The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	癌細胞のストレス応答と新しい実験モデルの開発
Author(s)	遠藤, 洋子
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/26144
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

〔　題　　名　〕癌細胞のストレス応答と新しい実験モデルの開発

学位申請者　　遠藤　洋子

癌は無限の細胞増殖を特徴とする疾患であるが、細胞増殖を標的とした薬剤だけでは必ずしも根治には至らない。これは、癌細胞がストレス応答を行い、環境に適応して生き延びるからである。放射線治療や抗癌剤などの治療によるストレスの他、癌微小環境におけるグルコースの欠乏、低酸素、アシドーシス等も大きなストレス要因である。低酸素環境下における癌細胞は、さまざまな細胞応答を行うことで、そのストレスに対処しようとする。①血管新生による低酸素環境改善、②増殖の低下や代謝の変化による低酸素環境への適応、そして③浸潤、転移による低酸素環境からの逃避などが例として挙げられる。本研究では、抗癌剤または低酸素というストレス存在下における癌細胞の浸潤能亢進メカニズム、および癌細胞の環境適応戦略を検討した。

低酸素、アシドーシス、フリーラジカルの過剰産生などの様々な環境ストレスは、細胞にアポトーシスを誘導する。しかし、アポトーシス耐性機構を獲得した癌細胞はこのようなストレス環境下で生存することが可能である。また、低酸素や抗癌剤、放射線治療などの亜致死的な刺激は、細胞に浸潤能を誘導することが報告されている。我々は、ストレス環境下で活性化したCaspase-3が浸潤能の亢進に寄与するかどうかを検討した。

ラットhepatoma腹水より樹立したMM1細胞を用いて、ストレス環境下におけるin vitro 浸潤アッセイを行ったところ、アポトーシス誘導物質であるエトポシド（VP-16）存在下もしくは低酸素培養下で浸潤能の亢進が認められた。細胞の浸潤と相関して、Caspase-3活性が上昇した。Caspase阻害剤または、Caspase-3のshRNAを導入することで、ストレス環境下のMM1細胞の浸潤が減少したことから、Caspase-3を介した浸潤の亢進メカニズムが存在することが示唆された。Caspase-3はROCKを切断して細胞膜のblebbingを誘導することが知られている。Rho/ROCK阻害剤を添加することでストレス環境下の浸潤が抑制されたことから、Caspase-3を介したRho/ROCKシステムの活性化が重要であると考えられた。

次に、我々は癌細胞の低酸素環境への適応能を検討した。低酸素研究の多くは比較的短時間の低酸素応答を対象としたものであり、長期間にわたる慢性的な低酸素下における癌細胞の応答に関する知見は少ない。我々は、癌細胞の生存、増殖に重要な役割を果たすIGF/PR3K/mTORC1経路の低酸素下における制御に着目して実験を行った。

大腸癌細胞株COLO320を低酸素（1%O_2）、血清非存在下で培養すると、一定の数を保ち長期間生存する。この状態のCOLO320細胞に、IGF-Iまたはinsulinを添加すると、アポトーシスによる急激な細胞数の減少が認められた。低酸素下のIGF刺激はColo320細胞に小胞体ストレスを惹起し、小胞体ストレスによる細胞死の鍵分子CHOPのタンパク発現が上昇した。タンパク合成阻害剤Cycloheximideの添加またはCHOPのshRNAを導入することにより、IGF1刺激によるCOLO320細胞の細胞死が回避された。以上の結果から、低酸素下のIGF刺激は過剰なタンパク合成を促進し、細胞に小胞体スト

レスを惹起すること、またCHOPの上昇により細胞がアポトーシスすることが明らかとなった。癌細胞が低酸素環境下でmTORC1経路を抑制することは、小胞体ストレスによる負荷を軽減し、長期間生存するための癌細胞の生存戦略であると考えられた。

癌研究の多くは癌細胞株を使った実験であるが、癌細胞株は増殖能の高いクローンが選択されたものであり、長年血清含有培地で継代されることで遺伝子変異が蓄積している。より臨床腫瘍に近い状態で研究を行うため、我々は新しい癌細胞初代培養系の確立を試みた。大腸癌の多くは分化型腺癌の組織型を示し、癌細胞は細胞-細胞間接着または細胞外基質との接着を保持して腫瘍組織を形成している。我々は、in vitroの培養においてもこの細胞-細胞間接着の保持が重要であることを見出し、癌細胞を細胞集塊として培養する方法;Cancer Tissue-Originated Spheroid（CTOS）法を開発した（Kondo 2011 PNAS）。大腸がんのCTOSは、単なる単細胞の集合体ではなく、極性や分化形質を保持した機能単位であることが明らかとなった。本研究では、このCTOS法を応用し、肺癌初代培養系の確立を試みた。

大阪府立成人病センターにてインフォームドコンセントにより同意を得られた患者より、肺癌の手術検体および胸水の提供を受けた。非小細胞肺癌の手術検体を酵素的、機械的に分散させ、メッシュを通し、メッシュ上に残った細胞集塊（Organoid）を回収した。このOrganoidをES細胞用培地、StemPro® hESC中で浮遊培養すると、spheroid状の癌細胞塊が形成された。胸水検体は酵素処理を必要とせず、遠心と濾過にて同様のspheroid状の細胞塊が得られた。我々は、この癌細胞塊をCancer Tissue-Originated Spheroid ;CTOSと名付けた。肺癌手術症例125例のうち100例(80.0%)、肺癌胸水18例のうち8例（44.4%）よりCTOSの調製が可能であった。

肺癌CTOSを用いて分子標的治療薬エルロチニブの感受性試験を行った。エルロチニブは、EGFR tyrosine kinase inhibitorであり、EGFR遺伝子変異を有する腫瘍に有効であることが知られている。肺癌手術症例より得た10症例の感受性試験を行うと、エルロチニブ感受性には検体間で大きな差が見られた。感受性の高い上位5症例のうち4症例がEGFR遺伝子変異を有する検体であり、臨床的な知見と一致した。また、in vitroのエルロチニブ感受性試験は、in vivoのマウス腫瘍に対する治療反応性と相関していた。つまり、肺癌CTOSは分子標的治療薬感受性試験のプラットフォームとして利用可能であることが示唆された。

次に、StemPro® hESC中に含まれる増殖因子のうち、肺癌CTOSの増殖に寄与する因子を検討した。その結果、Neuregulin 1（NRG1 / Heregulin）が最も強い増殖促進効果を示した。NEGはERBBファミリーtyrosine kinaseの一つ、HER3のリガンドである。HER3は他のERBBファミリーとヘテロダイマーを形成することにより、細胞内シグナルを活性化する。このNRG1/HER3シグナルは、正常肺組織の損傷治癒に重要であることが報告されている。したがって、癌細胞がこの正常組織のwound-healingシステムを利用して増殖している可能性が示唆された。CTOSの増殖および細胞内シグナルの活性化は抗HER3中和抗体によって抑制されることから、NRG1/HER3シグナルが肺癌CTOSの増殖に重要であることが示された。

癌微小環境におけるストレスは、癌細胞の治療抵抗性や悪性度を増加させる要因であり、癌細胞のストレス応答を研究することは、癌の根治にむけた重要なアプローチである。新しい癌細胞初代培養法；CTOS法を利用することで、より臨床の癌に近い実験モデルで癌細胞のbiologyを研究し、新たなバイオマーカーや治療標的の探索につながると期待される。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　遠藤　洋子　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
主 査	教授	井上　正宏
副 査	教授	辻川　和丈
副 査	教授	堤　康央
副 査	教授	藤尾　慈

論文審査の結果の要旨

博士論文「癌細胞のストレス応答と新しい実験モデルの開発」は、抗癌剤または低酸素というストレス存在下での癌細胞の浸潤能や細胞死の検討と、より臨床腫瘍に近い状態で癌の生物学的応答を研究するための肺癌初代培養法に関する研究の報告である。まず、課題「caspase-3 を介したアポトーシスと浸潤シグナルのクロストーク」において、アポトーシスの鍵となるプロテアーゼ caspase-3 が、アポトーシス抵抗性の癌細胞では ROCK 切断を介して浸潤能の亢進に関与することを明らかにした。癌細胞のアポトーシス抵抗性のメカニズムを標的とすることで、癌細胞に細胞死を誘導するだけでなく、浸潤転移も回避できる可能性が示唆された。本研究は雑誌 Cancer Research に発表されている。次に課題「低酸素下 IGF 刺激による小胞体ストレスを介した細胞死の誘導」では、広く細胞死の回避に重要な役割を果たすと考えられている IGF シグナルが、低酸素下で活性化した場合、小胞体ストレスを介して細胞死が誘導されることを明らかにした。癌細胞は低酸素下で IGF 下流の mTOR 活性を低下させることが知られているが、この適応を標的とすることで、低酸素下の治療抵抗性細胞を傷害することができる可能性が示唆された。本研究は雑誌 Cancer Research に発表されている。最後に課題「新しい癌細胞初代培養系を用いた非小細胞肺癌の培養と neuregulin-1/HER3 応答性」では、非小細胞肺癌の効率的な初代培養用の開発と、培養条件下における HER3 シグナルの重要性を明らかにした。患者検体による感受性試験への応用や HER3 を標的とした治療法への応用が期待される。本研究は雑誌 Journal of Thoracic Oncology に発表されている。

これらの研究成果は、学術的に高いレベルにあり、今後癌の診断治療の開発に大きく貢献すると考えられる。

以上の研究内容を審査した結果、本論文は学術的、実用応用の観点から優れた研究であることを確認し、大阪大学大学院薬学研究科論文博士の博士論文に値すると判断した。