

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893094

研究課題名(和文) 卵巣癌幹細胞のstemness維持機構を標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文) New therapeutic strategy for ovarian cancer by targeting the mechanism of maintenance for stemness

研究代表者

三井 寛子 (Mitsui, Hiroko)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70571339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣癌の腹膜播種における腹膜中皮細胞の機能について解析を行った。腹膜中皮細胞は、TGF- β 、卵巣癌細胞株の培養上清、癌性腹水を添加すると、敷石状から紡錘形の線維芽細胞様に形態変化した。この形態変化により上皮間葉転換のマーカーおよび癌関連線維芽細胞のマーカーの発現の上昇を認めた。また線維芽細胞様に形態変化した中皮細胞は、サイトカインの分泌が亢進しており、卵巣癌細胞株の遊走能を亢進させた。腹膜中皮細胞は、腹水により形態および機能の変化がおき、癌に促進的に働く可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the function of peritoneal mesothelial cells (PMCs) in peritoneal dissemination of ovarian cancer. When PMCs were cultured with either carcinomatous ascites, conditioned medium of ovarian cancer cell line or TGF- β , PMCs were dramatically changed from cobblestone-like to fibroblast-like morphology. In the changed PMCs, the expression of epithelial-mesenchymal transition marker and cancer-associated fibroblast marker were increased. In the changed PMCs, the secretion of some cytokine were also elevated. Ovarian cancer cells showed a greater capacity for migration toward changed PMCs than toward normal PMCs. The changed PMCs may have positive effect on ovarian cancer cells.

研究分野：産婦人科学

キーワード：卵巣癌 腹膜播種 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 上皮性卵巣癌は、婦人科悪性腫瘍の中でも最も予後不良な癌種の一つである。その原因は、自覚症状に乏しく早期発見が困難なため進行例の割合が多いことに加え、腹膜播種という特徴的な転移・再発様式を有することにある。卵巣癌の予後改善のためには、膜播種のメカニズムの解明が不可欠である。一方、癌幹細胞の概念が提唱されて久しいが、未だ癌治療の breakthrough とはなり得ていない。近年、癌幹細胞の分離同定に引き続き、幹細胞が幹細胞としての機能を維持するための特殊な微小環境、すなわち niche の重要性が解明されつつある。

(2) 当研究室では、以前より卵巣癌腹膜播種のメカニズムの解明を探求し、以下のような結果を得ている。

卵巣癌患者の腹水ではケモカインの1種である CXCL12(SDF-1) が高濃度であり、腹膜播種を有する症例では、腹膜播種のない症例に比べて有意に高値であった。また中皮細胞は CXCL12 を分泌しており、卵巣癌細胞は CXCL12 のレセプターである CXCR4 を発現していることから、腹膜中皮細胞と卵巣癌細胞は CXCL12/CXCR4 pathway を介した “Seed & Soil” の関係であることが示唆された。

卵黄嚢腫瘍細胞株 (NOY1) において CD133 が癌幹細胞マーカーの一つであり CD133 陽性細胞では陰性細胞に比して CXCR4 の発現が高かった。卵巣癌手術検体において、CD133 を発現している細胞は、原発巣ではごくわずかであるが、腹膜播種巣では多くみられた。NOY1 は腹膜中皮細胞との共培養により CD133 陽性細胞の割合が高く維持された。また CD133 陽性細胞では腹膜中皮細胞との共培養によりコロニー形成能が促進し、CXCR4 阻害剤によりその効果はキャンセルされた。

2. 研究の目的

(1) 卵巣癌腹膜播種形成における腹膜中皮細胞と卵巣癌細胞との相互作用について解析する。まず、腹膜播種における癌微小環境の同定と機能解析を行う。癌の進展には癌細胞のみでなく癌間質が重要であるとされ、がん関連繊維芽細胞 cancer-associated fibroblast (CAF) が着目されている。卵巣癌腹膜播種において、腹膜中皮細胞は、CAF 同様に癌細胞に対し促進的に作用すると考え、腹膜中皮細胞の機能について検討する。

(2) 卵巣癌においては、治療により一旦寛解しても、腹膜播種として再発する場合が多い。すなわち治療により大多数の卵巣癌細胞が死滅するものの、わずかに残った卵巣癌幹細胞が腹膜に潜み、再発すると考えられる。ゆえに、腹膜が卵巣癌幹細胞の niche として機能しているかを検討する。

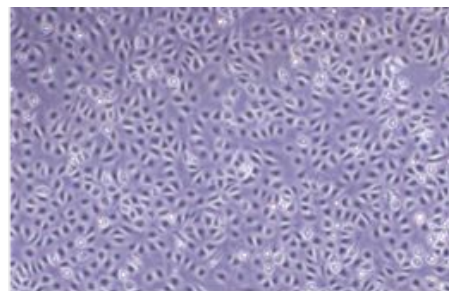
3. 研究の方法

(1) 悪性卵巣腫瘍あるいは境界悪性卵巣腫瘍の手術において摘出した大網を、トリプシン処理し、腹膜中皮細胞を分取した。分取した腹膜中皮細胞に、transforming growth factor- β (TGF- β)、卵巣癌細胞株 SKOV3, ES2 の培養上清、癌性腹水を添加し、形態変化を評価した。また形態変化の前後において上皮間葉転換 (Epithelial to Mesenchymal transition: EMT) や CAF のマーカーの発現の差を検討した。

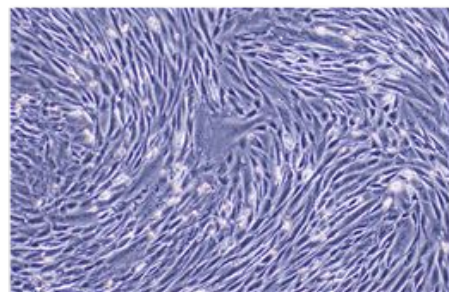
(2) 正常中皮細胞と TGF- β の添加により形態変化した中皮細胞の培養上清中のサイトカイン、ケモカインについて比較した。またマイクロアレイ解析を行い、形態変化前後の遺伝子発現の差異を検討した。正常中皮細胞と TGF- β の添加により形態変化した中皮細胞の培養上清を回収し、卵巣癌細胞株の遊走能および浸潤能に与える影響を比較した。

4. 研究成果

(1) 悪性卵巣腫瘍あるいは境界悪性卵巣腫瘍の症例の大網からトリプシン処理により分取した腹膜中皮細胞は、通常敷石状の形態を呈する。しかし、一部の症例においては紡錘形の線維芽細胞様形態を呈していた。当初は、分取の際の手技的問題かと思われたが、手技は安定しており、進行例においてみられる傾向があることから、生体内で腹膜中皮細胞が卵巣癌からの刺激により、すでに形態変化を起こしていたと考えるのが妥当であると推測された。敷石状の腹膜中皮細胞と紡錘形の線維芽細胞様の腹膜中皮細胞の各一例を図1に各一例を示す。



(A) 敷石状の腹膜中皮細胞



(B) 線維芽細胞様の腹膜中皮細胞

図1 初代培養腹膜中皮細胞

今回の研究においては、安定した結果をえる

ために、悪性卵巣腫瘍または境界悪性卵巣腫瘍の a 期で、かつ敷石上の形態を示した腹膜中皮細胞のみを用いた。一方、本研究には用いていないが、進行例から紡錘形の線維芽細胞様の腹膜中皮細胞が分取される傾向がみられた。進行期、組織型、術前抗癌剤の有無によって、腹膜中皮細胞の形態および機能が異なるかさらなる解析が必要であると考えられた。

(2) 手術にて摘出した大網組織より腹膜中皮細胞を単離し、敷石状の形態であることを確認したうえで、passage5 回以内で実験を行った。腹膜中皮細胞に、TGF- β 、卵巣癌細胞株 SKOV3, ES2 の培養上清、癌性腹水を添加し、培養した。通常、腹膜中皮細胞の培養は血清 10%の培養液を用いおこなっているが、これらの刺激を加える実験においては、培養液中の血清からの影響を減らすために、血清を 1%添加した培養液を用いた。TGF- β は、0ng/ml, 5ng/ml, 10ng/ml の濃度で添加した。卵巣癌細胞株の培養上清は、血清を添加しない培養液にて 24 時間培養したものを回収し、遠心分離にて細胞を除去したのち、培養上清を得て、培養液に 50%加えた。癌性腹水は、癌性腹膜炎の症例において穿刺した腹水より検体をえて、遠心分離により細胞を除いた腹水を用い、培養液に 50%加えた。上記の条件にて 48 時間から 72 時間培養すると、敷石状から紡錘形の線維芽細胞様に著明に形態変化した(図 2)。

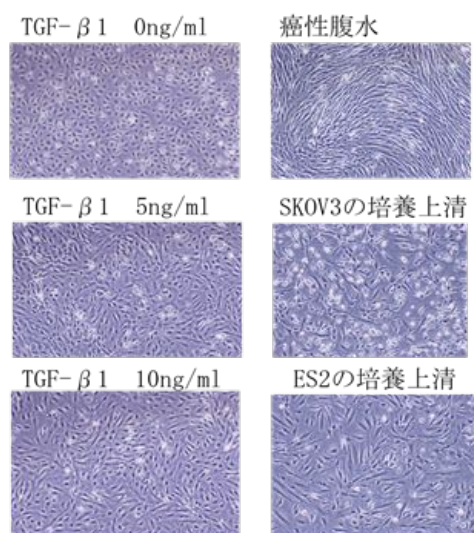


図 2 腹膜中皮細胞への添加による形態変化

TGF- β などの卵巣癌からの液性因子の刺激により形態変化した腹膜中皮細胞の機能解析をすすめることとした。

(3) TGF- β 1 を添加していない腹膜中皮細胞と、添加した中皮細胞での、EMT マーカーの発現をウエスタンブロットにて評価したところ、E カドヘリンの発現は低下、N カドヘ

リンの発現は上昇した。腹膜中皮細胞は上皮系細胞であるもののビメンチンを発現している細胞であるが、ビメンチンの発現は TGF- β 1 により上昇がみられた(図 3)。この結果より、上記の腹膜中皮細胞の形態変化は、EMT であることが判明した。

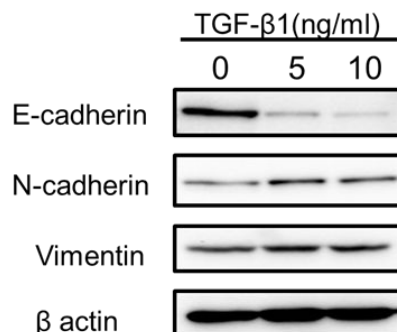


図 3 TGF- β の添加によるEMTマーカーの発現

次いで、CAF のマーカーである SMA の発現について検討した。腹膜中皮細胞を TGF- β 1 を添加し培養すると、濃度依存性に SMA の発現の上昇がみられた。また、腹水穿刺により得られた癌性腹水を培養液に 10, 20, 30% の濃度で添加すると、濃度依存性に SMA の発現が上昇した(図 4)。

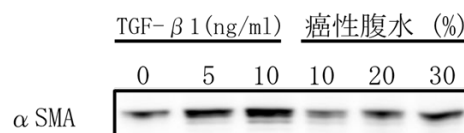


図 4 TGF- β および癌性腹水添加による α SMA の発現の変化

TGF- β などの卵巣癌からの液性因子の刺激により、腹膜中皮細胞は、敷石状から紡錘形の線維芽細胞様に形態変化をおこし、それは EMT であることが判明した。さらに CAF のマーカーも発現の増加がみられることから、形態変化した腹膜中皮細胞が、CAF 同様に癌に促進的に作用する可能性が示唆された。

(4) 腹膜中皮細胞の形態変化をさらに解析するため、マイクロアレイ解析を行った。以下の実験には、安定した結果を得るために、腹膜中皮細胞の刺激は TGF- β 1 にて行うこととし、腹膜中皮細胞の TGF- β 1 添加前、添加後 3 時間、24 時間の mRNA を回収し、マイクロアレイ解析を行った。3 時間後、24 時間のいずれも 2 倍以上の発現の亢進がみられた遺伝子が 140 あり、上述の EMT 関連の発現の亢進がみられた他、IFG-1,2, HB-EGF, PDGF, VEGF-A など癌に促進的に働くと推測される液性因子の発現亢進がみられた。

(5) 正常の中皮細胞と TGF- β の添加により形態変化した中皮細胞において、mRNA レベルの発現を real time PCR にて評価した。TGF- β を添加し、12, 24, 48 時間後に RNA を回収し、real time PCR を行った。TGF-1, VEGF-A, IGF-1,2, MMP-2,9 の有意な上昇が認められ、これらの発現の多くは時間依存性に上昇がみられた(図 5)。

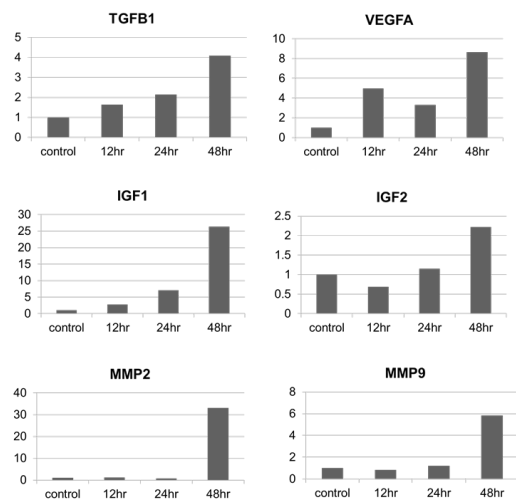


図 5 TGF- β (10ng/ml) を添加後各時間の腹膜中皮細胞での発現の変化

また、濃度依存性にも発現が上昇する傾向がみられた。

さらに、正常の中皮細胞と TGF- β の添加により形態変化した中皮細胞の培養上清を回収し、TGF-1, VEGF-A, MMP-2,9 の分泌について ELISA を用いて評価した。形態変化した腹膜中皮細胞では、正常の中皮細胞と比較して、TGF- β , VEGF-A, MMP-2,9 の分泌が有意に上昇していた。卵巣癌細胞は、TGF-1 のパラクリン作用により、腹膜中皮細胞を自身に有利な液性因子を分泌させるように変化させている可能性が示唆された。また VEGF-A の分泌は著明に亢進しており、卵巣癌細胞株から分泌される値よりも顕著に高値であることから、形態変化をした腹膜中皮細胞は、癌細胞に直接的に影響するのみでなく、血管新生を介して促進的に影響している可能性が示唆された。

(6) 正常中皮細胞と TGF- β 添加により形態変化した中皮細胞より培養上清を回収し、卵巣癌細胞株の遊走能に与える影響を検討した。正常中皮細胞または TGF- β 添加により形態変化した中皮細胞の培養上清を transwell chamber の下層におき、卵巣癌細胞株を上層におき遊走能を比較した。卵巣癌細胞株は SKOV3 と ES2 を用いた。以下、簡単のため、刺激を行っていない腹膜中皮細胞を中皮細胞と表記し、TGF- β の添加により形態変化した腹膜中皮細胞を、活性化中皮細胞と表記する。SKOV3 細胞は、中皮細胞の培養上清に比して活性化中皮細胞の培養上清によ

り遊走能が亢進したものの、有意な差はみられなかった。一方、ES2 細胞においては、中皮細胞の培養上清に比して活性化中皮細胞の培養上清により遊走能が有意に亢進した。(図 6)

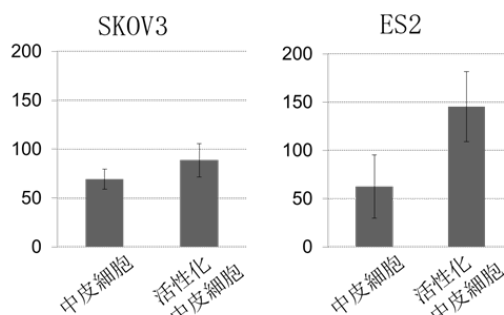


図 6 中皮細胞の培養上清による卵巣癌細胞株の遊走能の変化

今回みられた SKOV3 と ES2 への遊走能にあたる影響の差のメカニズムについても解析が必要であると考えられた。卵巣癌は、TGF- β により、腹膜中皮細胞を活性化させることにより、自身に有利な微小環境を形成している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 0 件)

[学会発表](計 3 件)

三井 寛子、INTERACTION BETWEEN PERITONEAL MESOTHELIAL CELLS AND OVARIAN CANCER CELLS IN PERITONEAL DISSEMINATION, 15th biennial meeting of the International Gynecologic Cancer Society, 2014 年 11 月 8 日~11 日、メルボルン(オーストラリア)

三井寛子、卵巣癌腹膜播種における腹膜中皮細胞の機能、第 56 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会、2014 年 7 月 17 日~19 日、栃木県総合文化センター(栃木県宇都宮市)

三井寛子、卵巣癌腹膜播種における腹膜中皮細胞と卵巣癌細胞の相互作用、第 66 回日本産科婦人科学会、2014 年 4 月 18 日、東京国際フォーラム(東京都千代田区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三井 寛子 (MITSUI, Hiroko)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 70571339

(2) 研究分担者

なし