

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
分担研究報告書

正常中皮細胞株の樹立と新規分子標的薬の効果の検討

研究分担者 中西速夫 愛知県がんセンター研究所 腫瘍病理学部 室長

研究要旨：悪性中皮腫は悪性度が高く、しかも現在、効果的な抗がん剤や有効な分子標的薬が存在しないため、予後は極めて不良である。中皮腫には種々の組織型（上皮型，2相型、肉腫型）が存在し、肉腫型ほど悪性度が高い。しかし、この組織多様性の背景に存在すると考えられる中皮細胞の分化や上皮間葉移行（EMT）などの制御メカニズムは殆ど明らかになっていない。この点を明らかにするためには不死化した正常中皮細胞株が有用であるが、既存の中皮細胞株は繊維芽細胞様の形態を示し、また中皮細胞マーカー発現も比較的乏しく、正常中皮細胞のモデルとしては満足すべきものではない。本研究では初代中皮細胞に HPV-E6, E7 および hTERT 遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて導入し、敷石状に増殖する上皮性の株から繊維芽細胞様の形態を示す株まで上皮型，2相型、肉腫型を mimic する種々の不死化中皮細胞株（パネル）を作成した。これら独自に樹立した細胞株を用いて分化や Hippo シグナル経路を解析し、以下の諸点を明らかにした。1）Calretinin, Podoplanin, Mesothelin などの中皮細胞マーカーを中等度から高度に発現し、かつ Merlin など Hippo 経路の発現亢進、その下流の YAP の抑制、細胞質局在など正常中皮細胞の形質を維持していること、2）少数の染色体異常は認めるものの、ヌードマウスでは造腫瘍性を認めないこと、3）不死化細胞の YAP 強制発現株は胸腔内移植により上皮型，2相型、肉腫型を mimic した腫瘍を形成すること、等から本株が正常中皮細胞および悪性中皮腫のすぐれた実験モデルとなることを明らかにした。さらに、Lentivirus ベクターを用いて Luciferase 遺伝子を導入した中皮腫細胞株を複数株樹立した。この細胞をヌードマウスの胸腔内に接種し、形成された胸膜播種を生きのまま体外から経時的に発光イメージングでき、前臨床試験に有用な悪性中皮腫の胸腔播種モデルを確立した。

- |   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| A. 研究目的   | 2. 前臨床試験に有用な悪性中皮腫の胸腔播種発光イメージングモデルの作成 |
| 1. 種々の分化形質を示す不死化正常中皮細胞株の樹立とその増殖、シグナル経路の in vitro 解析および YAP 強制発現株を用いた in vivo 解析 | B. 研究方法                              |
|   | 1. 不死化正常中皮細胞株の樹立とその特性の解析             |

胃がん患者の切除大網組織および腹水より中皮細胞の初代培養を行い、敷石状に増殖する上皮様コロニーを分離してこれに HPV-E6, E7 および hTERT 遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて導入し、不死化中皮細胞株を作成した。さらにリングクロニング法により敷石状に増殖する上皮型から繊維芽細胞様に増殖する肉腫型まで、細胞形態の異なる亜株を複数分離した。次にこれらの細胞株を用いて染色体の核型解析やヌードマウスにおける造腫瘍性を検討した。また蛍光染色, 定量 RT-PCR 法や Western blot 法等をもちいて Rb 経路や Hippo シグナル伝達経路の解析を行った。一方, *in vivo* における腫瘍組織形成能を見るためレトロウイルスベクター MIG-YAP を用いて YAP を強制発現させた株も作成した(瀬戸との共同研究、瀬戸の項目参照)。

## 2. 発光イメージングの可能な悪性中皮腫の胸腔播種モデルの作成

悪性中皮腫細胞株 H290 細胞等にレトロウイルスベクター CSII-luc を用いてルシフェラーゼ遺伝子を導入し、薬剤選択により安定細胞株をえた。この H290-Luc 細胞を胸腔内に接種し、経時的にルシフェリンを腹腔内に投与し、胸腔内の腫瘍増殖や胸腔内進展を IVIS Lumina II を用いて *in vivo* イメージングを行った。また一定期間後、マウスを屠殺解剖し、胸腔を開いた状態で胸腔内の播種性進展を定量的に検討した。

## C. 研究結果

### 1. 不死化正常中皮細胞株の樹立とその特性の解析

リングクロニング法により細胞形態が異なり、悪性中皮腫の上皮型、2相型、肉腫型をミミックする3種類の不死化中皮細胞株を作成した(上皮型、: HOMC-2 A-7(B-1),

2相型 : HOMC-2 A-7(D-4), 肉腫型 : HOMC-3 A-4) (図1)。

HPV-E6, E7, hTERT および P16 等の発現を RT-PCR 法で調べ、HOMC-2 A-7(B-1)(以下 B-1), HOMC-2 A-7(D-4) (以下 D-4), HOMC-3 A-4 細胞(以下 A-4)のみで高発現していることを確認した, また不死化細胞は中皮腫細胞と異なり初代培養細胞と同様に P16 を高発現しており、Rb のリン酸化は阻止されるが, E7 が直接 Rb に結合することにより、Rb 経路を不活化し S 期移行を促進していることを Western blot により確認した。染色体分析では数は Mode が 45, Karyotype では 22 番、

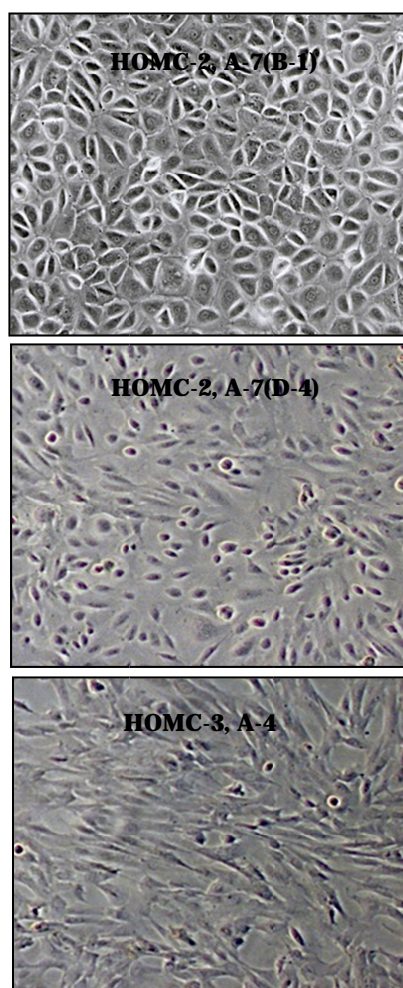


図1 種々の形態を示す不死化中皮細胞株

その他の染色体に少数の異常を認めたと、ヌードマウスにおける造腫瘍性は皮下移植、胸腔内移植ともに認めなかった。ちなみに陽性対照とした悪性中皮細胞株では皮下移植こそ造腫瘍性は低率であったが、胸腔内移植では高率に腫瘍生着が認められた。次に各種中皮細胞マーカー遺伝子発現を RT-PCR で解析したところ、不死化 B-1 細胞株は上皮マーカー (E cadherin) を初代培養細胞と同様に高発現していたが、D-4 細胞の E cadherin 発現は低く、A-4 細胞では発現を殆ど認めなかった。一方、Merlin (NF2) は不死化細胞では悪性中皮腫細胞と異なり初代培養細胞と同様に高発現しており、そのタンパク局在も悪性中皮腫細胞が核であるのに対し、不死化中皮細胞では細胞質により多く局在していた (図 2)。

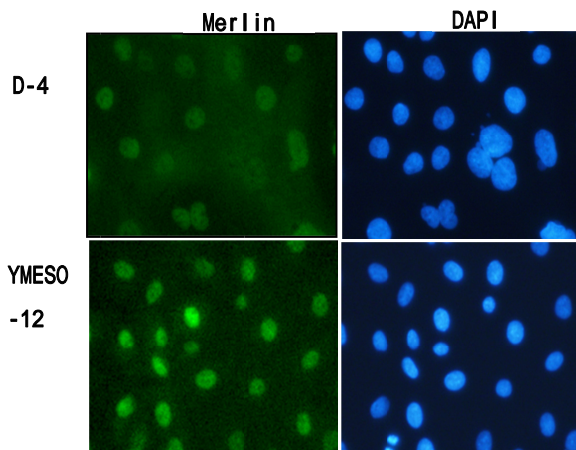


図 2 不死化中皮細胞と悪性中皮腫細胞における Merlin の局在

さらに 3 種類の不死化細胞株に Hippo 経路の下流で増殖や抗アポトーシスを促進する TEAD の Transcriptional coactivator である YAP をレトロウイルスベクター-MIG-YAP を用いて強制発現させたところ、3 種類ともヌードマウスに対する造腫瘍性を獲得し、しかも興味深いことに in vitro で上皮形質を示す B-1 細胞の YAP 発現株は胸腔に同所移植

するとやはり上皮型の形態をとり胸膜に沿って乳頭状に進展すること、また in vitro で 2 相型を示す D-4 細胞の YAP 発現株も同様に胸膜播種を起こすが、組織型は 2 相型に近いこと、さらに in vitro で肉腫型を示す A-4 細胞は胸腔内でも結節状の肉腫様腫瘍を形成し、筋肉や骨への高い浸潤性を有することが判明した (図 3)。

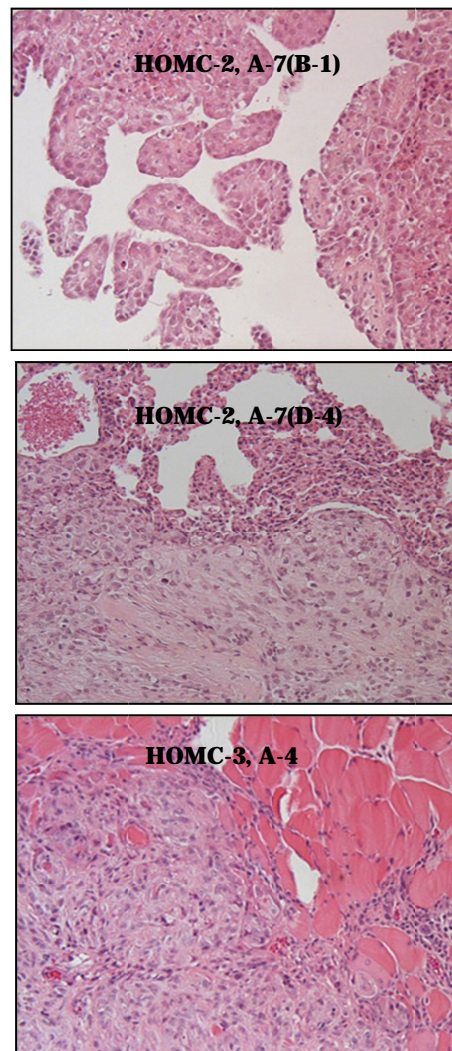


図 3 不死化中皮細胞の YAP 強制発現株の胸腔内移植腫瘍の組織像

## 2. 発光イメージングの可能な悪性中皮腫の胸腔播種モデルの作成

H290-Luc 細胞を胸腔内に接種し、経時的

にルシフェリンを腹腔内に投与し、胸腔内の腫瘍増殖や胸腔内進展を IVIS Lumina II を用いて *in vivo* イメージングを行った。胸腔は肋骨など硬組織に被われているため、蛍光イメージングでは体外からのイメージングは不可能であるのに対し、発光イメージングでは胸腔接種後 1 日目から数週間まで体外からの経時的な胸腔内腫瘍の非侵襲的モニタリングが可能であった(図4)。一定期間後、マウスを屠殺解剖し、体外イメージングと胸腔を開いた状態での胸腔内の播種性進展を比較検討したところ、体外イメージングの定量性は必ずしも高くなかったが、胸腔内進展や治療効果のモニタリングは十分可能であることが判明した。

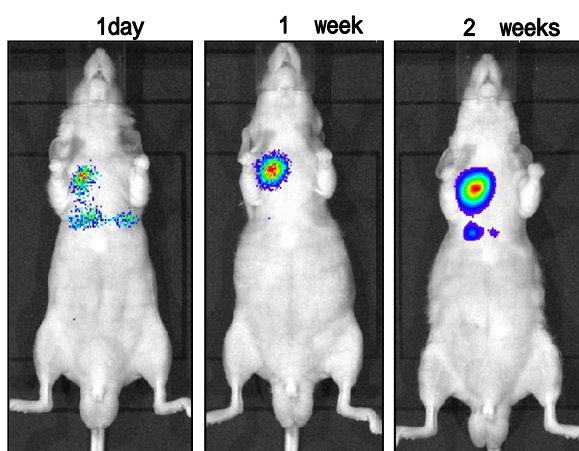


図4 悪性中皮腫細胞 H290,CSII-luc による胸腔播種性進展の *in vivo* 発光イメージング

#### D. 考察

今回樹立した3種類の不死化中皮細胞は *in vitro*, *in vivo* においてそれぞれ以下のユニークな特徴を示した。1) B-1 株は *in vitro* において敷石状の上皮様増殖パターンを示し E-cadherin を高発現するが、Vimentin, Snail, CTGF の発現が低いこと、また YAP 強制発現株をヌードマウス胸腔内

に移植すると乳頭状パターンで増殖する上皮型腫瘍を形成することから最も上皮性性格の強い細胞株であり、しかも Podoplanin, Calretinin, Mesothelin, WT-1 などの中皮細胞マーカーも高発現すること。2) D-4 株は *in vitro* で B-1 株ほどきれいな敷石状の上皮様増殖パターンを示さず、E-cadherin の発現も B-1 株に比べ低く、逆に Vimentin, Snail, CTGF の発現は高いこと、YAP 強制発現株の胸腔内移植では一部で肉腫様の組織型を認めることから、2相型をミミックしていること、しかし Podoplanin, Calretinin, Mesothelin, WT-1 などの中皮細胞マーカーの発現は B-1 株と比べて遜色ないこと。一方、3) A-4 株は *in vitro* で繊維芽細胞様形態を示し、E-cadherin の発現は殆どなく、逆に Vimentin, Snail, CTGF の発現が高く、また YAP 強制発現株の胸腔内移植では肉腫様腫瘍を形成することから、上皮性性格を欠損した肉腫様の細胞株であり、中皮細胞マーカーの発現は WT-1 を除いて殆ど認めなかった。ただし、この A-4 株については繊維芽細胞を不死化した可能性も完全には否定できず、今後さらなる検討が必要と考えられた。

以上のことより、今回樹立した不死化中皮細胞株 B-1, A-4 およびそれらの YAP 発現株は悪性中皮腫の上皮型、肉腫型を、また D-4 株は中間(2相)型をミミックしており、肉腫型に近い従来の SV40LT 導入による不死化中皮細胞(MeT-5A)に比べて、中皮細胞の増殖、分化、シグナル伝達等の解析により有用なモデルと考えられた。また本モデルは悪性中皮腫における上皮型、肉腫型、中間型に見られる中皮腫の組織学的多様性や EMT のメカニズム解明に最適の実験モデルと考えられる。今後、これらの細胞株にルシフェラーゼ遺伝子を導入した細胞株を作成すれば発光による高感度な *in vivo* イメージングも可能となり、中皮腫の各組織型に対する新しい治療法

の開発に極めて有用と考えられる。

## E. 結論

中皮腫には3種類の組織型(上皮型, 2相型、肉腫型)が存在するが、この組織多様性を備えながら、しかも単一患者に由来し、従って遺伝的背景の均一な正常不死化細胞株およびそのYAP発現株を作成し、中皮細胞の分化や上皮間葉移行(EMT)などの制御メカニズムの解析に最適な実験モデルを世界に先駆け開発した。またルシフェラーゼ発光による高感度な胸腔播種のin vivoイメージングが可能な、前臨床試験に有用な悪性中皮腫の胸腔播種モデルを確立した。

今後、これらのモデルを組み合わせることで、中皮腫の組織多様性やEMTのメカニズム解明、また中皮腫の各組織型に対する新しい治療法の開発に繋げるべくモデルをさらに発展させてゆく予定である。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Ohta M, Abe A, Ohno F, Hasegawa Y, Tanaka H, Maseki S, Kondo E, Kurita K, Nakanishi H. Positive and negative regulation of podoplanin expression by TGF- and histone deacetylase inhibitors in oral and pharyngeal squamous cell carcinoma cell lines. *Oral Oncol*, 49:20-6, 2013.
2. Murakami H, Nakanishi H, Tanaka H, Ito S, Misawa K, Ito Y, Ikehara Y, Kondo E, and Kodera Y. Establishment and characterization of novel gastric signet-ring cell and non signet-ring cell, poorly-differentiated adenocarcinoma cell lines with low and high malignant potential. *Gastric Cancer*, 16:74-83, 2013.
3. Fujii M, Nakanishi H, Toyoda T, Tanaka I, Kondo Y, Osada H, Sekido Y. Convergent signaling in the regulation of connective tissue growth factor in malignant mesothelioma: TGF signaling and defects in the Hippo signaling cascade. *Cell Cycle*, 11:3373-9, 2012.
4. Fujii M, Toyoda T, Nakanishi H, Yatabe Y, Sato A, Matsudaira Y, Ito H, Murakami H, Kondo Y, Kondo E, Hida T, Tsujimura T, Osada H, Sekido Y.; TGF- synergizes with defects in the Hippo pathway to stimulate human malignant mesothelioma growth. *J Exp Med*, 209; 479-94, 2012.
5. Akita K, Yoshida S, Ikehara Y, Shirakawa S, Toda M, Inoue M, Kitawaki J, Nakanishi H, Narimatsu H, and Nakada H.; Different levels of Sialyl-Tn Antigen expressed on MUC16 in Patients With Endometriosis and Ovarian Cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 22:531-8, 2012.
6. Maseki S, Ijichi K, Tanaka H, Fujii M, Hasegawa Y, Ogawa T, Murakami S, Kondo E and Nakanishi H.; Acquisition of EMT phenotype in the gefitinib-resistant cells of a head and neck squamous cell carcinoma cell line through Akt/GSK-3 /snail signaling pathway. *Br J cancer*, 106;1196-204, 2012.
7. Ozaki H, Matsuzaki H, Ando H, Kaji H, Nakanishi H, Ikehara Y, Narimatsu H.; Enhancement of metastatic ability by ectopic expression of ST6GalNAcI on a gastric cancer cell line in a mouse model. *Clin Exp Metastasis*, 29:229-38,

2012.

8. Nakanishi H, Ito S, Matsui M, Ito Y, Misawa K, Kodera Y.: Noninvasive and real-time fluorescence imaging of peritoneal metastasis in nude mice. Methods Mol Biol, 872 : 85-95, 2012.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 発明名称：微粒子分離用マイクロ流路チップ、該チップを用いた微粒子分離用システム及び微粒子分離方法 特許出願番号：特願 2012-227717 発明者：新井 史人、益田 泰輔、新美 京（名古屋大学）：中西速夫、伊藤 誠二（愛知県がんセンター） 出願日；平成 24 年 10 月 15 日
2. 発明名称：腹腔鏡手術時に胃の外側から腫瘍の位置を同定する方法特許出願番号：特願 2012-28667 出願人：愛知県、学校法人梅村学園、国立大学法人名古屋大学 発明者：三澤 一成、中西速夫（愛知県がんセンター）：長谷川 純一、木村翔太（中京大学）：淵 真悟、森 健策（名古屋大学） 出願日：平成 24 年 2 月 13 日

