

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700979

研究課題名(和文) 骨髄間葉系幹細胞の大腸癌増殖促進機構におけるメタロチオネインの重要性に関する研究

研究課題名(英文) The role of metallothionein genes in tumor-promoting effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in human colon cancer

研究代表者

品川 慶 (SHINAGAWA, KEI)

広島大学・大学病院・医科診療医

研究者番号：50623609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)の大腸癌増殖・転移促進機構を解明する目的で、共培養実験、ヒト大腸癌同所移植ヌードマウスモデル、ヒト大腸癌組織を用いて検討した。大腸癌細胞をMSCと非接触性に共培養するとメタロチオネイン(MT)の発現が上昇し、接触性に共培養するとフィブロネクチン(FN)の発現が上昇した。ヒト大腸癌組織では、浸潤先進部でMTやFNの発現が高く、ヌードマウス同所性大腸癌組織を用いた検討では、腫瘍間質に取り込まれたMSC近傍の癌細胞でFNを高発現し、上皮マーカーの発現が減弱していた。このことからMSCにより形成される腫瘍間質が癌細胞のEMTを誘導していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the role of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) on tumor growth and metastasis in human colon cancer, we performed microarray analysis of gene expression in KM12 SM cells co-cultured with MSCs. Expression of metallothionein (MT) or fibronectin (FN) mRNA by KM12SM cells was increased markedly by indirect or direct co-culture with MSCs, respectively. We also examined MT and FN expression in surgical specimens of human colorectal neoplasms by immunohistochemistry. Expression of MT and FN in tumor cells was detected at the invasive edge. Furthermore, in an orthotopic nude mouse model of colon cancer, expression of FN was high in tumor nests near MSCs recruited in the tumor microenvironment, and expression of E-cadherin was decreased in tumor cells that expressed FN. These findings suggest MSCs recruited into tumor stroma may promote tumor growth and metastasis through induction of mesenchymal-epithelial transition in invasive colorectal cancers.

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：間葉系幹細胞 メタロチオネイン フィブロネクチン 大腸癌

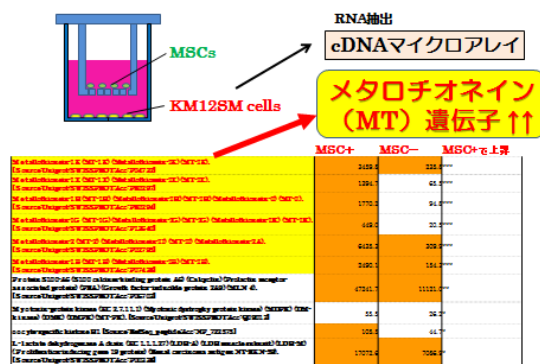
1. 研究開始当初の背景

骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) は創傷部のみならず癌間質に遊走することが報告されている。我々はこれまでに、ヌードマウス同所性大腸癌モデルにおいて MSC が大腸癌間質形成に寄与し、癌の増殖・転移を促進することを報告してきた (Shinagawa K, et al. Int J Cancer, 2010)。さらに、分子標的薬である PDGFR チロシンキナーゼ阻害剤により MSC の腫瘍間質への遊走や生存が阻害され、MSC に関連する間質反応を抑えることで腫瘍の増殖、転移を制御できることを報告した (第 102 回米国癌学会 2011, Shinagawa K, et al. Int J Cancer, 2013)。MSC の腫瘍増殖・転移促進作用を標的とした分子標的治療により、MSC の腫瘍間質への動員や腫瘍微小環境での生存を阻害することが明らかにされたものの、癌細胞自身が MSC によりどのような影響を受けるのかについてはさらなる検討課題であった。

2. 研究の目的

このような背景のなか我々は最近、cDNA マイクロアレイ法による網羅的な解析にて、大腸癌細胞を MSC と非接触性に共培養することでメタロチオネイン (MT) 発現が著明に上昇することを見出した (図 1)。

MSCs との非接触共培養による KM12SM 細胞の遺伝子発現の変動
cDNA microarray analysis (human oligochip 25K)



MT は抗アポトーシス作用、細胞増殖促進などに関与し、癌の進展に寄与するとの報告もあり、MSC が骨髄から腫瘍微小環境へ遊走し癌細胞の MT 発現を高めることで増殖・転移を促進しているのではないか、との仮説をたて、大腸癌の増殖・進展・転移における MSC - 腫瘍相互作用の重要性と MT の役割についての解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) cDNA マイクロアレイ結果の再現性の検証

ヒト大腸癌細胞株 KM12SM とヒト骨髄由来 MSC と「非接触性」に共培養し、KM12SM 細胞から mRNA を抽出し、定量的 RT-PCR (real-time PCR) を行った。また、ヌードマウスの盲腸壁に KM12SM 細胞 (0.5 × 10⁶ 個) と MSC (1 × 10⁶ 個) を混ぜて実体顕微鏡下に同所移植し、6 週間後に形

成された腫瘍組織の定量的 RT-PCR を行った。

(2) ヒト大腸癌組織における MT 発現とその意義

ヒト大腸癌症例 (101 症例) のパラフィン切片を用い、大腸癌組織における MT の発現を免疫組織学的に検討した。大腸癌の深達度と MT 発現の関連についても検討した。

大腸癌細胞における MT 発現を shRNA で用いて抑制し、MT 発現の抑制が癌の増殖や転移に与える影響、ないし MSC の腫瘍増殖促進作に与える影響を検証しようと考えたが、MT 発現のみを特異的に抑制する shRNA 作製は困難であった (MT とは異なる別の遺伝子発現にも影響するような配列しか作製できなかった)。そのため、以下の「接触性」共培養実験を行った。

(3) MSC と接触性に共培養した際に癌細胞で変化する遺伝子の検証 (cDNA マイクロアレイ)

大腸癌細胞を MSC と「接触性」に共培養した際に癌で特異的に上昇する遺伝子を、cDNA マイクロアレイ法を用いて検討した (オリゴ DNA チップ: 東レ 3D-gene® を使用)。

(4) 大腸癌組織における FN 発現とその意義

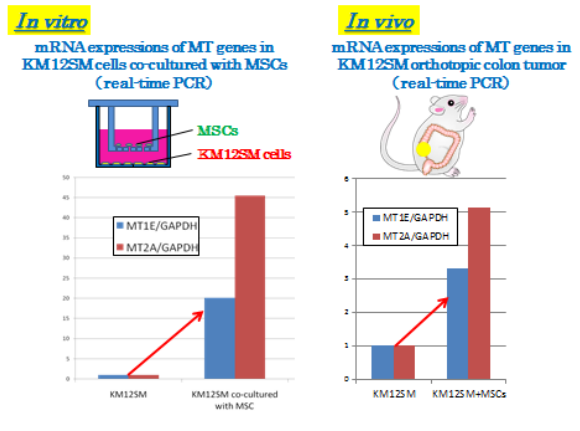
ヒト大腸癌症例 (89 症例) のパラフィン切片を用い、大腸癌組織における FN の発現を免疫組織学的に検討した。大腸癌の深達度と FN 発現の関連についても検討した。

また、KM12SM 細胞のみ (0.5 × 10⁶ 個) をヌードマウスの盲腸へ同所移植し、6 週間後に形成された腫瘍組織を用いて蛍光免疫染色を行った。さらに KM12SM 細胞 (0.5 × 10⁶ 個) と PKH26® で蛍光ラベルした MSC (1 × 10⁶ 個) を混ぜて同所移植し、3 週間後に形成された腫瘍組織を用いて蛍光免疫染色を行った。

4. 研究成果

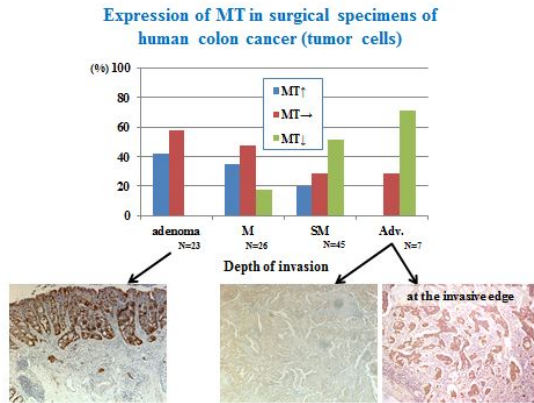
(1) cDNA マイクロアレイ結果の再現性の検証

MT (MT1E、MT2A) の発現はマイクロアレイ法の結果と同様に上昇していた。ヌードマウス同所性移植実験においても、KM12SM 細胞と MSC を混合移植して形成された腫瘍において MT 発現が高かった。



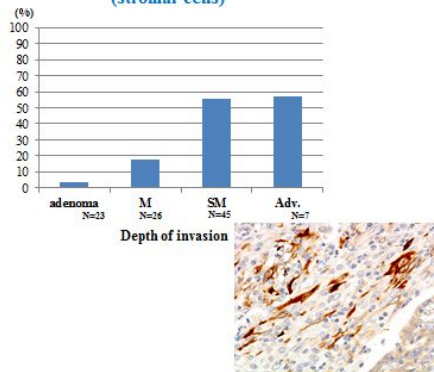
(2) ヒト大腸癌組織における MT 発現とその意義

ヒト大腸癌組織において浸潤度が増すと癌細胞の MT 発現が減少していたが、癌の先進部や間質と接している癌細胞において MT の発現は上昇していた。この現象は、癌間質へ動員された骨髄 MSC によって癌の MT 発現が上昇することを示唆している。



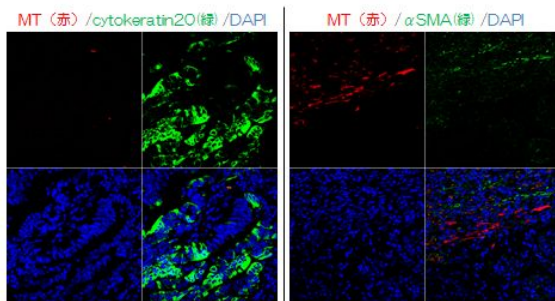
また、ヒト大腸癌組織の癌間質において MT を高発現している紡錘形の細胞がみられた。

Expression of MT in surgical specimens of human colon cancer (stromal cells)



蛍光 2 重免疫染色を行い、この紡錘形細胞の起源を調べたが上皮マーカー (CK20)、癌関連線維芽細胞マーカー (α SMA) は陰性であった。

ヒト大腸癌組織の蛍光 2 重免疫染色

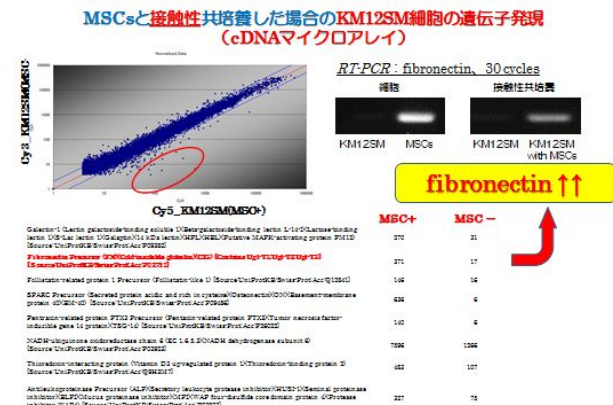


マクローファージマーカー (CD68) も陰性であり MT を高発現する同細胞の由来ははっきりしなかった。

(3) MSC と接触性に共培養した際に癌細胞で変化する遺伝子の検証 (cDNA マイクロアレイ)

接触性共培養では非接触性共培養と比べ、癌の増殖、遊走・浸潤、血管新生、接着などに関連するより多くの遺伝子が変化していた。

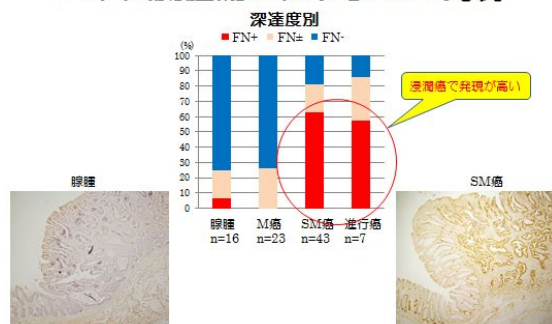
癌細胞においてより大きく変化している遺伝子発現を定量的 RT-PCR (real-time PCR) で確認したところ、フィブロネクチン (FN) の発現が再現性を持って上昇していた。



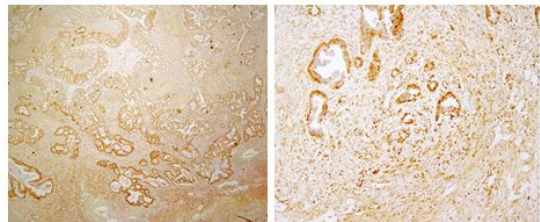
(4) 大腸癌組織における FN 発現とその意義

非浸潤癌と比べて浸潤癌では FN の発現が高く、とくに浸潤先進部で高かった。

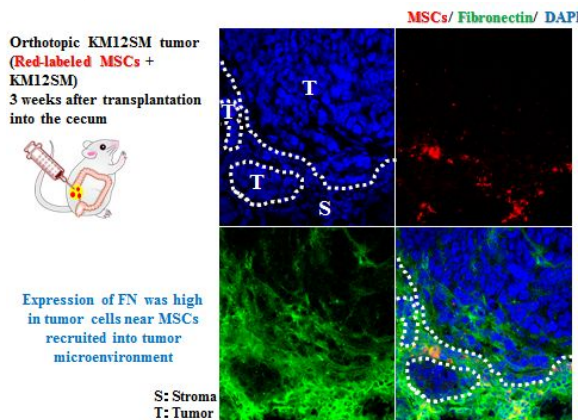
ヒト大腸腫瘍における FN の発現



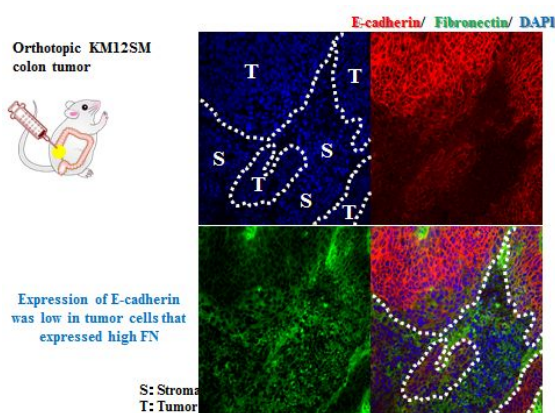
浸潤先進部で FN の発現が高い



MSC (赤) は腫瘍間質に取り込まれ、MSC 近傍の癌細胞において FN の発現が上がっていた。



間質に近接した癌細胞では E カドヘリン (上皮マーカー) の発現が低下し、同部では FN の発現が上昇していた。



考察

今回の研究では MSC の大腸癌増殖・転移促進機構を、In vitro (非接触性・接触性の共培養実験) In vivo (ヌードマウス同所性大腸癌モデル、ヒト大腸癌) の両面から検討した。癌を MSC と共培養することで、癌細胞において誘導される遺伝子をマイクロアレイ法にて網羅的に検討したところ、接触性共培養では非接触性共培養よりも多くの遺伝子が発現することがわかった。

非接触性共培養では癌細胞の MT の発現が上昇していた。MT は抗アポトーシス作用、細胞増殖促進などに関与し、癌の進展に寄与することが知られている。ヒト大腸癌組織の浸潤先進部で MT の発現が高かったことから、癌間質へ動員された骨髄 MSC により癌の MT 発現が誘導されることを示唆しているのかもしれない。MT 発現により癌細胞にどのような変化が起きるのかについて、さらなる検証が必要である。

接触性共培養により発現が増加する遺伝子のなかでも FN は上皮間葉移行 (EMT) のマーカーとしても知られている。今回の結果では、非浸潤癌と比べて浸潤癌で FN の発現

が高く、とくに浸潤先進部において高発現していた。ヌードマウス同所性大腸癌組織において、FN を発現している癌細胞では上皮マーカーの発現が減弱しており MSC により形成される腫瘍間質が癌細胞の上皮間葉移行 (EMT) を誘導し、浸潤・転移能を高めていることが示唆された。

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 1 件)

1. Shinagawa K, Kitadai Y, Tanaka M, Sumida T, Onoyama M, Ohnishi M, Ohara E, Higashi Y, Tanaka S, Yasui W, Chayama K.: 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*. Feb 15;132(4):813-23, 2013 査読有 doi: 10.1002/ijc.27735. Epub 2012 Aug 6.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Shinagawa K, Kitadai Y, Yuge R, Onoyama M, Ohnishi M, Tanaka S, Yasui W, Chayama K.: Interaction between bone marrow-derived mesenchymal stem cells and tumor cells induces metallothionein gene expression in human colon cancer. 104th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, April 9, 2013 (poster presentation), Washington, D.C., USA.
2. Shinagawa K, Kitadai Y, Tanaka Y, Yuge R, Onoyama M, Tanaka S, Yasui W, Chayama K.: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells induces metallothionein gene expression in human colon cancer. 第 72 回日本癌学会学術集会 (ポスター発表) 2013 年 10 月 5 日、横浜市
3. 品川慶、北台靖彦: 骨髄由来間葉系幹細胞の大腸癌増殖・転移促進機構についての研究。第 3 回先端がん転移研究討論会、2014 年 2 月 15 日、熱海市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

- (1)研究代表者
品川 慶 (SHINAGAWA KEI)
広島大学・病院・医科診療医
研究者番号: 50623609
- (2)研究分担者
- (3)連携研究者