

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10108

研究課題名(和文) 幹細胞マーカーを用いた癌細胞競合下における真の浸潤・転移癌細胞の同定と機序解明

研究課題名(英文) Identification and clarification with stem cell markers of real invasive and metastatic cancer cell under cancer cell competition.

研究代表者

喜多 芳昭(KITA, Yoshiaki)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・助教

研究者番号：30570692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞株の共培養と網羅的遺伝子解析を行い、Notch signaling関連遺伝子群が変化している事を解明、Notch1の発現に注目、腫瘍におけるNotch1発現、さらに間質に接する腫瘍先進部での腫瘍細胞の形態と核におけるNotch1発現パターンが大きく3つに分類、この分類の1つは強く腫瘍の臨床病理学的因子ならびに生命予後と関連することを見出した。最終的にNotch1とNotch3が互いに作用することで腫瘍先進部が上皮間葉転換を起こし癌幹細胞性を所有することを証明した。並行して、有力な細胞競合に関わるmicro RNAを抽出。それぞれの発現確認、標的遺伝子の検索、mRNA抑制確認を行った。

研究成果の概要(英文)：According to cancer cell line competition culture and comprehensive expression gene analysis, we found the work with some genes associated with Notch 1 signaling. Therefore, we focus on Notch1 expression on cancer tissue. We anticipated morphological evaluation of Nuclear Notch1 expression in esophageal squamous cell carcinoma and categorized 3 expression patterns. One of these expression pattern significantly associated with clinicopathological factors and overall survival. Moreover, we investigated that interplay between Notch1 and Notch3 promotes EMT and tumor initiation in squamous cell carcinoma. Meanwhile, we also detected some micro RNAs in line with cancer cell competition from next generation sequence analysis.

研究分野：消化器外科

キーワード：幹細胞マーカー

### 1. 研究開始当初の背景

増殖能力や適応力が高い細胞と増殖が遅く適応度の低い細胞が互いに非自律的に競合して、最終的に一定の大きさと機能を持つ器官が形成される現象である細胞競合が、癌組織の形成においても関連が示唆されているが、明確な機序解明には至っておらず、この「癌細胞競合」に着目し、消化器癌における細胞競合に着目し「癌細胞競合が、癌組織の heterogeneity (不均一性) につながり、に浸潤・転移を誘発するのではないか」という仮説のもと本研究を遂行した。

### 2. 研究の目的

【研究課題】幹細胞マーカーを用いた癌細胞競合下における真の浸潤・転移癌細胞の同定と機序解明:

消化器癌において浸潤・転移を引き起こす細胞を「幹細胞」「癌細胞競合」という新たな視点から同定し、その機能解析を行うことによって、新規の浸潤・転移の予測バイオマーカーの発見に繋げ、新しい機序の浸潤・転移抑制薬の創薬、個々の患者に最もふさわしい治療(テーラーメイド治療)の確立をめざす。

### 3. 研究の方法

【平成 27 年度の計画】共培養系を用いた癌細胞競合モデルからマーカーの選定

用いる細胞株は癌幹細胞マーカー発現株を中心とした同種の細胞で、具体的には膵臓癌細胞株 Capan-1 の CD133 高・低発現株 (Hayashi T et al, Cancer Sci, 2012), Epidermoid 癌細胞株である KB cell に TP 高発現させた KB/TP cell (Mori S, Human Cell, 2001), thymidine phosphorylase を transfect した大腸癌細胞株, また FACS によりソートした食道癌幹細胞マーカーである ALDH1A1, CD44 高・低発現癌細胞株を用いる。共培養の条件は、標準環境に加え低酸素環境下, 無血清下, 単培養と共培養ばかりでなく、各培養内での比較も行う。比較項目も細胞形態 + 細胞競合関連遺伝子の発現解析を行い、変化があれば網羅的遺伝子解析を行い癌細胞競合遺伝子候補を抽出する。

【平成 28 年度の計画】臨床サンプルによる検証

抽出した癌細胞競合関連遺伝子が真の浸潤・転移細胞のマーカーとなるか、食道癌を中心に臨床サンプルを用いて検証、抽出した遺伝子群を実際の手術切除標本を用いて、RT-PCR, 免疫染色, Western blotting で確認、さまざまな臨床因子や予後との相関を検討する。臨床サンプルにおいては腫瘍先進部が浸潤・転移を起こすと予想されるので、腫瘍先進部の発現解析に特に注目した。

【平成 29 年度の計画】遺伝子導入実験及び動物実験による検証

In vitro 実験: 上記遺伝子を siRNA や ShRNA

を用いて発現抑制や、プラスミドベクターを用いた過剰発現を誘導し、細胞増殖能力、浸潤能力、細胞周期、アポトーシスでの違いを検討する。大きな違いを認めるようであればリン酸化や活性まで検証し、細胞周期、アポトーシスで明確な差が生じる様であれば、抗がん剤耐性実験も検討する。

さらに、m<sup>1</sup>ヌードマウスの皮下にそれぞれの有力遺伝子を強制発現、ノックアウトした細胞株を植え、皮下腫瘍モデルを作成する。まずは腫瘍の生着が大前提であるため、数種類の細胞株を用い、腫瘍形成に最適な移植細胞数を決定し、マトリゲルを用いてヌードマウス皮下に注入する。生着が悪い場合は、NOD/SCID マウスの使用も検討する。検討する項目としては、皮下腫瘍のサイズ、増殖速度への影響や皮下腫瘍を病理学的に検討する。次に尾静脈から腫瘍細胞を注射し遠隔転移モデルを作成する。最終的に皮下腫瘍モデルと遠隔転移モデルで、中和抗体を用いての転移を含めた腫瘍の抑制が可能かどうかを確認する。

### 4. 研究成果

(1) 幹細胞マーカー発現の膵臓癌細胞株 Capan-1 の CD133 高・低発現株と Epidermoid 癌細胞株である KB cell に TP 高発現させた KB/TP cell で共培養を行い、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析を行い、Notch signaling を司る遺伝子群が著明に変化していることが判明した。

(2) 上記より、正常組織の分化に関与すると同時に、様々な固形腫瘍においては血管新生の制御および腫瘍増殖に関与していると報告されている Notch1 の発現に注目し、食道扁平上皮癌の手術切除標本を用いて解析し、腫瘍における Notch1 発現が、腫瘍の臨床病理学的因子ならびに生命予後と関連することが明らかとなった。さらに腫瘍先進部で間質に接する部分での腫瘍細胞の形態と核における Notch1 発現パターンが大きく 3 つに分類でき、この分類の 1 つはさらに強く腫瘍の臨床病理学的因子ならびに生命予後と関連することを見出した。

(3) Notch1 と Notch3 が互いに作用することで腫瘍の浸潤・転移に最も密に関連すると考えられる腫瘍先進部が EMT を起こし癌幹細胞性を所有することを証明した。

(4) 並行して、Non-coding RNA である micro RNA に関するマイクロアレイと次世代シーケンサー解析も行い、有力な細胞競合に関わる micro RNA を抽出した (miR 375, pre-miR-150, miR-217, miR-216 cluster, miR-148a)。おのこの microRNA の臨床サンプルでの発現確認、標的遺伝子の検索、ルシフェラーゼアッセイによる mRNA 抑制確認、機能解析まで行った。

(5) 癌細胞においてオートファジーマーカーである LC3 の発現を解析さらに癌細胞内で活性酸素に対する抗酸化作用が高まっている

ることを報告しており、オートファジーは TGF- $\beta$  が誘導する EMT を介して CD44 高発現細胞を増加させ、スーパーオキシド活性とミトコンドリアの脱分極や活性酸素 (ROS) 抑制が関連することを証明した。

#### 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 22 件)

1. Yamasaki Y, Ishigami S, Arigami T, Kita Y, Uchikado Y, Kurahara H, Kijima Y, Maemura K, Natsugoe S. Expression of gremlin1 in gastric cancer and its clinical significance. *Med Oncol*. 2018 Feb 2;35(3):30. (査読あり)
2. Amatatsu M, Arigami T, Uenosono Y, Yanagita S, Uchikado Y, Kijima Y, Kurahara H, Kita Y, Mori S, Sasaki K, Omoto I, Maemura K, Ishigami S, Natsugoe S. Programmed death-ligand 1 is a promising blood marker for predicting tumor progression and prognosis in patients with gastric cancer. *Cancer Sci*. 2018 Mar;109(3):814-820. (査読あり)
3. Noda M, Okumura H, Uchikado Y, Omoto I, Sasaki K, Kita Y, Mori S, Owaki T, Arigami T, Uenosono Y, Nakajo A, Kijima Y, Ishigami S, Maemura K, Natsugoe S. Correlation Between Biomarker Candidate Proteins with the Effect of Neoadjuvant Chemoradiation Therapy on Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2018 Feb;25(2):449-455. (査読あり)
4. Natsuizaka M, Whelan KA, Kagawa S, Tanaka K, Giroux V, Chandramouleeswaran PM, Long A, Sahu V, Darling DS, Que J, Yang Y, Katz JP, Wileyto EP, Basu D, Kita Y, Natsugoe S, Naganuma S, Klein-Szanto AJ, Diehl JA, Bass AJ, Wong KK, Rustgi AK, Nakagawa H. Interplay between Notch1 and Notch3 promotes EMT and tumor initiation in squamous cell carcinoma. *Nat Commun*. 2017 Nov 24;8(1):1758. doi: 10.1038/s41467-017-01500-9. (査読あり)
5. Yonemori K, Seki N, Idichi T, Kurahara H, Osako Y, Koshizuka K, Arai T, Okato A, Kita Y, Arigami T, Mataka Y, Kijima Y, Maemura K, Natsugoe S. The microRNA expression signature of pancreatic ductal adenocarcinoma by RNA sequencing: anti-tumour functions of the microRNA-216 cluster. *Oncotarget*. 2017 Jul 26;8(41):70097-70115. (査読あり)
6. Idichi T, Seki N, Kurahara H, Yonemori K, Osako Y, Arai T, Okato A, Kita Y, Arigami T, Mataka Y, Kijima Y, Maemura K, Natsugoe S. Regulation of actin-binding protein ANLN by antitumor miR-217 inhibits cancer cell aggressiveness in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2017 May 29;8(32):53180-53193. (査読あり)
7. Mori S, Kita Y, Baba K, Yanagi M, Tanabe K, Uchikado Y, Kurahara H, Arigami T, Uenosono Y, Mataka Y, Nakajo A, Maemura K, Natsugoe S. Laparoscopic complete mesocolic excision via mesofascial separation for left-sided colon cancer. *Surg Today*. 2017 Aug 23. doi: 10.1007/s00595-017-1580-0. (査読あり)
8. Osako Y, Seki N, Koshizuka K, Okato A, Idichi T, Arai T, Omoto I, Sasaki K, Uchikado Y, Kita Y, Kurahara H, Maemura K, Natsugoe S. Regulation of SPOCK1 by dual strands of pre-miR-150 inhibit cancer cell migration and invasion in esophageal squamous cell carcinoma. *J Hum Genet*. 2017 Jun 29. doi: 10.1038/jhg.2017.69. [Epub ahead of print] 62(11):935-944(査読あり)
9. Yanagita S, Uenosono Y, Arigami T, Kita Y, Mori S, Natsugoe S. Utility of the sentinel node concept for detection of lateral pelvic lymph node metastasis in lower rectal cancer. *BMC Cancer*. 2017 Jun 19;17(1):433. (査読あり)
10. Whelan KA, Chandramouleeswaran PM, Tanaka K, Natsuizaka M, Guha M, Srinivasan S, Darling DS, Kita Y, Natsugoe S, Winkler JD, Klein-Szanto AJ, Amaravadi RK, Avadhani NG, Rustgi AK, Nakagawa H. Autophagy supports generation of cells with high CD44 expression via modulation of oxidative stress and Parkin-mediated mitochondrial clearance. *Oncogene*. 2017 Aug 24;36(34):4843-4858. doi: 10.1038/onc.2017.102. (査読あり)
11. Sasaki K, Uchikado Y, Okumura H, Omoto I, Kita Y, Arigami T, Uenosono Y, Owaki T, Maemura K, Natsugoe S. Role of 18F-FDG-PET/CT in Esophageal Squamous Cell Carcinoma After Neoadjuvant Chemoradiotherapy. *Anticancer Res*. 2017 Feb;37(2):859-864. PMID: 28179343(査読あり)
12. Yonemori K, Seki N, Kurahara H, Osako Y, Idichi T, Arai T, Koshizuka K, Kita Y, Maemura K, Natsugoe S. ZFP36L2 promotes cancer cell aggressiveness

- and is regulated by antitumor microRNA-375 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Sci.* 2017 Jan;108(1):124-135. doi: 10.1111/cas.13119. (査読あり)
13. Tanabe K, Shinsato Y, Furukawa T, Kita Y, Hatanaka K, Minami K, Kawahara K, Yamamoto M, Baba K, Mori S, Uchikado Y, Maemura K, Tanimoto A, Natsugoe S. Filamin C promotes lymphatic invasion and lymphatic metastasis and increases cell motility by regulating Rho GTPase in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2017 Jan 24;8(4):6353-6363(査読あり)
  14. Arigami T, Uenosono Y, Ishigami S, Yanagita S, Okubo K, Uchikado Y, Kita Y, Mori S, Kurahara H, Maemura K, Natsugoe S. Clinical Significance of the Glasgow Prognostic Score in Patients with Gastrointestinal Stromal Tumors. *Anticancer Res.* 2016 Dec;36(12):6687-6690. (査読あり)
  15. Kijima T, Arigami T, Uchikado Y, Uenosono Y, Kita Y, Owaki T, Mori S, Kurahara H, Kijima Y, Okumura H, Maemura K, Ishigami S, Natsugoe S. Combined Fibrinogen and Neutrophil-Lymphocyte Ratio as a Prognostic Marker of Advanced Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Sci.* 2016 Nov 27. doi: 10.1111/cas.13127(査読あり)
  16. Arigami T, Uenosono Y, Ishigami S, Yanagita S, Okubo K, Uchikado Y, Kita Y, Mori S, Kurahara H, Maemura K, Natsugoe S. Clinical Impact of Stomach-partitioning Gastrojejunostomy with Braun Enteroenterostomy for Patients with Gastric Outlet Obstruction Caused by Unresectable Gastric Cancer. *Anticancer Res.* 2016 Oct;36(10):5431-5436. (査読あり)
  17. Osako Y, Seki N, Kita Y, Yonemori K, Koshizuka K, Kurozumi A, Omoto I, Sasaki K, Uchikado Y, Kurahara H, Maemura K, Natsugoe S. Regulation of MMP13 by antitumor microRNA-375 markedly inhibits cancer cell migration and invasion in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* 2016 Dec;49(6):2255-2264(査読あり)
  18. Mori S, Kita Y, Baba K, Yanagi M, Tanabe K, Uchikado Y, Kurahara H, Arigami T, Uenosono Y, Mataka Y, Okumura H, Nakajo A, Maemura K, Natsugoe S. Laparoscopic complete mesocolic excision via combined medial and cranial approaches for transverse colon cancer. *Surg Today.* 2017 May;47(5):643-649(査読あり)
  19. Desaki R, Sawada G, Okumura H, Ikeda R, Tanabe K, Komatsu H, Mimori K, Mori M, Kita Y, Uchikado Y, Arigami T, Uenosono Y, Owaki T, Ishigami S, Natsugoe S. As a Novel Prognostic Marker, Cysteine/histidine-rich 1 (CYHR1) is a Therapeutic Target in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2017 Feb;24(2):586-593. (査読あり)
  20. Kita Y, Yonemori K, Osako Y, Baba K, Mori S, Maemura K, Natsugoe S. Noncoding RNA and colorectal cancer: its epigenetic role. *J Hum Genet.* 62(1)41-47. 2017(査読あり)
  21. Hiwatashi K, Ueno S, Sakoda M, Iino S, Minami K, Mori S, Kita Y, Baba K, Kurahara H, Mataka Y, Maemura K, Shinchi H, Natsugoe S. The Evaluation of Liver Function and Surgical Influence by ICGR15 after Chemotherapy for Colorectal Liver Metastases. *J Cancer.* 2016 Mar 18;7(5):595-9(査読あり)
  22. Arigami T, Uenosono Y, Ishigami S, Okubo K, Kijima T, Yanagita S, Okumura H, Uchikado Y, Kijima Y, Nakajo A, Kurahara H, Kita Y, Mori S, Maemura K, Natsugoe S. A Novel Scoring System Based on Fibrinogen and the Neutrophil-Lymphocyte Ratio as a Predictor of Chemotherapy Response and Prognosis in Patients with Advanced Gastric Cancer. *Oncology.* 2016;90(4):186-92. (査読あり)
- [学会発表](計4件)
1. Yoshiaki Kita, Seiji Naganuma, Hiroshi Nakagawa, Hiroshi Okumura, Yasuto Uchikado, Takaaki Arigami, Ken Sasaki, Kiyonori Tanoue, Itaru Omoto, Kenji Baba, Shinichiro Mori, Yoshikazu Uenosono, Yuko Mataka, Yuko Kijima, Kosei Maemura, Shoji Natsugoe: Morphological evaluation of Nuclear Notch1 expression in esophageal squamous cell carcinoma (Poster Presentation). 15th International Society for Disease of Esophagus. Singapore, 19-21 September 2016.
  2. 喜多芳昭, 長沼誠二, 内門泰斗, 尾本至, 佐々木健, 奥村浩, 前村公成, 大脇哲洋, 中川裕, 夏越祥次: 食道扁平上皮癌における Notch 1 の発現解析 (ポスター). 第70回日本食道学会学術集会 横浜市, 7月6日, 2016.
  3. 喜多芳昭, 盛真一郎, 馬場研二, 内門泰

斗，有上貴明，上之園芳一，又木雄弘，喜島祐子，前村公成，夏越祥次：当科における大腸癌 RAS 遺伝子測定と化学療法 の現状（ポスター）. 第 20 回日本がん分子標的治療学会学術集会，別府市，5 月 30 日，2016

4. Yoshiaki Kita, Seiji Naganuma, Hiroshi Nakagawa, Hiroshi Okumura, Yasuto Uchikado, Takaaki Arigami, Ken Sasaki, Kiyonori Tanoue, Itaru Omoto, Kenji Baba, Shinichiro Mori, Yoshikazu Uenosono, Yuko Mataka, Yuko Kijima, Kosei Maemura, Shoji Natsugoe: Nuclear Notch1 expression is associated with treatment failure and predicts prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma (Poster presentation) . Society of Surgical Oncology 2016 Annual Cancer Symposium, Boston, MA, 2-5 Mar. 2016

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

喜多 芳昭 (KITA YOSHIAKI)  
鹿児島大学・医歯学域附属病院・助教  
研究者番号：30570692

##### (2) 研究分担者

盛 真一郎 (MORISHINICHIRO)  
鹿児島大学・医歯学域附属病院・助教  
研究者番号：00620519

奥村 浩 (OKUMURA HIROSHI)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員  
研究者番号：90325803

内門 泰斗 (UCHIKADO YASUTO)  
鹿児島大学・医歯学域附属病院・特任准教授  
研究者番号：30464465

夏越 祥次 (NATSUGOE SHOJI)  
鹿児島大学・医歯学域医学系・教授  
研究者番号：70237577

石神 純也 (ISHIGAMI SUMIYA)  
鹿児島大学病院・医歯学総合研究科・客員研究員  
研究者番号：90325803