

平成21年3月31日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791516

研究課題名（和文） 癌幹細胞の同定法の確立による新しい転移阻害予測法の開発

研究課題名（英文） The development of a novel screening method for cancer metastasis.

研究代表者

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

研究成果の概要：

癌幹細胞を多数有する、もしくは幹細胞的機能に富むと考えられる高転移腫瘍を樹立、それらの細胞株を対象に、網羅的なPCRアレイにて、転移経路ならびに血管新生経路に関与する遺伝子についてRNA発現比較した。いくつかの遺伝子群の発現差を認め、転移能、腫瘍形成能にとって重要な因子を絞り込むことが出来た。今後は、それらの候補遺伝子を指標に癌幹細胞のスクリーニングを展開していきたいと考えている。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	210,000	2,910,000

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

従来、癌は単一の表現型の細胞より構成されており、細胞一つからでも自律的に増殖すると考えられてきた。その一方で、近年、各癌細胞が全て同じ性質を有するのではなく、『一部の癌細胞のみが幹細胞様の性質を持ち、腫瘍形成能、転移能および分化能を支配する』という説が注目されている。このような癌細胞＝「癌幹細胞」は、全癌細胞中、数%にすぎないとされ、現在、乳癌および脳腫瘍において、その同定に成功しているのみであ

る。

そこで申請者は、ヒト癌腫においても、癌幹細胞の同定、及びその表現型を明らかにし、制御できれば、癌転移をくい止める事が可能となるのではないかと考えた。そこで今回、様々な癌種における癌幹細胞の同定とその表現型の検討を計画した。当該研究により、「癌幹細胞」をターゲットとする癌転移阻害効果スクリーニング法の確立を目指した。

2. 研究の目的

特に近年、Clarke らのグループにより NOD/SCID マウスモデルによる癌幹細胞同定法が開発された。その結果、癌幹細胞が、癌転移過程において重要であることが明らかとなってきた。癌幹細胞を標的とする臨床応用は未だなされていないが、ヒト癌細胞株を用いた当該研究をモデル実験として、癌幹細胞の効率的な同定及び、同細胞における癌転移関連遺伝子群（特に CD44、CD24 を中心に Rho ファミリー、Cdc42、Rac1、Paraxis）や血管新生関連遺伝子群（VEGF 等）の発現状況を解明出来れば、これに基づく癌腫毎の癌の転移能や治療予後予測が可能となり、臨床応用への新たな一歩として世界初の報告となる。

3. 研究の方法

今回の研究は、各種ヒト由来癌樹立細胞株を用いて、

1. 癌幹細胞の検索。(平成 19 年度)

2. 癌幹細胞における癌転移関連遺伝子の発現状況を同定する。(平成 19 年度)

以上より、癌幹細胞を癌転移マーカーから効率的に検出同定し、それらの発現に基づいた、癌幹細胞をターゲットにした癌転移阻害効果を予測するスクリーニングテストの確立を目指す。(平成 20 年度)

4. 研究成果

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、単離を予定していたが、ヒト癌幹細胞(CELPROGEN 社;2008 年発売)を購入することとし、平成 19 年は転移に関する実験系を確立した。

平成 20 年度：「癌幹細胞」規定因子発現に基づく抗腫瘍効果予測法の検討。

各種ヒト由来癌樹立細胞株を用いて、「癌幹細胞」の同定、単離後、本年度はヒト癌幹細胞(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。前年に引き続き、平成 20 年は転移ならびに血管新生に関する実験を行った。

(1) 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。

(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。

(3) マウスモデルにおける、高転移細胞株の選択 (in vivo)

転移実験に先立ってマウスモデルを確立すべく、in vivo における各細胞株 (in vitro 高転移株) が有する腫瘍形成能を検討した。各細胞株を C3H/HeJ Jcl マウス、BALB/C ノードマウスに腫瘍を移植、継代し、腫瘍形成能および転移能の高い腫瘍を選択することとなった。結果、細胞株間で著名な差を認め、マウスモデルへ応用可能な株を選択できた (sq-1979 株など)。転移能の高い細胞株に由来する腫瘍から RNA 抽出、固定後、免疫染色した。

(4) 網羅的な PCR アレイ

上記②および③で得た結果をもとに、” RT2 profiler PCR array” (Superarray 社製) の転移経路に関するアレイ (SPA PAMM028A) を用いて、転移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いくつかの遺伝子群の発現差を認めた。

また、同一の細胞株においても高転移細胞由来腫瘍と低転移細胞由来腫瘍 (in vivo ; マウスモデルより摘出) においても発現比較し、いくつかの遺伝子群の発現差を認めた。今後は、それらの候補遺伝子を指標に癌幹細胞のスクリーニングを展開していきたいと考えている。

前年度今年度に行った血管新生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 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 8 件)

① Periodontitis-induced lipid peroxidation in rat descending aorta is involved in the initiation of atherosclerosis.

Ekuni D, Tomofuji T, Sanbe T, Irie K, Azuma T, Maruyama T, Tamaki N, Murakami J, Koeguchi S, Yamamoto T.

J Periodontal Res. 2009 Feb 6. [Epub ahead of print] 査読有り

② Effects of vitamin C intake on gingival oxidative stress in rat periodontitis.

Tomofuji T, Ekuni D, Sanbe T, Irie K, Azuma T, Maruyama T, Tamaki N, Murakami J, Koeguchi S, Yamamoto T.

Free Radic Biol Med. 2009 Jan 15;46(2):163-8. 査読有り

③ A spindle cell carcinoma presenting with osseous metaplasia in the gingiva: a case report with immunohistochemical analysis.

Katase N, Tamamura R, Gunduz M, Murakami J, Asaumi J, Tsukamoto G, Sasaki A, Nagatsuka H.

Head Face Med. 2008 Dec 1;4:28. 査読有り

④ 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

⑤ Recombinant human bone morphogenetic protein-2/atelocollagen composite as a new material for ossicular reconstruction.

Takeuchi A, Tsujigiwa H, Murakami J, Kawasaki A, Takeda Y, Fukushima K, Rodriguez AP, Nagatsuka H, Yamada M, Nishizaki K.

J Biomed Mater Res A. 2008 Apr 10. [Epub ahead of print] 査読有り

⑥ 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

⑦Hisatomi M, Asaumi J, Yanagi Y, Unetsubo T, Maki Y, Murakami J, Matsuzaki H, Honda Y, Konouchi H.

Diagnostic value of dynamic contrast-enhanced MRI in the salivary gland tumors.

Oral Oncol. 2007 Oct;43(9):940-7. 査読有り

⑧Murakami J, Lee YJ, Koikeguchi S, Tsujigiwa H, Asaumi J, Nagatsuka H, Fukui K, Kuroda M, Tanaka N, Matsubara N.

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

Oncol Rep. 2007 Jun;17(6):1461-7. 査読有り

[学会発表] (計4件)

①T. TOMOFUJI, T. SANBE, N. TAMAKI, D. EKUNI, K. KASUYAMA, M. UMAKOSHI, K. IRIE, T. AZUMA, J. MURAKAMI, S. KOKEGUCHI, T. YAMAMOTO and M. MORITA

Effects of Obesity on Oxidative Stress in Rat Gingiva

The 56th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (November 29-30, 2008, Japan)

②J. 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
大腸鋸歯状 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

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
日本歯科放射線学会第49回・総会・学術大会
(日時:2008年5月16日~18日 場所:名古屋国際会議場)

[図書] (計1件)

①Authors: Jun Murakami, Jun-ichi Asaumi, Hidetsugu Tsujigiwa, Hitoshi Nagatsuka, Masahiro Kuroda, You-Jin Lee and Susumu Koikeguchi

Nova Science Publishers, Inc

Progress in Oral Cancer Research

Recent Progress in Molecular Targets and Oncology Therapeutics

発表年:2008 (pp. 14-58) 英文著書

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(1)研究代表者

なし

(3)連携研究者

なし