

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10623

研究課題名(和文) hypoxiaをtriggerとする上皮間葉転換におけるCD133の役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of CD133 in hypoxia triggered epithelial-mesenchymal transition

研究代表者

大谷 研介 (Otani, Kensuke)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・大腸肛門外科・常勤医師

研究者番号：20757497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌幹細胞マーカーの1つとされるCD133が低酸素状態(hypoxia)における癌の上皮間葉転換(EMT)に関与しているという仮説から、hypoxiaをtriggerとするEMTにおけるCD133の役割の解明を目的として本研究を行った。ヒト大腸癌細胞株において低酸素下でCD133陽性細胞では陰性細胞と比較して特に強いEMTが誘導されること、遊走能が大きく亢進していること、転移に大きな役割を果たすIntegrin蛋白の発現が異なることを確認した。臨床検体での検討で、大腸癌原発巣に比べて肝転移巣ではCD133陽性細胞の割合が高くなっていること、逆に腹膜播種巣では低くなっていることを見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果により、CD133がhypoxiaにおける癌のEMTに関与し、その結果癌の浸潤や転移に促進的に働いているのではないかとわれわれの仮説の正当性が高まった。このことより、癌における低酸素状態という環境、大腸癌幹細胞におけるEMT誘導といった現象が今後の創薬や治療介入のターゲットとして有望であることを示した。また、元は同じ大腸癌でも癌細胞が肝転移巣のような腫瘤を形成した場合と腹膜播種のような微小な結節として存在する場合とでは、酸素状態も含めて癌細胞を取り巻く環境が異なるため発現する性質も異なっていることを示しており、それに対応した治療法の開発が必要であることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：From the hypothesis that CD133, which is one of the colorectal cancer stem cell markers, is involved in epithelial-mesenchymal transition (EMT) of cancer under hypoxia, we aimed to elucidate the role of CD133 in hypoxia triggered EMT. We confirmed that, under hypoxia, EMT is induced particularly strong in CD133(+) human colon cancer cells compared with CD133(-) cells, and migration is greatly promoted in CD133(+) cells. The expression of integrin protein that plays a major role in metastasis is different in these cells. And we also found that the proportion of CD133-positive cells is higher in liver metastases than in primary colon cancer lesions. On the other hand, the proportion of CD133-positive cells is lower in peritoneal metastases than in primary colon cancer lesions.

研究分野：大腸癌

キーワード：上皮間葉転換 CD133 hypoxia integrin 大腸癌

## 1 . 研究開始当初の背景

上皮間葉転換(Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT)は上皮細胞が間葉系細胞の形質を獲得し、遊走能や浸潤能の亢進を得る現象を指す。もともとは発生の過程で見いだされた現象であるが、癌の浸潤や転移の過程においてもこのEMTが大きく関与していることが明らかになり近年注目されつつある。固形癌においては癌の辺縁部に比べ中心部の酸素分圧が低く低酸素状態(hypoxia)にあることが知られるが、我々は特に大腸癌細胞に着目し、このhypoxiaが大腸癌細胞のEMT形質獲得の1つのtriggerとなることをこれまで見だし報告してきた(J Surg Res. 2013 Jun 1;182(1):75-84.)。すなわち低酸素状態にて長期培養した大腸癌細胞は接着因子であるIntegrinや細胞骨格であるVimentinの発現が著明に亢進するのみならず、ケモカインレセプターの1つであるCXCR4の産生が増強することを見いだした。Integrinは癌細胞の接着能・浸潤能に関与し、またCXCR4は癌細胞のhomingに関与するケモカインレセプターであり、大腸癌細胞の転移形成に大きな役割を果たすことが知られる。これらのことから固形癌の中心部ではHypoxiaをtriggerとし癌細胞のEMTが惹起され結果的に癌の浸潤・転移が引き起こされると考えられる。

その一方で我々はCD133に着目してきた。CD133は大腸癌における癌幹細胞のマーカーの候補の1つとして考えられているが、大腸癌におけるその詳細な役割はいまだ十分に解明されておらず、受容体なのか接着分子なのかさえ明かになっていない。我々はこれまでCD133(+ )大腸癌がCD133(- )大腸癌への分化能を有すること、CD133(- )大腸癌に比べintegrinの発現が高く、抗癌剤に対する感受性が高いことを報告してきた(J Surg Res. 2012 Jun 15;175(2):278-88.)。また一般的には癌幹細胞は抗癌剤に対し耐性を有するが、我々の結果ではCD133(+ )細胞はむしろ抗癌剤に対する感受性が高く、CD133に単なる癌幹細胞としてのマーカー以上の意義があるのではないかと考えてきた。CD133(+ )大腸癌のこの「Integrinの発現が高く、別の形質への分化能を有する」という性質が先に述べたEMTにおける大腸癌のそれと類似することから、hypoxiaにおけるEMTにCD133が関与しているのではないかという着想に至った。これまでのpreliminaryな検討ではCD133(- )細胞はhypoxiaにおいてEMT様の形質変化をほとんど惹起しないのに対し、CD133(+ )細胞では線維芽細胞様の形態変化を来したことから、CD133の発現の有無がhypoxiaにおけるEMTの発生に大きく関与しているのではないかと考えられた。

我々はこれまで原発巣と肝転移巣におけるCD133の発現を評価し、CD133が高発現の腫瘍では肝に選択的に再発し、逆に肝外での再発が少ないことを近年見いだした(Ann Surg Oncol. 2016 Jun;23(6):1916-23.)。このことから、CD133は臨床においても肝に選択的に転移を形成する何らかのメカニズムにも関与していると考えている。

## 2 . 研究の目的

hypoxiaをtriggerとするEMTにおけるCD133の役割の解明。

## 3 . 研究の方法

1) In vitroでの検討：ヒト大腸癌培養細胞株（HT-29・LoVo・DLD-1・SW480・Colo201等）を磁気細胞分離法（MACS）を用いCD133(+)及び(-)細胞に分離する。これを低酸素環境下で培養し、48・72・120・168時間後に以下の検討を行う。

細胞増殖能の検討：MTS assay・Colony forming assayを用いてCD133(+)(-)細胞間の増殖能の違いを検討する。

Cell cycleの検討：Cell cycle detection kitによるFlow-cytometryを用いたCell cycle Assayを行い、CD133陽陰性の細胞周期への影響を検討する。

EMT関連蛋白の発現の検討：細胞表面抗原（CD133, Integrin 1-6, CXCR4, E-cadherin）や細胞内骨格（Vimentin）の発現をhypoxiaによる経時的変化をFlow-cytometryを用いて評価する。

蛍光顕微鏡を用いたVimentinとCD133の局在性の評価：CD133が転移・遊走のTriggerとなっているのであれば、間質系細胞の重要な細胞骨格であるVimentinと細胞内の局在に類似性がある可能性があり、これを蛍光顕微鏡を用いて検討する。

接着能・遊走能の検討：低酸素下にAdhesion assay及びポイデンチャンバーを用いた遊走能のAssayを行い、CD133発現の有無がこれらの能力にどう関与するかを検討する。またBlocking抗体によるCD133の阻害が接着能・浸潤能に及ぼす変化についても検討を行う。

siRNAやBlocking抗体によるCD133の発現・機能の抑制：CD133の発現をsiRNAを用いて抑制することで得られたCD133(+)(-)細胞間の相違がどう変化するかを検討する。またCD133が何らかの受容体や接着因子として作用しているのではないかとの報告もあり、CD133の細胞外ドメインに対するいくつかの抗体を用いてそのLigandに対するBlockingを行い、細胞の接着能・遊走能にどのような変化があるかを検討する。

2) In vivoでの検討：マウス肝転移モデル（マウス大腸癌細胞Colon26をマウスBALB/cの脾臓に注入し、肝転移を形成させる）及び肺転移モデル（マウス大腸癌細胞をマウス尾静脈より注入し、肝転移を形成させる）を用いて、CD133の陽陰性と転移形成能の違いにつき検討を行う。方法についてはこれまでに報告した方法をもとに施行する（Cancer Sci. 2011 Jul;102(7):1257-63., Cancer Sci. 2004 Jan;95(1):85-90.）。

肝・肺の重量の評価

投与した大腸癌細胞のCD133陽陰性とマウスの生存率の相関の検討

免疫染色によるCD133の測定：転移巣におけるCD133の免疫染色を行い、転移形成能とCD133発現との相関につき検討する。：

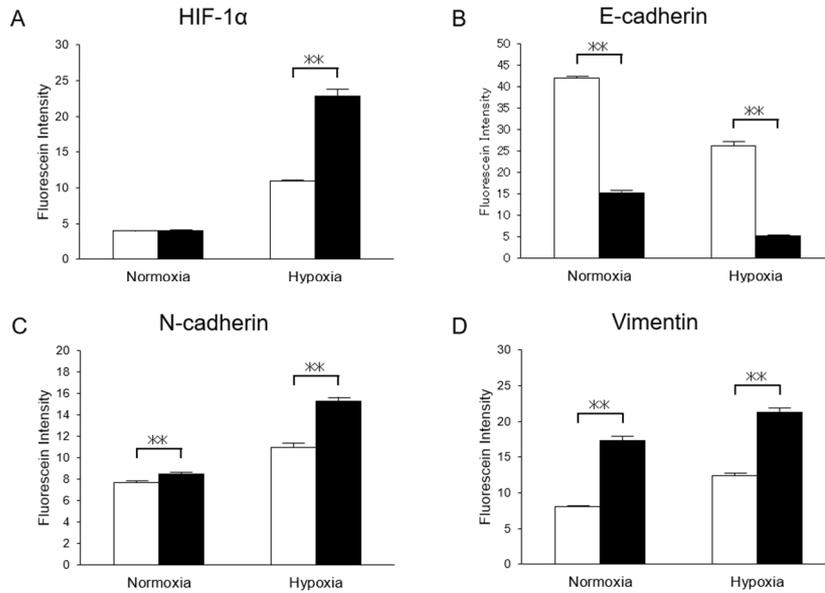
臨床研究による基礎実験ではCD133陽性の大腸癌は肝に特異的な強い親和性を有した。肝転移・肺転移モデルの結果を比較することで、CD133の関与する遠隔臓器転移の臓器特異性がないかについても検討を行う。

## 4. 研究成果

CD133陽性細胞は陰性細胞に比べ、HypoxiaによるHIF-1・N-cadherin・Vimentinの誘導が強く、逆にE-cadherinの発現は強く抑制された。またその結果CD133陽性細胞

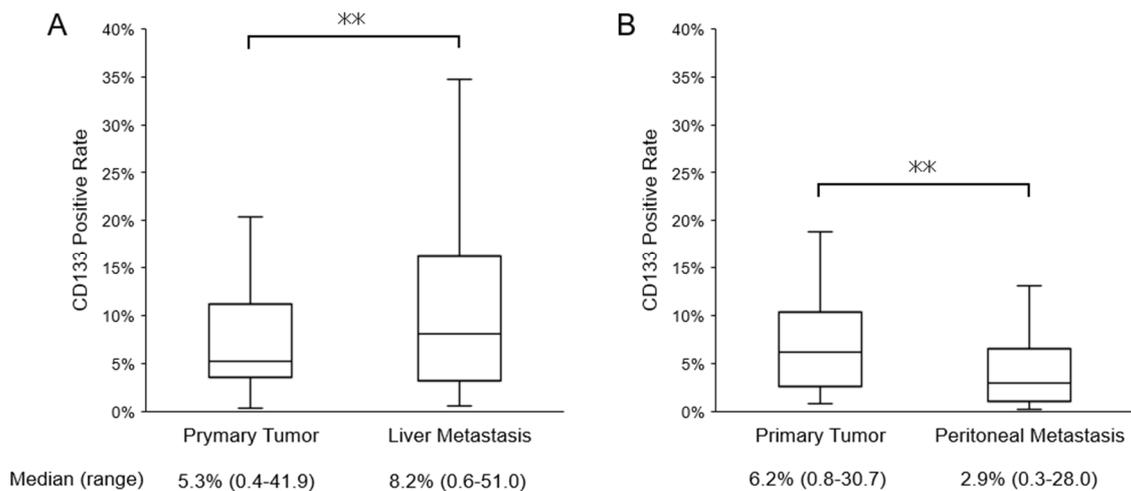
は Hypoxia で強い遊走能を獲得した。

Fig. 2



一方 Integrin は CD133 陰性細胞の方が発現が強く、Hypoxia によってさらに発現が増強した。

臨床検体を用い原発巣と肝転移巣、原発巣と播種巣の CD133 の発現を比較した所、肝転移は原発より CD133 陽性細胞の割合が高く、逆に播種巣は CD133 の発現が低かった。肝転移の形成は主に EMT が関与するため、CD133 陽性細胞の方が肝転移を来しやすく、逆に腹膜播種は integrin の関与が大きいいため CD133 陰性細胞の方が播種巣を形成しやすかったものと考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	野澤 宏彰  (Nozawa Hiroaki)  (80529173)	東京大学・医学部附属病院・准教授   (12601)	
研究分担者	川合 一茂  (Kawai Kazushige)  (80571942)	東京大学・医学部附属病院・講師   (12601)	
研究分担者	畑 啓介  (Hata Keisuke)  (60526755)	東京大学・医学部附属病院・特任講師   (12601)	
研究分担者	渡邊 聡明  (Watanabe Toshiaki)  (80210920)	東京大学・医学部附属病院・教授   (12601)	
研究分担者	石原 聡一郎  (Ishihara Soichiro)  (00376443)	東京大学・医学部附属病院・教授   (12601)	