Yoshida T, Okuyama H, Nakayama M, Endo H, Nonomura N, Nishimura K, Inoue M. High-dose chemotherapeutics of intravesical chemotherapy rapidly induce mitochondrial dysfunction in bladder cancer-derived spheroids. **Cancer science** 2015;106(1):69-77. 査読有
DOI:10.1111/cas.12567
- 2) Nakajima A, Endo H, Okuyama H, Kiyohara Y, Kimura T, Kamiura S, Hiraoka M, Inoue M. Radiation sensitivity assay with a panel of patient-derived spheroids of small cell carcinoma of the cervix. **Int J Cancer** 2014;136:2949-60. 査読有
DOI:10.1002/ijc.29349
- 3) Endo H, Okuyama H, Ohue M, Inoue M. Dormancy of Cancer Cells with Suppression of AKT Activity Contributes to Survival in Chronic Hypoxia. **PloS one** 2014;9(6):e98858. 査読有
DOI:10.1371/journal.pone.0098858
PONE-D-14-03626[pil]

- 4) Okuyama H, Yoshida T, Endo H, Nakayama M, Nonomura N, Nishimura K, Inoue M. Involvement of heregulin/ HER3 in the primary culture of human urothelial cancer. **J Urol** 2013;190(1):302-10. 査読有
DOI:10.1016/j.juro.2012.12.106
S0022-5347(13)00008-6[pii]
- 5) Endo H, Okami J, Okuyama H, Kumagai T, Uchida J, Kondo J, Takehara T, Nishizawa Y, Imamura F, Higashiyama M, Inoue M. Spheroid culture of primary lung cancer cells with neuregulin 1/HER3 pathway activation. **J Thorac Oncol** 2013;8(2):131-9. 査読有
DOI:10.1097/JTO.0b013e3182779ccf01243894-201302000-00002[pii]
- 6) 井上正宏. 癌幹細胞のアッセイシステム 新しい三次元培養法による癌幹細胞の解析. 医学のあゆみ 2015;250(1):83-8. 査読無
- 7) 井上正宏. がん細胞の低酸素応答. 実験医学 2012;30(17):2793-98. 査読無
- 8) 井上正宏. 大腸癌の発生から転移まで 最近の話題. 日本消化器病学会雑誌 2012;109(12):2007-13. 査読無

〔学会発表〕(計 57 件)

- 1) 井上正宏, ヒト癌移植マウス腫瘍の ex vivo 培養が示す癌細胞の可塑性, 平成 26 年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ, 2015.2.6, 琵琶湖ホテル(大津市)
- 2) 井上正宏, 臨床癌の再構築を目指した新しい癌初代培養法の開発と応用, 第 25 回新薬創製談話会, 2014.9.9, 京都嵐山らんざん(京都市)
- 3) 井上正宏, 三次元培養法から見えてくる癌細胞の増殖と休眠, 第 10 回日本病理学会カンファレンス 2013 六甲山, 2013.8.3, 六甲山ホテル(神戸市)
- 4) Piulats R, Jose M, 奥山裕照, 遠藤洋子, 井上正宏, Influence of disruption on tissue remodeling in cancer tissue-originated spheroids (CTOS) (新規 3 次元初代培養がん細胞 (CTOS) の組織再生における破壊の影響, 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012.9.19, ロイトン札幌(札幌市)
- 5) Masahiro Inoue, Primary Spheroid Culture of Cancer Cell as a Function Unit of Cancer, World Congress on In Vitro Biology, 2012.6.6, Hyatt Regency Bellevue, Washington USA

6 . 研究組織

(1)研究代表者

井上 正宏 (INOUE Masahiro)
地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター(研究所)・研究所・総括研究員(生化学部門長)
研究者番号：10342990

(2)研究分担者

奥山 裕照 (OKUYAMA Hiroaki)
地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター(研究所)・研究所・総括研究員
研究者番号：50432373

(3)研究分担者

遠藤 洋子 (ENDO Hiroko)
地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター(研究所)・研究所・研究員
研究者番号：20359300