

平成 21 年 4 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592295

研究課題名（和文）

癌幹細胞が上皮間充織転換に及ぼす影響に関する研究

研究課題名（英文）The effect of cancer stem cell on Epithelial to Mesenchymal Transition.

研究代表者

柳 文修（YANAGI YOSHINOBU）

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：50284071

研究成果の概要：

平成 19 年度：各種ヒト由来癌樹立細胞株を用いて、癌幹細胞同定に先立って、増殖能、転移能、および癌幹細胞マーカー候補の CD133 発現を検討した。さらに「上皮間充織転換」関連因子、上皮マーカーとして Rho ファミリー（Cdc42、Rac1）、間充織マーカーとして Vimentin、Fibronectin の発現状況を検討し、それらによる転移ならびに血管新生への影響を検討した。

平成 20 年度：「癌幹細胞」「上皮間充織転換」規定因子発現に基づく抗腫瘍効果予測法の検討。ヒト癌幹細胞（CELPROGEN 社；2008 年発売）購入を予定していたが、製品に不備があり、購入を見合わせた。平成 20 年は癌細胞株にカドヘリン遺伝子 siRNA を導入し、上皮-間充織転換を強制的に起こさせる試みを行った。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：実験腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

近年、白血病を始めとした癌において、「幹細胞に似た挙動をとる少数の癌細胞」の存在が確認されつつある。この幹細胞の特性をもつ癌細胞を「癌幹細胞」と呼び、癌の定着に必要不可欠だとする説が注目されている。癌幹細胞は、自己複製能、多

分化能、無制限に分裂可能な能力をあわせもつため、癌の再発や転移の際に重要な役割を持つ。癌の根治には癌幹細胞を標的とした治療法の開発が必要だと考えられている。しかし、現時点において癌幹細胞研究は未開分野であり、充実性腫瘍における

存在を示す証拠は極めて少ない。一方、「上皮間充織転換」は、器官形成時、上皮細胞が間葉系細胞へ、また間葉系細胞が上皮細胞へと、分化する機構である。近年、この「上皮間充織転換」による再分化が、癌細胞の転移の際にも生じることが明らかとなってきた。癌転移の際の異常な上皮間充織転換を制御できれば、その転移をくい止める事が可能となるが、その制御機構は明らかではない。

2. 研究の目的

申請者は、癌転移の際に「癌幹細胞」が「上皮間充織転換」を制御するのではないかと考え、癌幹細胞が上皮間充織転換に及ぼす影響の検討を計画した。様々な癌腫における癌幹細胞の同定、及びその表現型を明らかにし、上皮間充織転換を制御できれば、癌転移をくい止める事が可能となるかもしれない。

当該研究により、『癌幹細胞』をターゲットに『上皮間充織転換』を阻害する癌転移阻害療法への応用展開を図りたい。

3. 研究の方法

(1) 平成 19 年度：各種ヒト由来癌樹立細胞株を用いて、「癌幹細胞」の同定。

①FACSscan による細胞分画の単離 (辻極)

②MTT assay による各細胞分画の腫瘍増殖能の検討 (*in vitro*: 柳)

③FACSscan による各細胞分画の分化能の検討 (*in vitro*: 辻極)

④マウスモデルによる各細胞分画の腫瘍形成能の検討 (*in vivo*: 辻極)

⑤網羅的なタンパク質間相互作用解析・プロトアレイ (柳)

(2) 平成 20 年度：「癌幹細胞」と「上皮間充織転換」の関係の解明。

①「癌幹細胞」における「上皮間充織転換」

関連タンパク群の機能解析

②遺伝子発現ベクター導入法による過剰発現系 (辻極)

③SiRNA 導入による発現抑制系 (柳)

1:増殖能比較検討 (*in vitro*, *in vivo*)

2:転移能比較検討 (*in vitro*, *in vivo*)

3:FACSscan による分化能の検討 (*in vitro*)

4. 研究成果

(1)MTT assay による口腔癌細胞株の腫瘍増殖能の検討

口腔癌細胞株 5 種を培養, MTT assay を用いて倍加時間を計測, 増殖能を検討。それぞれの増殖能を比較検討した。

(2)Boyden chamber による各細胞の転移能の検討

cell invasion assay kit (CHM ECM550) を用いて各細胞での転移能を比較検討。転移能の高いものと低いものに分けることが出来、転移能の高い株をマウスモデルに用いることとした。転移能の高いものと低いもので、それらの CD133、Rho ファミリー (Cdc42、Rac1)、Vimentin、Fibronectin 発現の多寡を western blotting にて比較した。結果、Cdc42 の発現は細胞株間で様々なレベルを示し、それらの結果は今後の「上皮間充織転換」研究に用いる予定である。

(3)Matrigel による各細胞の血管新生能の検討

各細胞株を Matrigel (BioRad 社) に混入し、C57/BL マウスの背部皮下に接種、2 週間後屠殺、ゲルを回収し、各細胞株の血管新生能を免疫染色にて比較検討した。現在も条件を検討中である。

(4)免疫染色による癌幹細胞マーカー候補の CD133 発現の検討

口腔癌細胞株 4 種を chamber slide 上で培養し、CD133 発現を検討した。結果、他部位に

おける癌腫同様、数%程度の細胞に CD133 発現を認めたため、癌幹細胞マーカー候補として CD133 を指標にすることにした。

(5)網羅的な PCR アレイ

” RT2 profiler PCR array” (Superarray 社製) の転移経路に関するアレイ、幹細胞に関するアレイを用いて、転移ならびに幹細胞に関与する遺伝子について RNA 発現比較した。転移能に差がある細胞株にて MMP 遺伝子群の発現変化を認めることが出来た。今後 MMP について癌幹細胞マーカー候補として可能性を検討する。

(6) siRNA 導入による「上皮-間充織転換」強制的に起こさせる試み

cadherin を特異的に発現抑制させるよう設計した siRNA を、上皮由来である口腔癌細胞株に導入し、上記の Rho ファミリー (Cdc42、Rac1)、Vimentin、Fibronectin 発現を導入前後で比較した。Vimentin fibronectin 発現上昇、Rho ファミリー発現低下が見られたため、「上皮-間充織転換」様を示したと考えられた。現在、さらに条件を検討中である。

血管新生、癌浸潤に関連した研究成果を第 67 回日本癌学会総会(名古屋)にて報告した。一連の研究成果は、Progress in Oral Cancer Research Recent Progress in Molecular Targets and Oncology Therapeutics (pp. 14-58) Authors / Editors: Jun Murakami et al. Nova Science Publishers, Inc (400 Oser Ave. Suite 1600 Hauppauge NY 11788-3619) 2008 年ならびに、Bacterial DNA, DNA polymerase and DNA helicases. Authors / Editors: Jun Murakami et al. Nova Science Publishers, Inc. 2009 年 (in press) に英文著作として発刊された。

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 5 件)

① Secreted frizzled related protein (sFRP)-2 inhibits bone formation and promotes cell proliferation in ameloblastoma.

Sathi GA, Inoue M, Harada H, Rodriguez AP, Tamamura R, Tsujigiwa H, Borkosky SS, Gunduz M, Nagatsuka H.

Oral Oncol. 2009 Apr 8. [Epub ahead of print] 査読有り

② Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging for estimating tumor proliferation and microvessel density of oral squamous cell carcinomas.

Unetsubo T, Konouchi H, Yanagi Y, Murakami J, Fujii M, Matsuzaki H, Hisatomi M, Nagatsuka H, Asaumi JI.

Oral Oncol. 2008 Nov 20. [Epub ahead of print] 査読有り

③ Heparanase and vascular endothelial growth factor expression in the progression of oral mucosal melanoma.

Rivera RS, Nagatsuka H, Siar CH, Gunduz M, Tsujigiwa H, Han PP, Katase N, Tamamura R, Ng KH, Naomoto Y, Nakajima M, Nagai N.

Oncol Rep. 2008 Mar;19(3):657-61. 査読有り

④ Microsatellite instability and clinicopathological features in esophageal squamous cell cancer.

Matsumoto Y, Nagasaka T, Kambara T, Hoshizima N, Murakami J, Sasamoto H, Hosokawa M, Naomoto Y, Isozaki H, Shimizu K, Tanaka N, Matsubara N.

Oncol Rep. 2007 Nov;18(5):1123-7. 査読有り

⑤ Depletion of O6-methylguanine-DNA methyltransferase by O6-benzylguanine enhances 5-FU cytotoxicity in colon and oral cancer cell lines.

Murakami J, Lee YJ, Kokeyuchi S, Tsujigiwa H, Asaumi J, Nagatsuka H, Fukui K, Kuroda M, Tanaka N, Matsubara N. Oncol Rep. 2007 Jun;17(6):1461-7. 査読有り

[学会発表] (計4件)

① Unetsubo T, Konouchi H, Yanagi Y, Murakami J, Matsuzaki H, Asaumi JI. Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging for estimating tumor proliferation and microvessel density of oral squamous cell carcinoma.

The 7th Asian Congress of Oral and Maxillo-Facial Radiology, The 13th Conference of Clinical Diagnostics of JSOMR. 2008.11.20-22. Nara, Japan

② J Murakami, J Asaumi

A novel benzylidene lactam compound, KNK437 inhibits the invasion and angiogenesis in oral cancer cell lines
第67回日本癌学会学術総会(日時:2008年10月28日~30日 場所:名古屋国際会議場)

③ 長尾 厚樹、松原 長秀、神原 健、能登原 憲司、笹本 博美、村上 純、内田 卓之、星島 直子、田中 紀章

大腸鋸齒状 polyp 及び腺管腺腫におけるメチル化、K-ras, B-raf 遺伝子、MSI の解析と比較

第 63 回日本消化器外科学会総会 (日時: 2008 年 7 月 17 日 場所: 北海道札幌市)

④ 村上純、柳文修、此内浩信、浅海淳一

口腔癌細胞株に対する新規抗癌剤 KNK437 による血管新生阻害と癌浸潤阻害作用について

NPO 法人日本歯科放射線学会第 5 回総会・第 49 回学術大会 2008.5.16-18. 愛知

[図書] (計2件)

① Authors: Jun Murakami, Jun-ichi Asaumi, Hidetsugu Tsujigiwa, Masao Yamada, Susumu Kokeyuchi, Hitoshi Nagatsuka, Tatsuo Yamamoto, You-Jin Lee
Nova Science Publishers, Inc
Bacterial DNA, DNA polymerase and DNA helicases
発表年: 2009 (in press) 英文著書

② Authors: Jun Murakami, Jun-ichi Asaumi, Hidetsugu Tsujigiwa, Hitoshi Nagatsuka, Masahiro Kuroda, You-Jin Lee and Susumu Kokeyuchi
Nova Science Publishers, Inc
Progress in Oral Cancer Research
発表年: 2008 (pp. 14-58) 英文著書

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳 文修 (YANAGI YOSHINOBU)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号: 50284071

(2) 研究分担者

辻極 秀次 (TSUJIGIWA HIDETUGU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 70335628

村上 純 (MURAKAMI JYUN)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 40362983

(2) 連携研究者

なし