



Title	中皮細胞は3次元共培養において卵巣癌spheroidの癌幹細胞性を助長させる
Author(s)	宍戸, 明美
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/95939
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (宍 戸 明 美)

論文題名

中皮細胞は3次元共培養において卵巣癌spheroidの癌幹細胞性を助長させる

論文内容の要旨

【目的】

卵巣癌は婦人科腫瘍のなかで最も死亡率が高く、その要因としては初診時にすでに進行した状態で診断されることが多く、卵巣癌治療は進行癌における治療成績の向上が重要な課題とされている。卵巣癌は他の固形癌に比べて比較的早期より腹水中に出現し、その割合も高い。更に、癌性腹水症であっても化学療法後に積極的な外科的治療が施されるところが他の固形癌と大きく異なっている。卵巣癌細胞は腹水中で癌細胞が集まり球状や乳頭状の集塊を形成し浮遊し増殖しているが、これらの形態はspheroid様を呈し癌幹細胞(cancer stem cells, CSC)のspheroid形態と類似性がみられた。我々は日常の細胞診断業務において腹水中の卵巣癌細胞集塊辺縁に中皮細胞が接着している細胞像を認め、これを中皮細胞のmarkerであるcalretinin染色の免疫組織化学染色によって確認した。この異種の細胞接着や卵巣癌細胞のspheroid様形態に着目し、中皮細胞が卵巣癌細胞に対して及ぼす影響について卵巣癌細胞株とラット中皮細胞を用いたモデルで検討をおこなった。

【方法】

卵巣癌細胞株とラットの腹膜から単離した中皮細胞を用いて経時的に培養をおこない、spheroidの形成を卵巣癌細胞株の単独培養と比較した。3次元共培養で形成されたspheroidをホルマリン固定し、セルブロックを作成して免疫組織化学染色をおこない、幹細胞markerや細胞増殖活性を経時的に検索した。また、8時間と96時間の3次元培養をおこなったspheroidに対して定量PCRによって癌幹細胞markerの発現を調べた。更に、腫瘍形成能を評価するためにマウスを使った動物実験をおこなった。

【結果】

中皮細胞を加えた3次元共培養は単独培養と比較して大型のspheroidが早期より形成された。Spheroidにおける中皮細胞と卵巣癌細胞の局在は、培養初期では中皮細胞は中心部に広く存在していたが、経過とともに減少し培養後期ではわずかにみられる程度であった。対照的に辺縁に多く存在していた卵巣癌細胞は培養経過に伴い全体を占めるようになった。これらの変化と一致するように培養後期96時間よりspheroidの中心にCD133の発現がみられ、定量PCRにおいても96時間のspheroidにBmi-1の発現上昇が確認された。動物実験でも中皮細胞を加えた共培養では単独培養と比較して高い腫瘍形成がみられた。中皮細胞は卵巣癌細胞株のspheroid形成に貢献し、癌幹細胞性を助長させていることが示唆された。

【総括】

我々のラット中皮細胞を用いた実験モデルでは、spheroidを長期培養し経時的に調べることにより癌幹細胞markerの発現やその過程を可視的に観察すること可能であった。これらは腹腔中の中皮細胞が癌細胞の癌幹細胞性を助長させるきっかけとなる可能性を示した初めての報告である。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (宍 戸 明 美)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	山本 浩文
	副 査	教授	辻川 元一
	副 査	教授	岡本 成史

論文審査の結果の要旨

卵巣癌は婦人科腫瘍中で死亡率が最も高い。化学療法に高い感受性があるものの、寛解後5年以内50-85%が再発し、治療抵抗に対する対策が大きな課題となっている。

腹水中の卵巣癌細胞は、他の播種性癌と異なり spheroid 様の細胞集塊として増殖している。細胞検査診断では、しばしば卵巣癌の spheroid 様の細胞集塊辺縁に中皮細胞が付着している顕微鏡像に遭遇する。中皮細胞は卵巣癌の腹膜播種の標的細胞であるが、腹水中に浮遊した中皮細胞と卵巣癌細胞との共存の意義は十分に解明されていない。本研究では中皮細胞が卵巣癌の spheroid 形成や癌幹細胞性に果たす役割について明らかとすることを目的とした。

ラット正常中皮細胞と卵巣癌細胞株を等量混合して3次元共培養実験をおこなった結果、卵巣癌細胞単独よりも、早期より大型の spheroid を形成したことから、中皮細胞は spheroid 形成を促進することが示唆された。3次元共培養をおこなった細胞群をセルブロックとし、癌幹細胞マーカーについて免疫組織化学染色をおこなった結果、spheroid を構成する細胞群で CD44、ALDH1/2、CD133 が高発現していた。特に CD133 では、培養後期の96時間より spheroid の中心部分に強い発現がみられた。細胞増殖マーカーである Ki-67 は辺縁部で発現し中央部では消失していること、中皮細胞は spheroid 中心部に集簇していたことから、中皮細胞が静止期状態の癌幹細胞性を誘導し、分化した娘細胞は spheroid の先進部で腫瘍増殖に関わっていることが示唆された。3次元共培養における、癌幹細胞マーカー遺伝子の定量解析を qRT-PCR を用いておこなったところ、培養48時間では CD44s、Dclk-1 の発現がみられ、培養96時間には Bmi-1 の発現が認められた。いずれの遺伝子マーカーでも卵巣癌細胞単独の培養と比較して有意な発現亢進を認めた。更に、生体内での中皮細胞と卵巣癌の相互作用を解析するため免疫不全マウスを用いた腫瘍形成実験をおこなった。単独培養をした卵巣癌細胞を移植したマウスには4/7 (57%) に、共培養した細胞を移植したマウスには7/7 (100%) に腫瘍が形成された。腫瘍形成時期においても単独培養した細胞を移植したマウスでは29日目より確認できたのに対して、共培養した細胞を移植したマウスでは13日目と早期より腫瘍形成が確認でき、腫瘍体積の比較でも共培養群が有意に大きな腫瘍を造ることが明らかになった。また、ラットの中皮細胞とヒトの癌細胞との異種間作用が懸念されたため、ヒト中皮細胞株 Met-5A を用いて追試を行なったところ同様の結果が得られた。これら一連の所見は、spheroid 中で中皮細胞が卵巣癌細胞に対して癌幹細胞様特性を促進させることを示すものである。

本研究は、中皮細胞は腹膜播種した卵巣癌の単なる転移巣としての場所の提供のみならず、腹水中の中皮細胞は卵巣癌細胞に対して spheroid 形成を促進し、さらに癌幹細胞性を賦与していることを初めて明らかとしたことから、学位に値する研究成果であると考えられる。