

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04713

研究課題名(和文) 癌幹細胞をターゲットとする食道癌・胃癌の診断マーカー・治療標的の同定と応用

研究課題名(英文) Identification and clinical application of diagnostic and therapeutic marker of esophageal and gastric cancer targeting cancer stem cell

研究代表者

安井 弥 (YASUI, WATARU)

広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・教授

研究者番号：40191118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：食道癌、胃癌の治療抵抗性・再発の原因と考えられる癌幹細胞性を制御し、その診断・治療標的となる候補として、Kinesin family (KIFC1, KIF11, KIF23)、IQGAP3、DSG1を同定した。さらに、5-FU耐性胃癌細胞株において変動する遺伝子としてBST2、MCOLN3を抽出し、薬剤感受性を制御することを確認した。これらは、抗癌剤耐性癌幹細胞の診断とそれを標的とした治療への応用につながる。

研究成果の概要(英文)：As candidate diagnostic and therapeutic targets of esophageal and gastric cancers associated with spheroid-forming cancer stem cells, kinesin family (KIFC1, KIF11, KIF23), IQGAP3, DSG1 were identified. BST2 and MCOLN3, identified from 5-FU-resistant gastric cancer cells, were found to regulate chemosensitivity. These findings will contribute to the application to the diagnosis and treatment for therapy-resistant cancer stem cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：食道癌 胃癌 癌幹細胞 CAST法 新規診断・治療標的

### 1. 研究開始当初の背景

食道扁平上皮癌と胃癌は共に東アジアに好発する癌であり、その制圧研究は、わが国が担わなければならない。癌の不均一性の中で最も重要な課題は癌幹細胞 (cancer stem cell) の存在である。癌幹細胞は、ABC トランスポーターに代表される薬剤耐性遺伝子を発現していること、細胞障害ストレスに耐性であること、自己複製能を持つことなどから、抗癌剤抵抗性・放射線抵抗性および癌の進展・転移に関与する。一方、膜蛋白あるいは分泌蛋白は、それぞれ治療標的、血清診断標的として有用である。網羅的遺伝子発現解析の中で機能的に膜蛋白・分泌蛋白をコードするもののみを同定できる方法が CAST (Escherichia coli ampicillin secretion trap) 法である。このような癌における CAST 法を用いた体系的膜蛋白・分泌蛋白コード遺伝子発現解析とその診断・治療開発に向けた研究は当研究室以外には国内外で全くなされていない。東アジアで好発する食道癌・胃癌について、治療抵抗性の根幹をなす癌幹細胞に焦点を当て、CAST 法を駆使して体系的に膜蛋白・分泌蛋白を探索するものであり、きわめて独創性が高い。

### 2. 研究の目的

癌幹細胞は、治療抵抗性および癌の進展・転移に関与することが指摘されており、癌幹細胞を標的とした診断・治療戦略が必要である。本研究は、膜蛋白・分泌蛋白コード遺伝子を網羅的に解析できる CAST 法を用いて、癌幹細胞性を規定する分子を同定し、新しい治療感受性・耐性診断系を確立することおよび癌幹細胞を標的とした治療展開を目指すことを目的とする。個別化医療時代における分子病理学の方角性を示すものとしての意義も大きい。

### 3. 研究の方法

1) 癌幹細胞マーカーによる細胞分画の採取と癌幹細胞特性に関する検証：食道癌・胃癌組織および食道癌細胞株 (TE シリーズ)・胃癌細胞株 (TMK-1, MKN シリーズ, HSC シリーズ) を用いて、CD44, ALDH1 等の発現に基づいて FACS によりソートし、spheroid colony アッセイにより球状コロニーの形成を検討する。次に、癌幹細胞の特徴である抗癌剤に

対する耐性について検討する。抗癌剤は 5-FU を用いる。

2) CAST 法による膜蛋白・分泌蛋白コード遺伝子の同定と機能解析：上記1) で分取した癌幹細胞分画および他分画癌細胞から、膜蛋白・分泌蛋白コード遺伝子の包括的発現解析を CAST 法で行う。平行して、未分画の食道癌・胃癌組織および正常粘膜組織についても CAST 解析を行なう。正常組織と比較して癌に高発現する遺伝子について、実際の14種類の正常臓器と50例程度の食道癌・胃癌臨床検体を材料に定量的 RT-PCR 法によって高発現を検証する。

3) 同定した遺伝子の機能解析：分子細胞生物学的な機能解析を行ない癌細胞の特性との関連を検討する。遺伝子の強制発現系、RNA 干渉系を用い、機能解析としては、anchorage-independent growth、細胞増殖、MTT アッセイ、ボイデンチャンバーを用いた invasion アッセイ、wound healing による migration アッセイ、薬剤抵抗性等に関して検討する。

4) 胃癌細胞株抗癌剤耐性亜株と親株についての CAST 法による発現遺伝子解析および機能解析：胃癌細胞株 (MKN-45, MKN-74, KATOIII) の 5-FU 耐性亜株と親株について、2) に示したと同様の CAST 法によって、膜蛋白・分泌蛋白コード遺伝子の網羅的解析を行なう。同定された遺伝子については、3) に示したと同様に機能解析を行なう。

5) 食道癌、胃癌細胞株を用いた spheroid 特異的発現遺伝子の同定と機能解析：食道癌細胞株 (TE シリーズ)、胃癌細胞株 (MKN-1, MKN-45, MKN-74) を用い、spheroid コロニー形成細胞と平面固着細胞を分取し、CAST 法およびマイクロアレイ法で網羅的遺伝子発現解析を行う。その比較から、spheroid 特異的発現遺伝子を同定する。同定された遺伝子については、3) に示したと同様に機能解析を行なう。さらに、上記遺伝子がコードする蛋白の発現を免疫染色で食道癌、胃癌について解析し、既知の癌幹細胞マーカーとの局在を比較検討する。

6) 同定された癌幹細胞関連膜蛋白・分泌蛋白の組織切片上での発現と臨床病態・治療効果との関連：同定された癌幹細胞特異的蛋白に関しては、抗体を用いた免疫染色で食道癌および胃癌組織における発現と局在を検討

し、既知の癌幹細胞マーカーとの局在を比較検討する。さらに、抗癌剤治療（胃癌では5-FU系、食道癌では化学放射線療法）が行われ治療成績の判明している臨床例について、同様に免疫染色を行い、治療成績との相関を解析する。

#### 4. 研究成果

##### 1) Spheroid 形成を指標とした癌幹細胞性を規定する遺伝子の探索と発現・機能解析

癌幹細胞の特性である spheroid 形成を指標として、胃癌細胞株 (MKN-45, MKN-74) を対象に網羅的遺伝子発現解析を行い、spheroid 形成細胞塊に特徴的に高発現するものとして、KIFC1, KIF11, KIF2C, KIF23 等の kinesin 遺伝子群を同定した。その内、KIFC1 (Kinesin family member C1) は、分裂前中期の紡錘体の安定化に関与し、その消失で多極分裂が惹起されることが知られている。胃癌臨床検体において KIFC1 の発現は 37% (41/114) で認められ、癌の進行度に相関し、予後不良の傾向にあった。さらに、癌幹細胞マーカーの CD44 および ALDH1 と有意な相関を認めた。KIFC1 の siRNA ノックダウンにより、増殖ならびに spheroid 形成が抑制された。一方、食道扁平上皮癌臨床検体では、72% (95/132) で過剰発現し、癌幹細胞マーカー ALDH1 と有意な相関を認めた。KIFC1-siRNA ノックダウンにより、spheroid 形成が抑制された。同じく分裂関連 kinesin である KIF23 は、胃癌の 32% (38/117) で高発現しており、Ki-67 でみた増殖活性、遠隔転移、予後不良と相関していた。ノックダウンにより増殖能、spheroid 形成能が抑制された。KIF11 は mitotic kinesin のひとつである。胃癌臨床検体における KIF11 の発現は 72% (119/165) で認められ、腸型形質と有意に相関していた。KIF11-siRNA ノックダウンにより、増殖ならびに spheroid 形成が抑制された。食道扁平上皮癌においても同様の知見が得られた。

Spheroid 形成細胞で高発現する膜蛋白である IQGAP3 は、胃癌の 21% (34/165) に過剰発現し、胃型粘液形質、癌の進展と相関し、多変量解析により独立した予後不良因子であることが分かった。IQGAP3-siRNA ノックダウンの解析から、AKT/ERK pathway を介して増殖ならびに spheroid 形成に関与している

ことが明らかとなった。

さらに、MKN-1 細胞株における解析から、Spheroid 形成関連遺伝子として、DSG1, TD02, IGFL4 などを同定した。DSG1 は、デスモソームを構成する膜貫通蛋白 Desmoglein 1 をコードする。胃癌の 42% (33/78) に過剰発現し、組織学的分化度、脈管内侵襲と相関することが分かった。DSG1-siRNA ノックダウンの解析から、細胞増殖ならびに spheroid 形成に関与していることが明らかとなった。

##### 2) 抗癌剤耐性で発現変動する遺伝子の食道癌・胃癌における発現・機能解析

胃癌細胞株 MKN-74 の親株で過剰発現し、5-FU 耐性株では発現が低下する遺伝子として BST2 (Bone marrow stem cell antigen 2) を同定した。食道癌の 27% (36/132) で過剰発現し、リンパ管内侵襲と相関することを見いだした。多変量解析において、BST-2 陽性は独立した予後予測因子であった。siRNA ノックダウンによる細胞生物学的検討により、BST2 は癌細胞の増殖に関与することを明らかにした。

同様に、胃癌細胞株 MKN-74 の親株と 5-FU 耐性株での遺伝子発現プロファイルを比較し、MCOLN3 (mucolipin 3) を同定した。胃癌の 37% (48/130) で過剰発現し、癌の進展と相関することを見いだした。術後 S-1 化学療法施行例において MCOLN3 陽性は予後不良であった。MCOLN3-siRNA ノックダウンにより、5-FU および paclitaxel 耐性は回復した。

##### 3) 胃癌で特異的に高発現する PCDHB9 の機能と抗癌剤耐性との関連

胃癌で特異的に高発現する遺伝子として PCDHB9 を同定した。種々のインテグリンの発現制御を介して細胞外基質との接着を促進し、マウスモデルで腹膜播種転移に関与することを明らかにした。抗癌剤耐性との関連について解析を進めている。

##### 4) 課題と今後の展開

Spheroid biology を用いた解析では、kinesin 遺伝子群に加え、膜蛋白、細胞接着分子など癌幹細胞性に関連する遺伝子候補を多く同定している。現在までに解析に至っていない候補遺伝子も残されており、今後はこれらについて解析を行い、食道癌、胃癌の癌幹細胞の本態に迫る方向である。

癌幹細胞の特性のひとつである抗癌剤耐性に関しては、昨年度から続けている MCOLN3

の解析、その他の 5-FU 耐性関連候補遺伝子の解析、PCDHB9 の抗癌剤耐性との関連解析を行なっていく。そのために、実験系として幹細胞に富むことが知られている癌由来オルガノイドを用いる計画である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

1. Yuge R, Kitadai Y, Takigawa H, Naito T, Oue N, Yasui W, Tanaka S, Chayama K: Silencing of discoidin domain receptor-1 (DDR1) concurrently inhibits multiple steps of metastatic cascade in gastric cancer. *Translational Oncology* 11:575-584, 2018, 査読有  
doi: 10.1016/j.tranon.2018.02.003.
2. Oue N, Yamamoto Y, Oshima T, Asai R, Ishikawa A, Uraoka N, Sakamoto N, Sentani K, Yasui W: Overexpression of transmembrane protein IQGAP3 is associated with poor survival of patients with gastric cancer. *Pathobiology* 85(3):192-200, 2018, 査読有  
doi: 10.1159/000481890.
3. Mukai S, Oue N, Oshima T, Imai T, Sekino Y, Honma R, Sakamoto N, Sentani K, Kuniyasu H, Tanabe K, Yoshida K, Ohdan H, Yasui W: Overexpression of PCDHB9 promotes peritoneal metastasis and correlates with poor prognosis in patients with gastric cancer. *J Pathol* 243:100-110, 2017, 査読有  
doi: 10.1002/path.4931.
4. Imai T, Oue N, Yamamoto Y, Ishikawa A, Uraoka N, Sakamoto N, Sentani K, Yoshida K, Yasui W: Overexpression of KIF11 and its association with spheroid formation in esophageal squamous cell carcinoma. *Path Res Pract* 213:1388-1393, 2017, 査読有  
doi: 10.1016/j.prp.2017.09.009.
5. Imai T, Oue N, Sentani K, Sakamoto N, Uraoka N, Egi H, Hinoi T, Ohdan H, Yoshida K, Yasui W: KIF11 is required for spheroid formation of oesophageal and colorectal cancers. *Anticancer Res* 37:47-55, 2017, 査読有  
doi: 10.21873/anticancers.11xxx.
6. Nishimura T, Tamaoki M, Komatsuzaki R, Komatsu M, Aoyagi K, Minashi K, Taniguchi H, Oue N, Chiwaki F, Tachinomri Y, Yasui W, Shinohara H, Muto M, Yoshida T, Sakai Y, Sasaki H: SIX1 maintains tumor basal cells via TGF- $\beta$  pathway and associates with poor prognosis in esophageal cancer. *Cancer Sci* 108: 216-225, 2017, 査読有  
doi: 10.1111/cas.13135.
7. Mukai S, Oue N, Oshima T, Tatsumoto Y, Sakamoto N, Sentani N, Hinoi T, Ohdan H, Yasui W: Overexpression of transmembrane protein BST2, participating in cell growth, is associated with poor survival in patients with esophageal, gastric and colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 24(2):594-602, 2017, 査読有  
doi: 10.1245/s10434-016-5100-z.
8. Imai T, Oue N, Nishioka M, Mukai S, Oshima T, Sakamoto N, Sentani K, Matsusaki K, Yoshida K, Yasui W: Overexpression of KIF11 in gastric cancer with intestinal mucin phenotype. *Pathobiology* 84:16-24, 2016, 査読有  
doi: 10.1159/000447303.
9. Anami K, Oue N, Noguchi T, Sakamoto N, Sentani K, Hayashi T, Naito Y, Oo HZ, Yasui W: Tetraspanin 8, identified by the Escherichia coli ampicillin secretion trap, is associated with cell growth and invasion in gastric cancer. *Gastric Cancer* 19:370-380, 2016, 査読有  
doi: 10.1007/s10120-015-0478-z.
10. Oo HZ, Sentani K, Mukai S, Hattori T, Shinmei S, Goto K, Sakamoto N, Naito Y, Anami K, Trang PBT, Yanagihara K, Oue N, Yasui W: Fukutin, identified by Escherichia coli Ampicillin Secretion Trap (CAST) method, participates in tumor progression in gastric cancer. *Gastric Cancer* 19:443-452, 2016, 査読有  
doi: 10.1007/s10120-015-0511-2.
11. Goto K, Honma R, Sakamoto N, Sentani K, Oue N, Teishima J, Matsubara A, Yasui W: Transcribed Ultra-conserved Regions in prostate and gastric cancer: DNA hypermethylation and

microRNA-associated regulation. *Oncogene* 35: 3598-3606, 2016, 査読有  
doi: 10.1038/onc.2015.445.

12. Que N, Mukai S, Imai T, Trang TBP, Oshima T, Sentani K, Sakamoto N, Yoshida K, Yasui W: Induction of KIF1C1 expression in gastric cancer spheroids. *Oncology Reports* 36: 349-355, 2016, 査読有  
doi: 10.3892/or.2016.4781.
13. Fujii S, Fujiwara A, Natori K, Abe A, Kuboki Y, Higuchi Y, Aizawa M, Kuwata T, Kinoshita T, Yasui W, Ochiai A: TEM1 expression in cancer-associated fibroblasts is correlated with a poor prognosis in patients with gastric cancer. *Cancer Medicine* 4:1667-1678, 2015, 査読有  
doi: 10.1002/cam4.515.
14. Que N, Sentani K, Sakamoto N, Yasui W: Clinicopathologic and molecular characteristics of gastric cancer showing gastric and intestinal mucin phenotype. *Cancer Sci* 106:951-958, 2015, 査読有  
doi: 10.1111/cas.12706.

[学会発表] (計 29 件)

1. 安井 弥: 胃癌の病理 -現状と展望-. 第 55 回日本癌治療学会学術集会、10 月 20-22 日、横浜、2017
2. 安井 弥: がん分子病理の来し方・行く先. 第 76 回日本癌学会学術総会、9 月 28-30 日、横浜、2017
3. 浅井竜一、大上直秀、今井健晴、山本悠司、福永武史、坂本直也、仙谷和弘、吉田和弘、安井 弥: KIF23 は食道癌・大腸癌細胞におけるスフェロイド形成に必要である. 第 76 回日本癌学会学術総会、横浜、9 月 28-30 日、2017
4. 大上直秀、山本悠司、今井健晴、田邊和照、大段秀樹、坂本直也、仙谷和弘、安井 弥: IQGAP3 の発現は胃癌の予後不良と関連する. 第 76 回日本癌学会学術総会、横浜、9 月 28-30 日、2017
5. 山本悠司、大上直秀、今井健晴、浅井竜一、坂本直也、仙谷和弘、大段秀樹、安井 弥: KIF23 の発現は胃癌の予後と相關する. 第 76 回日本癌学会学術総会、横浜、9 月 28-30 日、2017
6. 浅井竜一、今井健晴、山本悠司、大上直秀、仙谷和弘、坂本直也、吉田和弘、安井 弥: 胃癌における KIF23 の発現解析とスフェロイド形成への影響. 第 14 回日本病理学会カンファレンス、名古屋、7 月 28-29 日、2017
7. 大上直秀、山本悠司、今井健晴、田邊和照、大段秀樹、坂本直也、仙谷和弘、安井 弥: IQGAP3 の発現誘導と胃癌におけるスフェロイド形成. 第 106 回日本病理学会総会、東京、4 月 27-29 日、2017
8. Yasui W, Que N, Sentani K and Sakamoto N: The value and challenge of HER2 pathways in gastric cancer therapy. 12<sup>th</sup> International Gastric Cancer Congress, Beijing (China), April 20-23, 2017
9. Que N: Novel Biomarkers of Gastric Cancer. 12th International Gastric Cancer Congress, Beijing (China), April 20-23, 2017
10. 安井 弥: Molecular pathology of gastric cancer in the past, present and future precision medicine. 第 89 回日本胃癌学会総会、3 月 8-10 日、広島、2017
11. 今井健晴、大上直秀、山本悠司、坂本直也、仙谷和弘、吉田和弘、安井 弥: KIF11 は腸型胃癌において高発現している. 第 89 回日本胃癌学会総会、広島、3 月 8-10 日、2017
12. Yasui W: Cross-disciplinary approach to control gastric cancer in precision medicine. The 2016 Annual Congress of Korean Surgical Society, Seoul (Korea), November 3-5, 2016
13. 服部 結、大上直秀、服部拓也、今井健晴、坂本直也、仙谷和弘、安井 弥: 食道扁平上皮癌における KIF1C1 の発現と幹細胞の関連. 第 75 回日本癌学会学術総会、横浜、10 月 6-8 日、2016
14. 石川 洸、今井健晴、向井正一朗、坂本直也、仙谷和弘、大上直秀、安井 弥: 食道扁平上皮癌における Kinesin family member11 の発現解析. 第 75 回日本癌学会学術総会、横浜、10 月 6-8 日、2016
15. 今井健晴、大上直秀、向井正一朗、坂本直也、仙谷和弘、吉田和弘、安井 弥: KIF11 は腸型胃癌の発生に關与する. 第 75 回日本癌学会学術総会、横浜、10 月 6-8 日、2016
16. 大上直秀、向井正一朗、今井健晴、國安弘基、仙谷 和弘、坂本直也、大段秀樹、吉田和弘、安井 弥: 膜貫通蛋白質 PCDHB9 は接着及び播種を促進し胃癌の予

- 後不良に關与する. 第 27 回日本消化器癌  
 發生学会総会、9 月 15-16 日、鹿児島、  
 2016
17. 今井健晴、向井正一朗、大上直秀、仙谷  
 和弘、吉田和弘、安井 弥：胃癌におけ  
 る Kinesin family member11 の発現・機  
 能解析. 第 105 回日本病理学会総会、仙  
 台、5 月 12-14 日、2016
  18. 向井正一朗、大上直秀、後藤景介、仙谷  
 和弘、大段秀樹、安井 弥：胃癌におけ  
 る PCDHB9 の機能および発現意義につい  
 て. 第 105 回日本病理学会総会、仙台、5  
 月 12-14 日、2016
  19. Yasui W: Molecular pathological  
 approach to develop novel cancer  
 diagnostics and therapeutics. The 27<sup>th</sup>  
 Annual Meeting of the Japanese Society  
 of Oral Pathology, Special Lecture,  
 Hiroshima (Japan), August 10-12, 2016
  20. 向井正一朗、大上直秀、後藤景介、仙谷  
 和弘、大段秀樹、安井 弥：胃癌におけ  
 る PCDHB9 の発現とその意義. 第 74 回日  
 本癌学会学術総会、名古屋、10 月 8-10  
 日、2015
  21. 大上直秀、向井正一朗、Pham T. B Trang、  
 仙谷和弘、安井 弥：KIFC1 は胃癌細胞  
 のスフェロイド形成に重要である. 第 74  
 回日本癌学会学術総会、名古屋、10 月  
 8-10 日、2015
  22. 今井健晴、向井正一朗、大上直秀、後藤  
 景介、仙谷和弘、大段秀樹、吉田和弘、  
安井 弥：食道扁平上皮癌における  
 PCDHB9 の機能解析. 第 74 回日本癌学会  
 学術総会、名古屋、10 月 8-10 日、2015
  23. 大上直秀、仙谷和弘、坂本直也、浦岡直  
 礼、服部拓也、安井 弥：SAGE 法・CAST  
 法から同定した胃癌関連マーカーとその  
 意義. 第 35 回日本分子腫瘍マーカー研究  
 会、10 月 7 日、名古屋、2015
  24. Yasui W: Molecular pathology of  
 gastric cancer. JP Kim Memorial  
 International Gastric Cancer  
 Symposium, Seoul (Korea), July 31,  
 2015
  25. Yasui W: Endoscopic management of  
 early gastric cancer: Molecular  
 analysis in endoscopic specimen. The  
 11<sup>th</sup> International Gastric Cancer  
 Congress, Invited speaker, Sao Paulo  
 (Brazil), June 4-6, 2015
  26. 向井正一朗、大上直秀、仙谷和弘、Htoo  
 Zarni Oo、大段秀樹、安井 弥：胃癌に  
 おける BST2 発現は 5-FU 感受性と関連が  
 ある. 第 104 回日本病理学会、名古屋、4  
 月 30-5 月 2 日、2015
  27. 立本淑子、向井正一朗、PhamThi Binh  
 Trang、大上直秀、仙谷和弘、安井 弥：  
 CAST 法を用いて同定した BST2 の食道癌  
 における機能解析. 第 104 回日本病理学  
 会、名古屋、4 月 30-5 月 2 日、2015
  28. 大上直秀、向井正一朗、Pham T. B Trang、  
 坂本直也、仙谷和弘、安井 弥：胃癌に  
 おけるスフェロイド形成関連遺伝子と癌  
 幹細胞との関連. 第 104 回日本病理学会、  
 名古屋、4 月 30-5 月 2 日、2015
  29. Que N, Mukai S, Pham TBT, Sentani K and  
Yasui W: Significance of KIFC1 in  
 spheroid formation of gastric cancer  
 cells. AACR (American Association for  
 Cancer Research) Annual Meeting 2015,  
 Philadelphia, Pennsylvania (USA),  
 April 18-22, 2015
- [その他]  
 ホームページ等  
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/byoril/>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
 安井 弥 (YASUI WATARU)  
 広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・教  
 授  
 研究者番号：40191118
  - (2) 研究分担者  
 なし ( )  
 研究者番号：
  - (3) 連携研究者  
 大上 直秀 (OUE NAOHIDE)  
 広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・准  
 教授  
 研究者番号：60346484  
 國安 弘基 (KUNIYASU HIROKI)  
 奈良県立医科大学・医学部・教授  
 研究者番号：00253055