



Adipose-derived stem cells enhance human breast cancer growth and cancer stem cell-like properties through adipsin

Goto, Hideaki

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2018-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7327号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007327>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Adipose-derived stem cells enhance human breast cancer growth and cancer stem cell-like properties through adiponectin

脂肪由来幹細胞によるアディポネクチンを介したヒト乳がん増殖およびがん幹細胞性の促進効果

神戸大学大学院医学研究科腫瘍・血液内科学専攻

内科学

(指導教員：南 博信教授)

Hideaki Goto

後藤 秀彰

【背景】

腫瘍の発生や進展において、腫瘍細胞と腫瘍周囲の微小環境 (TME) は互いに様々な相互作用を及ぼしている。TME は主にはがん関連線維芽細胞、リンパ球やマクロファージなどの免疫担当細胞、血管内皮細胞、神経細胞などで構成されており、乳がんにおいては脂肪組織が間質成分の多くを占めている。

脂肪細胞はエネルギーの蓄積や分配だけでなく、アディポカインと呼ばれるサイトカインや、各種成長因子などの分泌を介して周囲および全身の細胞に影響している。また、脂肪組織の中には脂肪幹細胞 (ADSC) が存在しており、腫瘍の進展や抗がん薬に対する薬物耐性に関わることが明らかにされつつある。本研究で我々が着目したアディポネクチンは、自然免疫反応のひとつである補体の古典経路に関わるアディポカインとして同定された。その多くは脂肪細胞から分泌されており、補体を介した免疫機能、脾臓β細胞の機能の維持、造血幹細胞を始めとした細胞の遊走、脂肪細胞の分化や脂肪産生などに関わることが知られている。しかし、乳腺脂肪組織およびADSC、各種アディポカインが乳がんに与える影響については、十分には理解されていない。

正常乳腺組織には乳腺幹細胞が存在することが知られている。乳腺上皮はその周囲を乳腺脂肪組織に囲まれており、乳腺幹細胞が乳腺上皮に分化する際には、乳腺脂肪組織がその母地として重要な役割を果たしている。一方、乳がん組織においても正常乳腺上皮の組織幹細胞と一部機能を共有するがん幹細胞 (CSC) が存在することが発見された。乳がん組織も同様に周囲は脂肪組織に囲まれており、乳がんのCSCの維持や進展に関連している可能性がある。

本研究において、我々は乳がん患者の手術検体から乳がん細胞と乳腺ADSCを分離し、これらを用いてその相互作用を解析した。そして、ADSCから分泌されているアディポネクチンがヒト乳がんPDX細胞の増殖およびがん幹細胞性を亢進させることを見出した。

【方法】

ヒト乳がん細胞と脂肪組織の相互作用を解析するために、本研究への参加同意が得られた乳がん患者の手術検体から乳がんおよび脂肪組織を分離し、乳がん異種移植マウス (PDX) 細胞とヒト乳腺ADSCを樹立した。乳がんPDX細胞については、レンチウイルスを用いて緑色蛍光色素を導入した細胞を用いて三次元培養を行った。

【結果】

1. 乳腺脂肪幹細胞による乳がんPDX細胞の増殖および幹細胞性の促進

まず、ヒト乳腺ADSCが乳がんPDX細胞に与える影響を確認するために、三次元環境下にて乳がんPDX細胞の単独培養とADSCとの共培養の比較を行った。異なる患者背景を有する計9名の乳がん患者から分離したすべてのADSCにおいて、ADSCと共培養された乳がんPDX細胞のコロニー形成能力は、単独培養と比較して有意な亢進が見られた。また、計6名の乳がん患者から分離した乳がん組織から樹立したすべての乳がんPDX細胞において、乳がん細胞のエストロゲン受容体の発現の有無に関わらず、ADSCと共培養された乳がんPDX細胞のコロニー形成能力

が有意に亢進した。これらの結果より、ヒト乳腺 ADSC は、エストロゲン受容体の発現の有無に関わらず、乳がん PDX 細胞のコロニー形成能力を亢進させることを確認した。

2. 乳腺脂肪幹細胞の分泌因子としてのアディプシンの同定

次に、計 102 種類のサイトカインを検出可能なサイトカインアレイを用いて ADSC の培養上清を解析し、培地と比較して 10 倍以上の分泌量を有するアディポカインの 1 つであるアディプシンに着目した。上記の計 9 種類の ADSC すべてにおいてアディプシンの mRNA の発現が確認されたが、乳がん PDX 細胞では発現が見られなかった。また、計 20 名の乳がん患者の手術検体から分離した腫瘍組織周囲の脂肪組織にてアディプシンの mRNA の発現量を確認したところ、肥満指数 (BMI) が 25 未満の患者から分離した脂肪組織と比較して、BMI が 25 以上の肥満患者から分離した脂肪組織で発現が有意に高かった。

3. アディプシンによる乳がん PDX 細胞のがん幹細胞性の亢進

アディプシンは補体の C3 を C3a と C3b に分解する酵素であり、乳がん PDX 細胞と比較して、ADSC の培養上清にて C3a の分泌量が ELISA 法にて有意に高かった。上記の ADSC および乳がん患者脂肪組織におけるアディプシンの mRNA の結果も併せて考えると、アディプシンは乳腺脂肪組織および ADSC から分泌されていることが確認された。

続けて、C3a が乳がん PDX 細胞のコロニー形成能力に与える影響を調べるために、C3a 受容体に対する特異的阻害薬 (SB290157) を培養上清に添加して、乳がん PDX 細胞の単独培養および ADSC との共培養を行った。乳がん PDX 細胞の単独培養では SB290157 を添加してもコロニー形成能力に変化は見られなかったが、ADSC との共培養では SB290157 を添加することで乳がん PDX 細胞のコロニー形成能力が有意に抑制された。これらの結果より、ADSC はアディプシン/C3a 経路を介して乳がん PDX 細胞のコロニー形成能力を亢進させることが示唆された。

さらに、アディプシン分泌を shRNA で抑制した ADSC (shAdipsin ADSC) と共培養された乳がん PDX 細胞においても、コントロールの ADSC (shNC ADSC) と共培養された乳がん PDX 細胞と比較してコロニー形成能力が有意に抑制された。同様の抑制効果は、アディプシン分泌を異なる二種類の siRNA で抑制した ADSC (siAdipsin ADSC) との共培養でも確認できており、アディプシンの普遍的な効果であることが示唆された。三次元培養におけるコロニー形成能力はがん幹細胞性を反映することが知られており、siAdipsin ADSC と共培養された乳がん PDX 細胞において、がん幹細胞関連の遺伝子の発現量を確認した。コントロールの ADSC (siAdipsin ADSC) と共培養された乳がん PDX 細胞と比較して、siAdipsin ADSC と共培養された乳がん PDX 細胞における CD44 と CXCR4 の mRNA 発現量が有意に低下しており、さらに細胞表面の CD44 発現もフローサイトメトリーにて有意に低下していることが確認された。これらの結果より、乳がん PDX 細胞のコロニー形成能力の一部は、CD44 や CXCR4 などのがん幹細胞関連遺伝子の発現によって調節されていることが示唆された。

4. 乳腺脂肪幹細胞による乳がん PDX 腫瘍増殖能の亢進

最後に、免疫抑制マウスへの乳がん PDX 細胞移植実験において、ADSC が乳がん PDX 細胞に与える影響を検討した。ADSC と共移植された乳がん PDX 細胞では、乳がん PDX 細胞の単独移植と比較して腫瘍の増大速度が有意に亢進された。さらに、shAdipsin ADSC と共移植された乳がん PDX 細胞では、shNC ADSC と共移植された乳がん PDX 細胞と比較して腫瘍の増大速度が有意に抑制された。

【考察】

脂肪組織は、TNF α や IL-6、HGF などの各種のアディポカインの産生を介してがんの進展に関与している。本研究で着目したアディプシンもアディポカインの一種であるが、その分泌がほぼ脂肪細胞に限定される点が特徴的である。本研究では、アディプシンによる補体 C3a の産生と C3a を介した作用に着目し、ADSC から分泌されたアディプシンが、乳がん PDX 細胞の増殖とがん幹細胞性の亢進に関与することを明らかにした。ただし、乳がん PDX 細胞の培養上清に C3a を添加するのみでは乳がん PDX 細胞に対する促進効果が十分ではなかったことから、脂肪細胞の分泌する他の因子や、細胞接着自体もがんに対する促進効果を担っている可能性が示唆される。実際に、アディプシンは脂肪細胞自身の維持や脂肪滴産生の調節因子でもあることが報告されており、アディプシンのがんに対する促進効果には、C3a を介さないメカニズムの関与も考えられる。

肥満は、閉経後乳がん、特にエストロゲン受容体陽性乳がんの発がんおよび死亡リスクを上昇させることが広く知られている。その機序として、アロマターゼを介したエストロゲンの発現上昇、インスリン抵抗性の上昇や高インスリン血症、高血糖、酸化ストレス、炎症、アディポカインなどの関与が報告されている。本研究では、乳がん組織周囲の脂肪組織から分泌されるアディプシンの発現量が、BMI \geq 25 の肥満患者において有意に高いことを確認した。したがって、肥満に伴う乳がん発生の増加の背景には、乳腺脂肪細胞からのアディプシンの発現上昇が臨床的に関与している可能性があり、今後更なる検討が必要と考えられる。

補体を含めた慢性炎症は、様々な腫瘍の微小環境における免疫抑制状態、血管新生、シグナル伝達の変化などを惹起することで、腫瘍の増殖を促進することが知られている。C3a については、悪性黒色腫において腫瘍の増殖を促進させることが報告されているが、その詳細な分子機構や、あるいは他のがん腫に与える影響については未だ不明点が多い。本研究では、アディプシンあるいはそれにより産生される C3a の抑制が、乳がん PDX 細胞の増殖およびがん幹細胞性を抑制する可能性を示した。近年、腫瘍免疫も含めた腫瘍の微小環境に対する注目が高まってきており、今後アディプシン/C3a 経路が乳がんを含めた様々ながん腫において、がん細胞、がんの微小環境、およびがん幹細胞との関係に着目した治療的となる可能性がある。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2820号	氏名	後藤 秀彰
論文題目 Title of Dissertation	Adipose-derived stem cells enhance human breast cancer growth and cancer stem cell-like properties through adipsin 脂肪由来幹細胞によるアディプシンを介したヒト乳がん増殖およびがん幹細胞性の促進効果		
審査委員 Examiner	主 査 掛地 吉弘 Chief Examiner 副 査 谷野 裕一 Vice-examiner 副 査 鈴木 聡 Vice-examiner		

(要旨は1, 000字~2, 000字程度)

【背景】

腫瘍の発生や進展において、腫瘍細胞と腫瘍周囲の微小環境 (TME) は互いに様々な相互作用を及ぼしている。乳がんにおいては脂肪組織が間質成分の多くを占めている。脂肪組織の中には脂肪幹細胞 (ADSC) が存在しており、腫瘍の進展や抗がん薬に対する薬物耐性に関わることが明らかにされつつある。本研究で我々が着目したアディプシンは、自然免疫反応のひとつである補体の古典経路に関わるアディポカインとして同定された。その多くは脂肪細胞から分泌されており、補体を介した免疫機能、膵臓β細胞の機能の維持、造血幹細胞を始めとした細胞の遊走、脂肪細胞の分化や脂肪産生などに関わることが知られている。一方、乳がん組織においても正常乳腺上皮の組織幹細胞と一部機能を共有するがん幹細胞 (CSC) が存在することが発見された。本研究において、我々は乳がん患者の手術検体から乳がん細胞と乳腺ADSCを分離し、これらを用いてその相互作用を解析した。そして、ADSCから分泌されているアディプシンがヒト乳がんPDX細胞の増殖およびがん幹細胞性を亢進させることを見出した。

【方法】

ヒト乳がん細胞と脂肪組織の相互作用を解析するために、本研究への参加同意が得られた乳がん患者の手術検体から乳がんおよび脂肪組織を分離し、乳がん異種移植マウス (PDX) 細胞とヒト乳腺ADSCを樹立した。乳がんPDX細胞については、レンチウイルスを用いて緑色蛍光色素を導入した細胞を用いて三次元培養を行った。

【結果】

1. 乳腺脂肪幹細胞による乳がんPDX細胞の増殖および幹細胞性の促進
ADSCと共培養された乳がんPDX細胞のコロニー形成能力は、単独培養と比較して有意に亢進が見られた。また、ヒト乳腺ADSCは、エストロゲン受容体の発現の有無に関わらず、乳がんPDX細胞のコロニー形成能力を亢進させることを確認した。
2. 乳腺脂肪幹細胞の分泌因子としてのアディプシンの同定
計9種類のADSCすべてにおいてアディプシンのmRNAの発現が確認されたが、乳がんPDX細胞では発現が見られなかった。また、肥満指数 (BMI) が25未満の患者から分離した脂肪組織と比較して、BMIが25以上の肥満患者から分離した脂肪組織でアディプシンのmRNAの発現が有意に高かった。
3. アディプシンによる乳がんPDX細胞のがん幹細胞性の亢進
アディプシンは乳腺脂肪組織およびADSCから分泌されていることが確認された。ADSCはアディプシン/C3a経路を介して乳がんPDX細胞のコロニー形成能力を亢進させることが示唆された。乳がんPDX細胞のコロニー形成能力の一部は、CD44やCXCR4などのがん幹細胞関連遺伝子の発現によって調節されていることが示唆された。
4. 乳腺脂肪幹細胞による乳がんPDX腫瘍増殖能の亢進
ADSCと共移植された乳がんPDX細胞では、乳がんPDX細胞の単独移植と比較して腫瘍の増大速度が有意に亢進された。さらに、shAdipsin ADSCと共移植された乳がんPDX細胞では、shNCADSCと共移植された乳がんPDX細胞と比較して腫瘍の増大速度が有意に抑制された。

【考察】

脂肪組織は、TNF α やIL-6、HGFなどの各種のアディポカインの産生を介してがんの進展に関与している。本研究で着目したアディプシンもアディポカインの一種であるが、その分泌がほぼ脂肪細胞に限定される点特徴的である。本研究では、アディプシンによる補体C3aの産生とC3aを介した作用に着目し、ADSCから分泌されたアディプシンが、乳がんPDX細胞の増殖とがん幹細胞性の亢進に関与することを明らかにした。ただし、乳がんPDX細胞の培養上清にC3aを添加するのみでは乳がんPDX細胞に対する促進効果が十分ではなかったことから、脂肪細胞の分泌する他の因子や、細胞接着自体もがんに対する促進効果を担っている可能性が示唆される。実際に、アディプシンは脂肪細胞自身の維持や脂肪滴産生の調節因子でもあることが報告されており、アディプシンのがんに対する促進効果には、C3aを介さないメカニズムの関与も考えられる。

本研究では、乳がん組織周囲の脂肪組織から分泌されるアディプシンの発現量が、BMI \geq 25の肥満患者において有意に高いことを確認した。したがって、肥満に伴う乳がん発生の増加の背景には、乳腺脂肪細胞からのアディプシンの発現上昇が臨床的に関与している可能性があり、今後更なる検討が必要と考えられる。

本研究では、アディプシンあるいはそれにより産生されるC3aの抑制が、乳がんPDX細胞の増殖およびがん幹細胞性を抑制する可能性を示した。近年、腫瘍免疫も含めた腫瘍の微小環境に対する注目が高まってきており、今後アディプシン/C3a経路が乳がんを含めた様々ながん腫において、がん細胞、がんの微小環境、およびがん幹細胞との関係に着目した治療標的となる可能性がある。

以上、本研究は、脂肪幹細胞（ADSC）から分泌されているアディプシンがヒト乳がんPDX細胞の増殖およびがん幹細胞性を亢進させることを明らかにした。アディプシン/C3a経路が、がん細胞、がんの微小環境、およびがん幹細胞との関係に着目した治療標的となる可能性を示すなど重要な知見を得ており、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。