

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006-2008

課題番号：18591436

研究課題名（和文） 癌幹細胞を標的としたヒト乳癌治療法の開発

研究課題名（英文） Development of the new treatment that targeted mammary cancer stem cell

研究代表者

小田 高司(ODA KOJI)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：30311715

研究成果の概要：

- (1) cancer stem cell marker を用いた癌組織における免疫組織学的染色の結果、Cancer stem cell および progenitor cell を多く発現した腫瘍は治療抵抗性で予後不良であることが示された。
- (2) 再発進行癌患者の末梢血液中に浮遊する癌細胞を採取し、cancer stem cell marker が陽性である癌細胞が同定された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,900,000	0	1,900,000
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科臨床医学・外科学一般

キーワード：cancer stem cell, circulating tumor cell

## 1. 研究開始当初の背景

cancer stem cell を標的とした癌治療の必要性

乳癌は均一の癌細胞から成っているものではなく、形態学的に同一であっても、個々の癌細胞でホルモンレセプターの発現の有無があるように、遺伝子発現は少しずつ異なっている。造血系腫瘍で注目されている癌幹細胞

( cancer stem cell ) (Nature 367:645, 1994) の考えが乳癌にも導入されつつある (proc Natl Acad Sci USA 100:3983, 2003)。Stem cell から癌化した Cancer stem cell は腫瘍中で自己複製によって増殖しつつ、分化によって異なる2種類以上の細胞をつくりだし、癌細胞群の多様性が生じる。癌は cancer stem cell から分化した腫瘍細胞の集合体で、

個々の癌細胞により、その能力が異な  
 っていると考えられる。

Cancer stem cell は、抗癌剤に対し薬剤耐性を獲得しているといわれている (Nature, 414:105, 2001)。進行、再発癌に対する現在の抗癌剤治療では、いったん腫瘍は減少するが、cancer stem cell が生き残り、薬剤耐性を持った腫瘍細胞が再増殖し治癒することはない。癌を治癒させるためには、cancer stem cell を死滅させることが、必要であり、この分野の研究が今後普及すると思われる。

また、米国で行われた転移性乳癌を対象とした多施設共同試験で、末梢血中癌細胞 Circulating Tumor Cell (CTC) 数の予後予測因子および治療効果の予測因子としての有用性が示唆された (New England Journal of Medicine, 351 (8) p781-791, 2004)。米国では Cell Search システムは“転移性乳癌患者の PFS 及び OS 予測”を適用として FDA (Food and Drug Administration) の認可が得られ、既に臨床診断に使用されており、本研究でも CTC と cancer stem cell の関連を検討する。

## 2. 研究の目的

- (1) 癌組織、末梢血液中の cancer stem cell を同定する。
- (2) cancer stem cell を標的とした癌治療法を開発する。

## 3. 研究の方法

- (1) 癌組織 (乳癌、胃癌、大腸癌、膵癌、胆嚢癌) における cancer stem cell を免疫染色 (p63, OCT4等) にて同定した。

### 免疫組織化学染色

抗原賦活法 ; microwave 5min. ×3 times in 10mM citrate buffer (pH 6.0)

増感法 ; Tyramide Signal Amplification method (TSA)

抗体

anti-p63 monoclonal antibody (clone4A4, NEO MARKERS)

Oct4 (Anti-Oct-3/4 monoclonal antibody (C-10, SANTACRUZ)

CD133 (AC133, monoclonal antibody) (Miltenyi Biotec)

(2) CTC の測定 ; EpCAM 抗体を用いた Cell Search システム (VERIDEX), Miltenyi Biotec, Carcinoma Cell エンリッチメント・検出キットを用い末梢血 10ml 中の CTC 数を

測定した

## 4. 研究成果

- (1) RT-PCRにて乳癌細胞株および乳癌組織で  $\Delta P63$  遺伝子の発現を確認した (図1)。
- (2) 癌組織内の cancer stem cell を検索するため、免疫組織染色法にて cancer stem cell marker (p63, OCT4, CD133) を用い検討を行った。P63蛋白は乳腺筋上皮細胞、扁平上皮化生した上皮に発現がみられ、 $\alpha$ -SMA抗体、Keratin14Ab-1抗体を用い、乳癌組織における筋上皮細胞および扁平上皮化生を除外し検討を行った (図2)。66症例中21例で癌細胞の核に p63蛋白の高発現をみとめ、p63高発現群 (5%以上) では低発現群に比べ予後が不良であった (図3)。大腸癌 (図5)、胃癌、胆嚢癌 (図6)、膵癌でも同様の結果であった。

図1

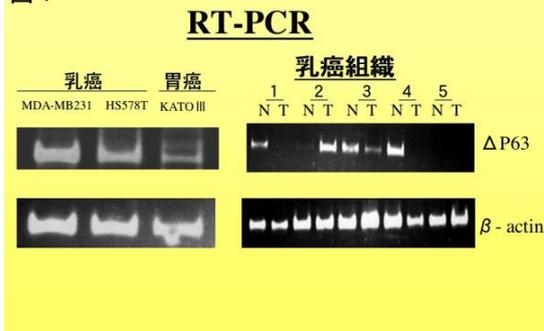
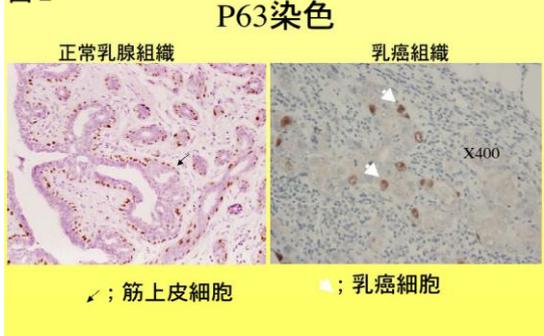


図2



- (3) OCT4高発現群 (膵癌、大腸癌) では低発現群に比べ予後が不良であった (図5)。

図 3

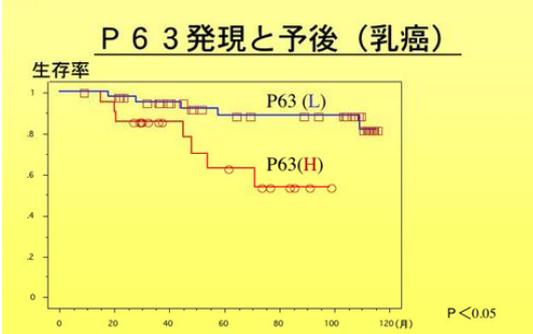


図 4

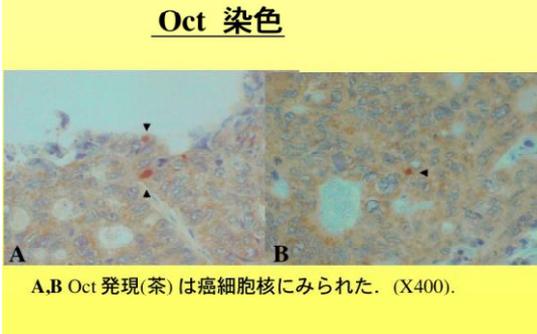


図 5

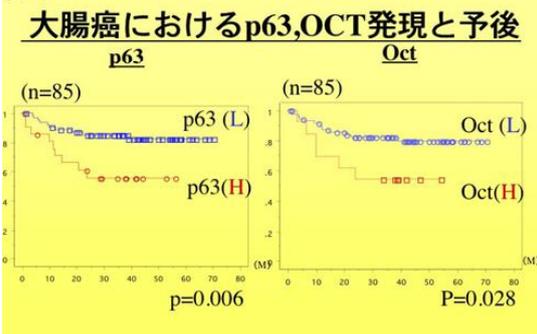
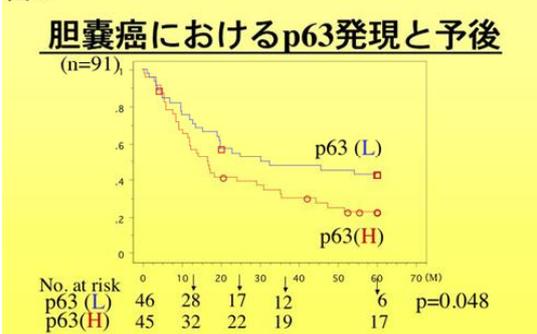


図 6



①Cell Searchシステムを用いCTC数を再発進行癌の5症例でカウントしたが、4例でCTC数は0-1個、1例で5個と低値であった。こ

の5症例は再発後セカンドライン以降の化療が行われる前に検査をおこなっており、予測したCTC数との解離が大きくこのシステムの使用を中止した。

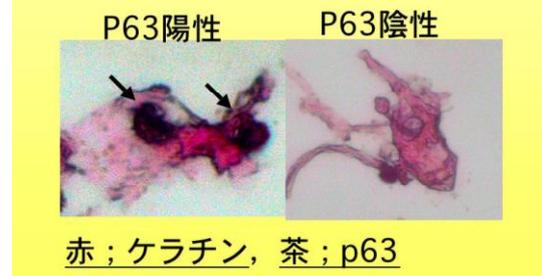
②抗サイトケラチン抗体を用いた Carcinoma Cell エンリッチメント・検出キット

再発進行癌の6症例でこのシステムを用い末梢血液 10ml 中の CTC 数を測定した。CTC 数は0, 7, 10, 12, 14, 23 個であった。

CTC でサイトケラチン抗体と p 6 3 抗体抗を用いた二重染色を行い CTC に p 6 3 の発現している癌細胞を認めた(図 7)。

図 7

**CTCの二重染色(ケラチン, p63)**



抗癌剤療効果、予後についてさらに症例を増やしつつ今後検討してゆく予定である。

p 6 3 遺伝子は細胞の分化に関与しており、分化の盛んな扁平上皮や腺組織の基底部に発現がみられるが、癌細胞においても、その発現が報告され、乳癌で p 6 3 蛋白が高発現している癌は予後が不良であるとの報告(The Journal of Clinical Investigation 117:1370-, 2007) があり、本研究の結果と一致した。

CD133 染色では、文献報告(B. J. cancer. 99, 1285-1289, 2008) 同様に管腔を形成した癌細胞の管腔側細胞膜に染色を認めたが、stem cell とするには陽性細胞数が多く、非特異的な染色の結果とも考えられ、今後の検討が必要であった。

CTC 数の抗癌剤療効果としての指標、および予後については、症例数も少なく、観察期間も短

いため、今後症例数を増やしつつ検討を行ってゆく予定である。

CTC が予後因子として機能するためには、CTC 中に抗癌剤治療に抵抗性の cancer stem cell が存在すると推測されるが、未だ報告は認めていない。本研究において CTC 中に stem cell marker を発現した癌細胞が同定できた。

CTC と cancer stem cell との関連について、最初の報告である。

## 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)

[学会発表] (計 3 件)

(1) Yamamoto T, Yamamoto H, Oda K, Hayakawa N. : IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF OCT4 AND P63 PROTEIN, A PARAMETER OF MALIGNANT POTENTIAL IN COLORECTAL CARCINOMAS (16<sup>th</sup>. United European Gastroenterology Week, 2008. 10. 21 Vienna, Austria)

(2) 山本竜義, 他; **膵癌における Oct-3/4, p63 蛋白発現についての検討**. (第 107 回日本外科学会定期学術集会, 2007, 4, 12 大阪)

(3) Tatsuyoshi Yamamoto, Koji Oda, Hideo Yamamoto, Naokazu Hayakawa, Masato Nagino, Yuji Nimura ; Expression of p63 is a useful indicator of poor prognosis after resection in adenocarcinomas of the gallbladder and pancreas. ( 7<sup>th</sup> World congress of IHPBA. Edinburgh, Scotland, 2006. 9. 6)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小田 高司 (ODA KOJI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：30311715

### (2) 研究分担者

榑野 正人 (NAGINO MASATO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：20237564

浜口 道成 (HAMAGUCHI MICHINARI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：90135351