

# 間質系細胞による消化器癌細胞の stemness 制御機構の解析

慶応義塾大学医学部消化器内科 権嶋 彩乃

## 1. はじめに

腫瘍を形成する細胞の中には、ごく少数の Cancer Stem Cells (CSCs) と、CSCs から分化・派生した癌細胞（非癌細胞）とが存在し、正常組織の発生段階で見られるような幹細胞を頂点とする分化の階層が残されていることを示唆する多数の報告がある (Reya et al. Nature, 2001)。近年の見解では、CSCs は抗癌剤や放射線などあらゆる治療に抵抗性の性格を有しており、局所浸潤・遠隔転移や再発など癌の悪性的特徴の中心的役割を担っていると考えられており、治療標的とするべき細胞であるとされている。

癌組織では間質量や線維芽細胞増殖性の高さがその悪性度や患者の予後と強く相関していることが示唆されているが、その癌特異的間質組織から供給される誘導因子が上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) を含む浸潤・転移・増殖など癌の進展を促進する根源となっていると考えられている。癌間質を構成する細胞としては、血管内皮細胞や周皮細胞、線維芽細胞／筋線維芽細胞をはじめとする組織特有の癌線維芽細胞 (Cancer associate fibroblasts: CAFs) など多くの細胞が存在するが、これらが特殊な微小環境を構成し、そこから供給される誘導因子が EMT を含む浸潤・転移・増殖など癌の進展を促進する根源となっている (Calabrese et al. Cancer Cell, 2007)。

間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells: MSCs) は骨髄をはじめ、脂肪組織や諸臓器に存在し、骨・軟骨・脂肪など間葉系細胞に分化しうる細胞である。組織の維持や修復などに際し補助的な役割を担うなど多様な特徴を持つが、癌細胞に対しては癌組織に動員され多くの癌間質構成細胞へと変化をし、腫瘍進展に大きく関与している可能性が高いことが報告されてい

る (Karnoub et al. Nature, 2007, Mishra et al. Can Res, 2009)。

これらの背景をふまえ、今回われわれは癌間質と癌幹細胞との相互作用における腫瘍進展機構解明を目的とし、本研究を進めた。

## 2. 方法

MSCs と癌細胞とを間接あるいは直接的に共培養させることにより生じる、両者の相互作用について解析を行った。

### ① MSCs を癌間質に変化させる因子の探索を行った。

これまでの報告で、癌細胞培養上清 (conditioned medium) の添加により MSCs が癌間質様細胞へと変化することが確認をされている。その他 MSCs の変化に直接影響を与えると思われる因子を添加し、western blot を行った。さらに、それらの MSCs が腫瘍形成能に与える影響について免疫不全マウスへの腫瘍移植モデルを作成し、観察を行った。

### ② Transwell を用い MSCs と癌細胞とを間接的に共培養し、主に MSCs 由来の液性因子が与える癌幹細胞の変化について比較検討を行った。

### ③ 癌細胞側を GFP でラベルし、MSCs と直接接触させた共培養を行い、その後に分離を可能にした。sphere 形成能の比較、CD133 の発現変化について解析を行い、共培養による癌幹細胞としての特徴への影響について検討を行った。

## 3. 結果

### ① 骨髄由来 MSCs の癌間質様細胞への変化

癌培養上清 (conditioned medium: CM) による間葉系細胞の癌間質様細胞への変化に関してはこれまでい

くつもの報告がある。骨髄由来 MSCs に対し直接この変化を起こすと思われるいくつかの因子によって処理した後、癌間質に発現の高いとされる alpha smooth muscle actin ( $\alpha$  SMA)、podoplanin (PDPN) に関し、western blot 法にて発現比較を行った。その結果、non-treat の ctrl 群に比較し、TGF- $\beta$ 、CM 群において両蛋白の著しい上昇が認められた。さらに、これらの処理を行った細胞は、ctrl 群の線維芽細胞様の形態からやや幅広い胞体を持つ細胞へ形態変化を示していた。

### ② 癌間質様細胞の腫瘍形成能への影響

TGF- $\beta$  処理後の MSCs の腫瘍形成能への影響について免疫不全マウス (NOD/SCID mouse) による腫瘍皮下移植モデルを作成し、観察を行った。Ctrl 群または TGF- $\beta$  処理群の MSCs  $1 \times 10^5$  個 + 膵癌細胞株 PANC-1  $1 \times 10^5$  個を混合しマウス背部皮下に移植し、腫瘍形成能の比較を行った。TGF- $\beta$  処理群の MSCs とともに移植した群は ctrl の未処理 MSCs とともに移植した群に比較し、移植後 2 週目で腫瘍形成をはじめ、8 週間の観察期間のうちに約 4 倍以上の腫瘍体積を示した。これらの結果より、TGF- $\beta$  処理後の MSCs は癌間質細胞としての性格を有しており、腫瘍の進展に寄与している可能性が高いことが推測された。

### ③ MSCs 由来液性因子が癌幹細胞に与える影響

われわれは、膵癌において cancer stem cell enrich な細胞集団を分離する方法として Side Population (SP) 法が有効であることを報告している。ヒト膵癌細胞株 PANC-1 細胞を用い、MSCs が SP 細胞に対する影響について検討を行った。

まず、SP/MP 細胞を MSCs とともに transwell にて共培養させ、癌細胞側の受ける影響について検討を行った。その結果、SP 細胞において共培養後数日で spindle な形態を持つ細胞が観察され、細胞間結合も疎となった。さらに EMT 関連の遺伝子変化について real time PCR にて発現解析を行ったところ、TGF- $\beta$  処理をした MSCs と共培養した群における E-cadherin mRNA の低下および、E-cadherin の転写抑制因子である slug の発現上昇を認めた。いずれの変化も SP 細胞において著明に観察され、MP 細胞における変化は軽微であった。これらのことより、MSCs 由来の液性

因子が膵癌細胞株 PANC1 の SP 細胞に対して EMT を誘導していることが示唆された。

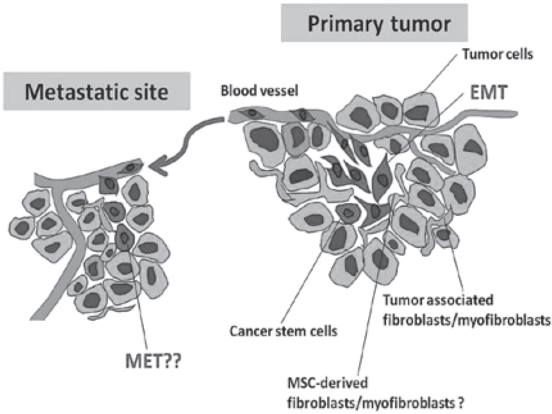
### ④ MSCs と癌細胞の直接共培養系における癌細胞の変化

次に、MSCs と癌細胞の相互作用の及ぼす癌幹細胞としての性質の変化について直接共培養系を用い検討した。GFP を安定的に発現させた PANC-1 SP/MP 細胞を TGF- $\beta$  前処理した MSCs と共培養後、FACS により再分離し、癌幹細胞マーカーとしての CD133 分子の発現定量を行った。共培養前は SP/MP いずれにおいてもほとんど CD133 の発現が認められなかったが、MSCs と共培養することにより MP 細胞に比較し、SP 細胞で 8 倍以上の CD133 の発現を確認することができた。さらに、幹細胞の自己複製能を反映する sphere 形成能、腫瘍形成能も TGF- $\beta$  MSCs と共培養した SP 細胞において促進されており、MSCs 由来の癌間質細胞が癌幹細胞に促進的に作用している可能性が示唆された。

## 4. 考察

癌の転移には多くの過程が存在するが、中でも癌細胞が上皮性から間葉系へ転換を起こす現象である EMT は極めて重要な現象である。CSCs は EMT を起こす能力が高く、このことが腫瘍進展の源になっている可能性が高いと考えられている。in vitro 実験系において EMT は多くのサイトカインやシグナルにより引き起こされることが明らかになっているが、それらの因子は周囲の間質組織などから供給されると考えられているものの、詳細は明らかではない。今回われわれは、癌幹細胞と間質細胞との相互関係に着目し解析を進め、癌細胞との共培養において MSCs は癌間質細胞様の特徴を持つ細胞へと変化し、腫瘍形成能や EMT を誘導していることが明らかとなった。さらに、癌間質様へと変化した MSCs は CD133 の発現や、sphere 形成能をはじめとする癌幹細胞としての特徴を促進させる可能性があり、MSCs が腫瘍進展における癌幹細胞と間質細胞の相互作用において重要な役割を果たしていることが示唆された。われわれはこれまでの研究において、PANC-1 SP 細胞が TGF- $\beta$  シグナルによる EMT を受けやすく、さらにはその逆の現象である間葉上皮転換 (Mesenchymal -Epithelial

平成22年度奨励研究報告



Transition:MET) をも起こしやすいという結果を報告している。これらのことより、in vivo の環境下において CSCs は MSCs 由来の間質細胞により EMT、局所浸潤・転移を誘導されるものと考えられた。転移した CSCs は転移先での生着・再増殖の過程で MET を起こすと考えられるが、この詳細なメカニズムは不明な点が多い (左図)。

癌幹細胞を治療標的とする場合に克服すべき特徴として、化学療法や放射線療法に対する治療抵抗性や、再発に関わるさまざまな現象が挙げられる。これらの現象に関しての間質細胞と癌細胞間との相互作用を解析することが重要な課題である。

処方せん医薬品\*

高カロリー輸液用 糖・電解質・アミノ酸・総合ビタミン・微量元素液

# エルネオパ® 1号・2号 輸液

ELNEOPA® No.1 Injection  
ELNEOPA® No.2 Injection

薬価基準収載

\*：注意—医師等の処方せんにより使用すること



処方せん医薬品\*

ビタミンB1・糖・電解質・アミノ酸液

# ビーフリッド® 輸液

BFLUID® Injection

薬価基準収載

\*：注意—医師等の処方せんにより使用すること



◇効能・効果、用法・用量、警告・禁忌を含む使用上の注意等は、製品添付文書をご参照ください。



販売提携 大塚製薬株式会社 東京都千代田区神田司町2-9  
製造販売元 株式会社大塚製薬工場 徳島県鳴門市撫養町立岩字芥原115

資料請求先  
株式会社大塚製薬工場 学術部  
〒101-0048 東京都千代田区神田司町2-9

〈10.07作成〉