

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、有効な抗がん剤や分子標的薬が存在しないため、患者の予後は極めて不良である。中皮腫には3種類の主要な組織型（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(Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT)などに関する制御メカニズムはほとんど明らかになっていない。昨年度、この点を明らかにするために初代培養中皮細胞に HPV-E6, E7 および hTERT 遺伝子を導入し、敷石状に増殖する上皮性の細胞株から繊維芽細胞様の形態を示す細胞株まで、すなわち、上皮型、2相型、肉腫型を mimic する不死化正常中皮細胞株パネルを独自に作成した。本年度はこれらの不死化中皮細胞株を用いて種々のサイトカイン刺激により中皮細胞の上皮間葉移行(EMT)について検討した。その結果、中間型中皮細胞株 D-4 では TGF- β および IL1- β などのサイトカインの単独あるいは併用刺激により EMT を誘導可能であることが明らかとなった。D-4 細胞株の結合組織成長因子(connective tissue growth factor, CTGF)発現を siRNA でノックダウンしたところ、低密度培養下においても細胞間接着性が増強し、敷石状の上皮細胞様配列の促進が認められた。さらに、肉腫型中皮腫細胞株 A-4 では過剰発現している CTGF のノックダウンにより強い細胞増殖抑制と形態変化が認められた。これらの結果から正常の不死化中皮細胞では TGF- β 、IL1- β などの複数の炎症性サイトカインの協調作用により EMT が誘導されること、またこの EMT 誘導には TGF- β /CTGF 経路が関与し、この経路をブロックすることにより正常中皮の EMT の抑制のみならず、中皮腫細胞の肉腫型への悪性進展を抑制できる可能性が明らかとなった。

A. 研究目的

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
2. 不死化正常中皮細胞株を用いた中皮細胞の EMT 誘導とその分子機構の解析

B. 研究方法

1. 不死化正常中皮細胞株を用いた中皮細胞の EMT 誘導とその分子機構の解析
昨年度、樹立した不死化正常中皮細胞 H0MC-2 A-7(B-1)株(上皮型、以下 B-1)、H0MC-2 A-7(D-4)株(中間型、以下 D-4)、および H0MC-3 (A-4) (肉腫型、以下 A-4)を用いた。1-10 ng/ml のヒト TGF- β 、IL-1、

TNF- およびそれらの併用により刺激後 24 時間後の EMT 誘導の有無を形態変化の観察および qRT-PCR 法により検討した。また siRNA を用いて CTGF 発現をノックダウンし、EMT が抑制されるか否かを同様に検討した。また同時に複数の上皮型および肉腫型の悪性中皮腫細胞株を用いて CTGF 発現のノックダウン実験を行った。

C. 研究結果

1. 不死化正常中皮細胞株を用いた中皮細胞の EMT 誘導とその分子機構の解析

上皮様形態を示す不死化正常中皮細胞株 B-1、および比較的、上皮様形態を保持する中間型細胞株 D-4 を用いて正常中皮細胞における上皮間葉移行(EMT)誘導の可能性とそのメカニズムについて検討した。B-1, D-4 細胞を TGF- β , IL1- β , TNF などのサイトカインで 24 時間 刺激したところ、TGF- β は単独投与でも軽度ながら形態変化が認められ、また E-cadherin 発現の低下および Snail の発現上昇傾向が認められた。さらに TGF- β と IL-1 β あるいは TGF- β と TNF を併用投与したところ、特に前者の組み合わせで上皮様形態から紡錘型形態へと明らかな EMT 様変化が観察された。この変化は B-1 株よりも D-4 株でより顕著であった(図 1)。これに伴い EMT マーカー発現では、E-cadherin の顕著な発現低下および Snail および CTGF の有意な発現上昇が認められた(図 2)。一方、siRNA で中間型 D-4 細胞の CTGF 発現をノックダウンしたところ、細胞増殖の抑制はごく軽度であったが、低密度培養下においても細胞間接着性が増強した(図 3)。以上のことから上皮様の不死化正常中皮細胞は TGF- β , IL1- β , TNF などの複数のサイトカインの協調作用により EMT が誘導されることが示唆された。

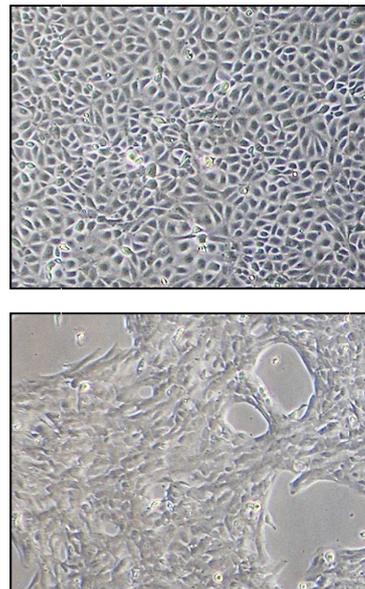


図 1 不死化中皮細胞 D-4 株における TGF-beta + IL-1beta による EMT 誘導。上皮～中間様形態(上段)から繊維芽細胞様形態(下段)に変化。

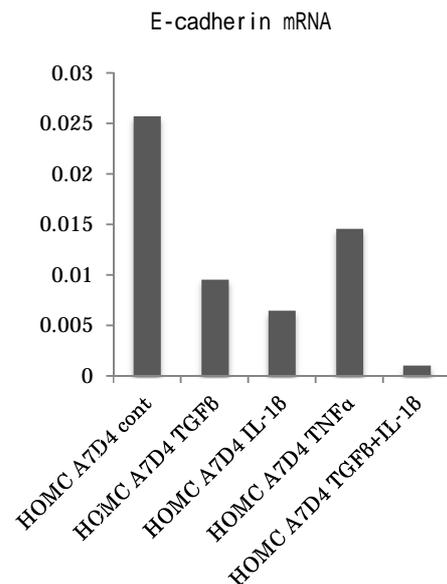


図 2 不死化中皮細胞株 D-4 株における TGF-beta + IL-1beta による EMT 誘導。E-cadherin の発現低下が誘導。

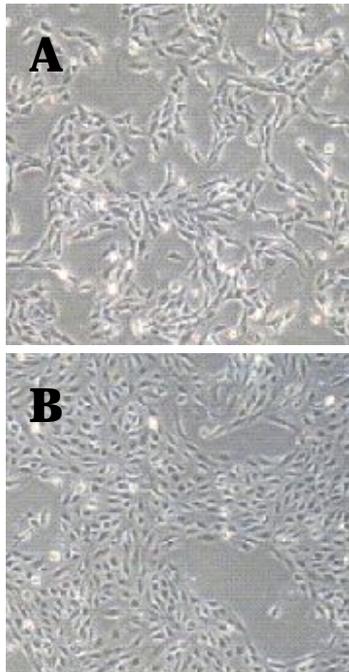


図3 不死化中皮細胞株 D-4 株の CTGF ノックダウンによる細胞間結合性の増強。A コントロール。B siRNA ノックダウン。

次に、複数の悪性中皮腫細胞株を形態から上皮型と肉腫型に分けて E-cadherin, Snail や CTGF 発現を調べたところ、細胞株によるばらつきはあるものの上皮型に比べ肉腫型細胞株において明らかな E-cadherin の発現低下と共に、Snail および CTGF の発現上昇が認められた。さらにこれら細胞株の CTGF 発現を siRNA でノックダウンしたところ、発現の高い肉腫型細胞株において形態変化および細胞増殖能の強い抑制が認められた(図4)。

D. 考察

今回、中皮腫の上皮型、2相型および肉腫型という組織学的多様性の鍵を握ると考えられる正常中皮細胞の EMT に焦点を定めて解析を行った。その結果、中間型 D-4 細胞においてはサイトカイン TGF- β および IL1- β の刺激により明らかな上皮間葉移行(EMT)を誘

導できることを明らかにした。興味あることに上皮様性格の強い B-1 株では EMT 誘導は形態変化、マーカー発現のいずれの点からも D-4 株に比べて弱かった (data not shown)。D-4 株は TNF- α 単独投与でも EMT 誘導が見られたのに対し、B-1 株では明らかな形態変化は認められなかった。これらの結果は D-4 株では元々の E-cadherin 発現が低いため、TNF- α 刺激で E-cadherin 発現がほとんど消失するのに対し、B-1 株では元々の E-cadherin の発現レベルが高いため、TNF- α 刺激で E-cadherin の発現が 1/3 程度に減少しても依然として一定レベルの E-cadherin があり、形態変化を引き起こすまでには至らないのではないかと考えられた。上記、D-4 株のサイトカイン刺激による EMT 誘導は in vivo における 2 相型の組織像の原因を考える上で重要な示唆を含むものと考えられる。実際、D-4 株の YAP 強制発現株をマウスの胸腔内に移植した際、上皮様組織を呈する部分と 2 相型の組織所見が認められているが (data not shown) これは腫瘍組織内の部位により宿主の微小環境が異なることが大きな要因になっているのではないかと考えられた。例えば、腫瘍内に壊死が起こり、マクロファージが集積するような場所では炎症性サイトカインの濃度が局所的に高くなり、腫瘍内で EMT が誘導される可能性も考えられた。

このように正常中皮細胞が TGF- β などのサイトカイン濃度の変化により、EMT を起こしその性質を変えることを考慮すると、臨床例でも中皮腫では上皮型、2相型、肉腫型という組織型がひとつの腫瘍内に存在し、それらの間で移行が見られるが、中皮腫の Heterogeneity は腫瘍細胞の遺伝子レベルでの変異の蓄積にもとづく polyclonality によるというよりも、むしろサイトカインなどの微小環境の変化が起因している可能性が高いことが示唆された。今後さらに EMT を効果

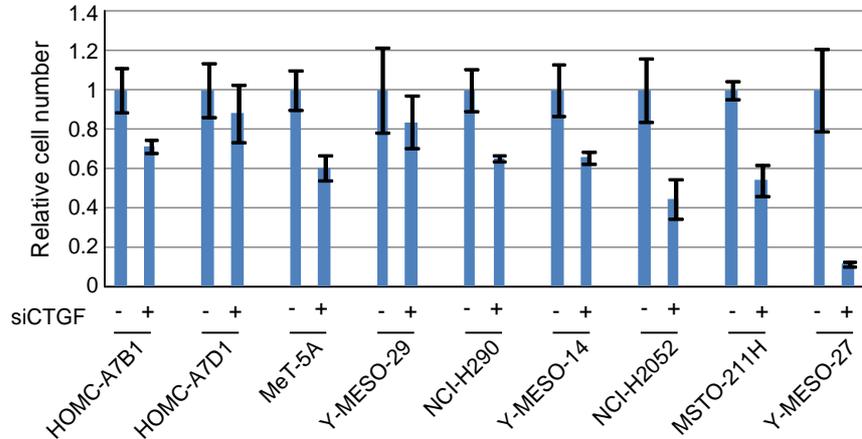


図4 不死化中皮細胞株および悪性中皮腫細胞株の CTGF ノックダウンによる細胞増殖に及ぼす影響

的に抑制し、治療に結びつけるためには、TGF-β/Hippo/CTGF経路以外のTGF-β下流シグナルとして既に知られているNF-κBなどを介したsnailの発現上昇、E-cadherinの発現低下についても制御可能か否か詳細に検討し、中皮腫におけるEMTの分子機構の全貌を明らかにする必要があるものと考えられた。

E. 結論

正常の上皮型不死化中皮細胞パネルを確立し、それらを用いてTGF-β, IL1-β, TNF-αなどの複数の炎症性サイトカインの協調作用によりEMTが誘導されること、またこのEMT誘導にはTGF-β/CTGF経路が関与し、この経路をブロックすることにより肉腫型への悪性進展を抑制できる可能性を明らかにした。今後、これらのモデルを組み合わせることにより、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ることが重要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yusa A, Toneri M, Masuda T, Okochi M, Iwata H, Honda H, Arai F, Nakanishi H:

Development of a New Rapid Isolation Device for Circulating Tumor Cells (CTCs) using 3D Palladium Filter and its Application for Genetic Analysis. PLoS ONE: 9, e8882, 2014.

2. Ito A, Ito Y, Matsushima S, Tsuchida D, Ogasawara M, Hasegawa J, Misawa K, Kondo E, Kaneda N, Nakanishi H: New whole-body multimodality imaging of gastric cancer peritoneal metastasis combining fluorescence imaging with ICG-labeled antibody and MRI in mice. Gastric Cancer, in press, 2014.
3. Oshima Y, Tanaka H, Murakami H, Ito Y, Furuya T, Kondo E, Kodera Y, Nakanishi H: Lapatinib sensitivity of two novel trastuzumab-resistant HER2 gene-amplified gastric cancer cell lines. Gastric cancer, in press.
4. Yokobori T, Iinuma H, Shimamura T, Imoto S, Sugimachi K, Ishii H, Iwatsuki M, Ota D, Ohkuma M, Iwaya T, Nishida N, Kogo R, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Toh H, Sato T, Barnard GF, Fukagawa T, Yamamoto S, Nakanishi H, Sasaki S, Miyano S, Watanabe T, Kuwano H, Mimori K, Pantel K, Mori M: Plastin 3 Is a Novel Marker for Circulating

Tumor Cells Undergoing the Epithelial-Mesenchymal Transition and Is Associated with Colorectal Cancer Prognosis. Cancer Res, 73; 2059-2069, 2013.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 発明名称：がん細胞自動分離装置およびがん細胞自動分離方法 特許出願番号：特願 2011-115083 出願人：名古屋大学、愛知県 発明者：新井 史人、益田 泰輔、新美 京（名古屋大学）；中西速夫（愛知県がんセンター） 出願日：平成 23 年 5 月 24 日
2. 発明名称：末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞分離用デバイス。特願 2013-153717、発明者：中西速夫、伊藤誠二（愛知県がんセンター） 発明者：絹田精鎮、市ノ瀬義行（株）オプトニクス精密） 発明者：遊佐亜希子（公益財団法人科学技術交流財団） 発明者：本多 裕之、大河内美奈（国立大学法人名古屋大学） 出願日；平成 25 年 7 月 23 日

