

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19904

研究課題名(和文) 癌幹細胞特異的に発現するクロライドイオン輸送体を標的とした食道癌新規治療法の開発

研究課題名(英文) Expression and activity of ion transport-related molecules in cancer stem cells of esophageal cancer.

研究代表者

石本 武史 (Ishimoto, Takeshi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00724494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：食道扁平上皮癌細胞株(TE8)から、ALDH1高発現細胞をsorting後、sphere形成能を有する細胞のみを分離し、癌幹細胞を培養した。作製した癌幹細胞と親株での遺伝子発現をmicroarrayを用いた網羅的解析により比較検討したところ、TRPV2、CLCN2、ATP1B2等の重要なイオン輸送体が癌幹細胞で高発現していることを見出した。その中から、Ca²⁺透過性陽イオンチャネルであるTRPV2チャンネルに着目し、その選択的阻害剤であるトラニラストが、癌幹細胞特異的に、増殖抑制効果を示すことを明らかにした。また、親株をトラニラストで処理したところ、ALDH1発現が抑制されることを確認した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to investigate the expression and activity of ion transport-related molecules in cancer stem cells (CSCs) of esophageal cancer (EC). Cells with high ALDH1 activity were isolated from TE8 cells via cell sorter, and then, CSCs were generated using the sphere formation assay. The gene expression profiles of CSCs were examined using a microarray analysis. CSCs upregulated ALDH1 expression, were resistant to Cisplatin and had re-differentiation ability. The microarray analysis revealed 50 gene expressions of membrane proteins were changed in CSCs, including transient receptor potential vanilloid 2 (TRPV2). The specific TRPV2 inhibitor, Trilast, was more cytotoxic at lower concentration in CSCs than in non-CSCs, and effectively inhibited sphere formation. Trilast significantly decreased the cell population with high ALDH1 expression in TE8 cells. These suggested TRPV2 is involved in the maintenance of CSCs, and Trilast becomes a promising targeted therapeutic agent.

研究分野：消化器外科学

キーワード：食道癌

1. 研究開始当初の背景

近年、イオン輸送体が細胞生命機能維持に重要な役割をもつことが報告され、癌の治療標的としても注目されている。我々はこれまで、消化器癌細胞株において、細胞内クロライドイオン(Cl⁻)が細胞周期制御シグナルを伝播するセカンドメッセンジャーとして機能することを明らかにした。一方、近年、癌組織は幹細胞能力と癌形成能をあわせ持つ少数の癌幹細胞により形成・維持されることが解明され、癌の増大・転移・再発への関与が報告されている。癌幹細胞は通常の抗癌剤に抵抗性を示すことが多く、癌幹細胞を標的とした治療開発は癌克服のための最重要課題である。しかしながら、癌幹細胞におけるイオン輸送体発現解析や、癌幹細胞内イオン濃度制御を治療に応用する試みは全くなされていない。

2. 研究の目的

本研究では、"癌幹細胞特異的に発現したイオン輸送体の制御により、食道癌幹細胞の増殖が抑制できる"という実験仮説の検証を行う。その結果から、癌幹細胞内イオン濃度変化を介した新たな腫瘍形成メカニズムを解明し、イオン輸送体阻害薬や RNA 干渉を用いた、食道癌に対する斬新な治療概念を構築することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト食道癌組織における癌幹細胞マーカーの発現解析

ヒト食道癌組織における癌幹細胞マーカー(ALDH1, CD44)発現レベルを解析する。手術臨床標本のパラフィンブロックを用い、ALDH1, CD44 に対する免疫染色により発現レベルを解析すると共に、組織型、壁深達度、脈管侵襲、リンパ節転移度等の種々の臨床病理学的因子や、予後・再発形式との相関を解析する。

(2) ヒト食道癌細胞株を用いた癌幹細胞の作製

ヒト食道癌細胞株 (TE8) を ALDEFLUOR kit (STEMCELL Technologies Inc) で処理し、ALDH 高発現細胞を cell sorter SH800 (SONY) を用いて sorting する。その後、非接着プレート、無血清培地に EGF, b-FGF, B27 supplement を加えて培養し、sphere 形成能を有する細胞のみを分離する。

(3) 癌幹細胞特異的に発現するイオン輸送体の同定

作製した癌幹細胞と親株での遺伝子発現を microarray を用いた網羅的解析により比較検討する。その結果より、癌幹細胞特異的に発現するイオン輸送体を同定する。その中から特に、有用な因子にターゲットを絞り解析を進める。

(4) 癌幹細胞特異的に発現するイオン輸送体を標的とした、増殖抑制効果の検証

癌幹細胞特異的に発現するイオン輸送体

阻害剤や siRNA を用いることによる増殖抑制効果・sphere 形成能抑制効果を親株・癌幹細胞株で比較検討し、選択的効果の有無を検証すると共に、そのメカニズムの解明を試みる。

4. 研究成果

まず、ヒト食道癌組織 (40 例) における癌幹細胞マーカー (ALDH1, CD44) 発現レベルを解析し、各々の高発現が食道癌における予後不良因子となることを解明した。

続いて食道扁平上皮癌細胞株 (TE8) から、ALDH 高発現細胞を sorting 後、sphere 形成能を有する細胞のみを分離し、癌幹細胞を培養した (図 1, 2)。癌幹細胞における ALDH1 蛋白・mRNA の高発現をウェスタンブロット法・定量的 RT-PCR で確認した (図 3, 4)。また、抽出された癌幹細胞における抗癌剤耐性 (CDDP)、再分化能も確認した (図 5, 6)。

次に、作製した癌幹細胞と親株での遺伝子発現を microarray を用いた網羅的解析により比較検討した。NANOG, ALDH1A1, SOX2, POU5F1 などの癌幹細胞マーカーが癌幹細胞株で上昇していることを確認した。また、癌幹細胞株において 50 種もの膜蛋白関連遺伝子が高発現となっていることを確認した。その中に、TRPV2, CLCN2, ATP1B2 等の重要なイオン輸送体が含まれていることを見出した。TRPV2, CLCN2, ATP1B2 の癌幹細胞における高発現については、定量的 RT-PCR で再確認した (図 7)。

癌幹細胞に高発現するイオン輸送体の中から、Ca²⁺透過性陽イオンチャネルである TRPV2 チャネルに着目し、さらに解析を進めた。TRPV2 の選択的阻害剤であるトラニラストが、癌幹細胞特異的に、増殖抑制効果・sphere 形成能抑制効果を示すことを明らかにした (図 8, 9)。また、親株をトラニラストで処理したところ、ALDH 発現が抑制されることを確認した (図 10)。

また、他の食道扁平上皮癌細胞株 (KYSE790) からも癌幹細胞を抽出培養し、同様の現象を確認すると共に、ヒト食道癌組織において TRPV2 の免疫染色を行い、様々な染色パターンが存在することを確認した。

更に、TE8 細胞において siRNA を導入し、TRPV2 をノックダウンしたところ、細胞増殖抑制効果を認めた。さらに、トラニラストの TRPV2 選択的抑制効果を検証するため、Ca²⁺ chemical-specific dye である Fluo-8 を用い、細胞内 Ca²⁺ 濃度の変化を解析した。Carbachol によって誘導される細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇が、トラニラストや TRPV2 siRNA により抑制されることを示した。

以上より、食道癌幹細胞特異的に発現するイオン輸送体が多く存在することを見出し、イオン輸送体阻害薬や RNA 干渉を用いた選択的制御により、癌幹細胞特異的な治療への応用が可能であることを証明した。

これらの研究成果は英文論文にまとめて発表した (J Gastroenterol. 2017)。

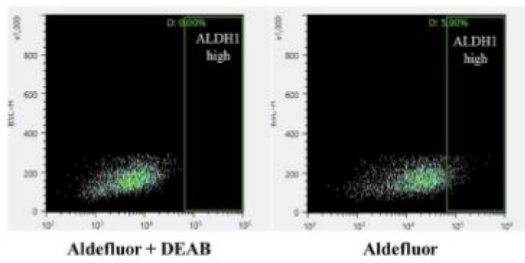


図1 ALDH1高発現細胞の sorting (TE8細胞)

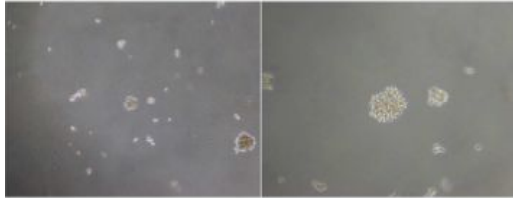


図2 Sphere形成能を有する細胞を分離

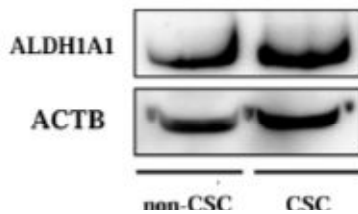


図3 癌幹細胞におけるALDH1蛋白発現

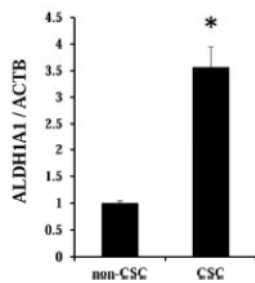


図4 癌幹細胞におけるALDH1 mRNA発現

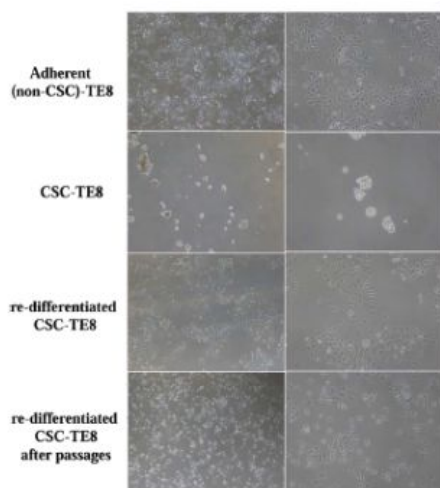


図5 癌幹細胞の再分化能

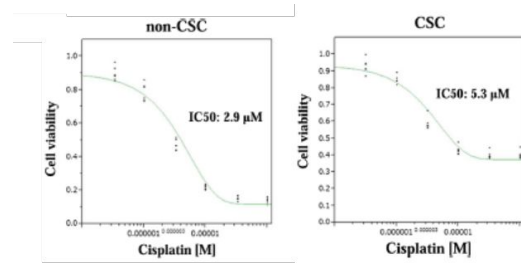


図6 癌幹細胞のCDDP耐性

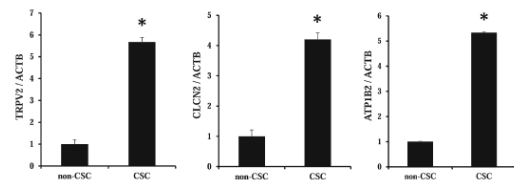


図7 癌幹細胞におけるイオン輸送体の高発現 (TRPV2, CLCN2, ATP1B2)

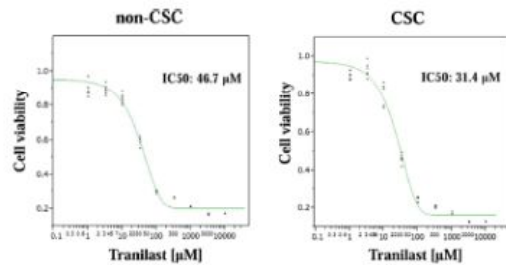


図8 癌幹細胞におけるTRPV2阻害剤 (トラニラスト)の感受性

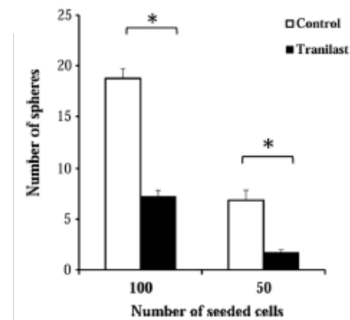


図9 トラニラストによるSphere形成抑制

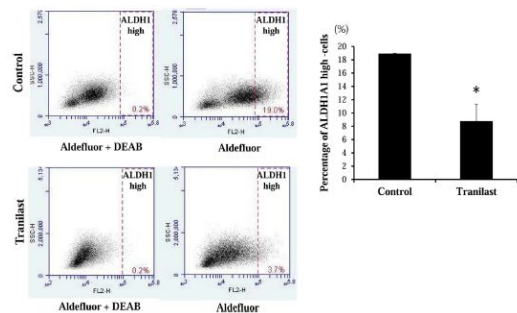


図10 トラニラスト処理後のALDH1発現

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 5 件)

- (1) Shiozaki A, Kudou M, Ichikawa D, Fujiwara H, Shimizu H, Ishimoto T, Arita T, Kosuga T, Konishi H, Komatsu S, Okamoto K, Marunaka Y, Otsuji E. Esophageal cancer stem cells are suppressed by tranilast, a TRPV2 channel inhibitor. *J Gastroenterol.* 2017 Apr 7. doi: 10.1007/s00535-017-1338-x. [Epub ahead of print] 査読有
- (2) Ochiai T, Ishii H, Toma A, Ishimoto T, Yamamoto Y, Morimura R, Ikoma H, Otsuji E. Modified high dorsal procedure for performing isolated anatomic total caudate lobectomy (with video). *World J Surg Oncol.* 2016;14:132. 査読有
- (3) 石本武史, 満田雅人, 本宮久之, 渡邊信之, 西田龍朗, 大澤るみ, 崔聡仁, 當麻敦史, 中村憲司, 菅沼泰, 落合登志哉, 白方秀二, 能見伸八郎, 大辻英吾. 直腸癌による成人腸重積症の 1 例. 癌と化学療法. 2015;42:2297-2299. 査読有
- (4) 落合登志哉, 満田雅人, 石本武史, 當麻敦史, 大辻英吾. 胆嚢癌に対する術後門脈屈曲に対し Expandable Metallic Stent が有効であった 1 例. 癌と化学療法. 2015;42:1737-1739. 査読有
- (5) 石本武史, 満田雅人, 本宮久之, 渡邊信之, 當麻敦史, 中村憲司, 落合登志哉, 大辻英吾. Parietex Composite(PCO) Mesh を用い腹腔鏡下に修復した Morgagni 孔ヘルニアの一例. 京都府立医科大学雑誌. 2015;124:297-303. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

- (1) 石本武史, 満田雅人, 本宮久之, 渡邊信之, 當麻敦史, 中村憲司, 落合登志哉, 大辻英吾. 直腸癌による腸重積の一例. 第 37 回癌局所療法研究会. 幕張メッセ国際会議場(千葉県千葉市); 2015.7.10
- (2) 落合登志哉, 満田雅人, 渡邊信之, 石本武史, 當麻敦史, 森村玲, 生駒久視, 大辻英吾. 術後門脈屈曲に対し門脈内ステントが有効であった一例. 第 37 回癌局所療法研究会. 幕張メッセ国際会議場(千葉県千葉市); 2015.7.10
- (3) 石本武史, 西田龍朗, 大澤るみ, 崔聡仁, 當麻敦史, 菅沼泰, 落合登志哉, 能見伸八郎. 腹腔鏡下に修復した Morgagni 孔ヘルニアの一例. 第 28 回日本内視鏡外科学会総会. 大阪国際会議場(大阪府大阪市); 2015.12.10-12
- (4) 石本武史, 菅沼泰, 能見伸八郎. 腹腔鏡用鉗子と大腸内視鏡を併用し経肛門的に

- 摘出した直腸内異物の一例. 第 70 回日本大腸肛門病学会学術総会. 名古屋観光ホテル(愛知県名古屋市); 2015.11.13-14
- (5) 落合登志哉, 石本武史, 當麻敦史, 森村玲, 生駒久視, 大辻英吾. 脾液瘻ハイリスク患者に対する脾頭十二指腸切除脾胃吻合再建. 第 27 回日本肝胆膵外科学会学術集会. ホテルグランパシフィック LE DAIBA(東京都港区); 2015.6.11-13

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石本 武史 (ISHIMOTO TAKESHI)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号: 724494