

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591567

研究課題名(和文) 胃癌腹膜転移と制癌剤感受性における癌幹細胞の役割

研究課題名(英文) Role of cancer cell stemness in the development of peritoneal metastasis and drug resistance

研究代表者

小寺 泰弘 (YASUHIRO KODERA)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：10345879

研究成果の概要(和文)：癌幹細胞マーカーの発現を胃癌の臨床検体で検討し、特に腹膜転移との関連を調査した。これらのうち L1 については、有意な予後因子であることを突き止めた。細胞株レベルでは、L1 は p-ERK の活性化を介して細胞の増殖や遊走に影響を及ぼしており、siRNA 法による knockout では L1 とともに DYRK1A が低下していた。一方、各種幹細胞マーカー発現細胞が特段に腹膜転移にかかわるとの知見は得られず、今後は抗癌剤の腹腔内への移行性など、他の要因を検討する必要がある。

研究成果の概要(英文)：Expression of various candidate stem cell markers was evaluated using clinical specimens from gastric cancer patients. Through this approach, role of stem cells in the formation of peritoneal metastasis was assessed. The expression of one of the markers, L1, was found to be a significant prognosticator. Furthermore, L1 was found to enhance cell proliferation and motility through activation of p-ERK, and several genes including DYRK1A were co-down-regulated by siRNA-mediated inhibition of the L1 expression. On the other hand, analysis of stem cell markers in the clinical specimens did not support the notion that stem cells had a particular role in the formation of peritoneal metastasis, and intractability of peritoneal metastasis may be attributed to other factors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：癌幹細胞、腹膜転移、L1、増殖能、遊走能

## 1. 研究開始当初の背景

近年、癌幹細胞(cancer stem cell)の概念が注目され、転移・再発、tumor dormancy、抗癌剤耐性など、癌細胞のもつ特異な生物学的特性のメカニズムのいくつかを説明する論拠となるものと期待されている。現在、造

血器腫瘍や乳癌のみならず、大腸癌や膵癌などの消化器癌でも癌幹細胞の候補マーカーが同定され、その存在が示されつつある。しかし、固形癌においては、現段階で幹細胞とみなされるために必要な全ての要素を満たす純粋な細胞は単離されておらず、その存在意義や役割についてもまだ不明な点も多い。

殊に胃癌においては、本研究計画立案の段階では癌幹細胞の候補マーカーは同定されていなかった。

一方、胃癌でもっとも多い再発形式は腹膜転移再発であり、腹腔内に存在する遊離癌細胞がその原因とされる。腹腔内洗浄細胞診で検出されるわずかな量の細胞が転移再発につながり、制癌剤の効果も低いことから、腹膜転移には癌幹細胞が関与している可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

胃癌において細胞株、腹腔内遊離癌細胞、および外科切除標本で癌幹細胞の存在を確認し、その腹膜転移における役割と、薬剤耐性への関与についての知見を得ることを本研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 胃癌臨床検体、腹腔洗浄液 sample における幹細胞マーカーの発現状況の検討

胃癌において癌幹細胞が同定されたわけではなく、そのマーカーの候補として絶対的なものも報告されていない。したがって、他の固形癌で幹細胞とされている CD133, L1-CAM(L1), OCT3/4, NANOG, SOX2, LIN28 などの発現状況を調査した。

### (2) 胃癌切除標本からの細胞培養と、幹細胞マーカーを有する side population の分離

外科切除標本から癌組織を採取し、細切、洗浄し、培養を試みた。

### (3) 漿膜浸潤陽性胃癌切除標本における L1 発現と予後、腹膜転移との相関

以後は、(1)の成果の中で予後に関連しており有用と思われた L1 (glioma の幹細胞マーカーである)について、検討を加えた。免疫染色で深達度 T3 に限った胃癌原発巣と、肝転移、腹膜転移組織における L1 の発現局在を調査した。

### (4) 胃癌細胞株を用いた siRNA による L1 の発現抑制実験と網羅的遺伝子解析

さまざまな胃癌細胞株で L1 の mRNA、蛋白レベルでの発現を定量し、L1 が強発現している細胞株で siRNA 法によりその発現を抑制 (L1 抑制株) した。L1 の発現と相関する他の遺伝子を同定するために、L1 抑制株と親株の間でマイクロアレイ解析を行った。

### (5) L1 の細胞増殖、遊走に与える影響

親株と L1 抑制株で、親株と抑制株を 6 ウェルプレートに  $5 \times 10^5$  ずつ蒔き、day1~4 に細胞を回収し、その数をカウントした。遊

走能の比較は migration assay (プレートに細胞を蒔き、 $200 \mu\text{l}$  チップで線を引き、両端から細胞が寄ってくる様子を経時的に観察し、線を引いた時を 100%として、グラフ化する)で行った。過去の報告によるとこれらの現象は p-ERK を介して起こることが示されている。このため、L1 を抑制することによって p-ERK の発現が低下するかを Western blotting 法で確認した。

### (6) L1 発現と胃癌癌幹細胞マーカー (CD44) との関連

L1 発現による細胞の増殖は p-ERK を介して起こること、p-ERK 発現下において L1 を遺伝子導入すると CD44 の発現が強まると報告されており、L1 と胃癌癌幹細胞マーカーの一つとされつつある CD44 の関連が示唆されたので、これについても検討した。親株と L1 抑制株で FACS 解析を行い、CD44 発現の発現を調査した。

## 4. 研究成果

### (1) 胃癌臨床検体、腹腔洗浄液 sample における幹細胞マーカーの発現状況の検討

胃癌臨床検体 51 例から RNA を抽出し、RT-PCR 法で L1 の発現を定量した。GAPDH との比で表現した L1 発現が一定のカットオフ値をこえた 15 例の予後は他の症例より有意に不良であり、多変量解析では腹腔内洗浄細胞診陽性ととも独立した予後因子であった。しかし、L1 の発現と腹膜転移の間には有意な相関を認めなかった。また、腹腔洗浄液における L1 の発現は、予後に影響なく、腹膜転移の予知因子にもならなかった。以上より、原発巣内の L1 発現の予後因子としての意義が示されたのは予想外の成果であったが、その腹膜転移の過程における役割については明らかにならなかった。

その他、胃癌 18 検体の癌組織、および腹腔内洗浄液由来細胞における CD133, OCT3/4, NANOG, SOX2, LIN2 の発現を RT-PCR 法で調査した。洗浄細胞診陽性例の原発巣で NANOG が、洗浄液で SOX2, CD133 が高い傾向があったが、原発巣と洗浄液で共通して高値を示すマーカーはなかった。

### (2) 胃癌切除標本からの細胞培養と、幹細胞マーカーを有する side population の分離

胃癌 16 検体、(追加して、培養がより容易と考えられた大腸癌 15 検体)で外科切除癌組織からの癌細胞の培養を試みたが、感染 (n=12), 増殖不良・繊維芽細胞の増殖 (n=9) などで、大部分の試みがうまくいかなかった。現在までに、胃癌 2 検体、大腸癌 3 検体からの細胞が一定の回数継代が可能であったが、カラムを用いての、その後 in vivo の実

験に使用可能な side cell population の分離には成功していない。

### (3) 漿膜浸潤陽性胃癌切除標本における L1 発現と予後、腹膜転移との相関

L1 と腹膜転移との相関をさらに追及するために、漿膜浸潤陽性(T4a)胃癌 78 例の切除標本を用い、免疫染色により L1 の発現強度を調査した。そして、T4a 胃癌に限った検討でも癌部の染色性が高い症例は予後不良であることを突き止めた(図1)。一方、大腸癌では染色陽性の症例全例において腫瘍先進部でも選択的に染色されていたが、胃癌では腫瘍先進部が染色される症例は少なかった(6 例)。しかし、こうした症例の予後は不良であった。ただし、ここでも、腹膜転移・再発、腹腔内遊離癌細胞の検出状況と L1 発現の相関は認めず、腹膜転移巣ではほとんど染色されなかった。

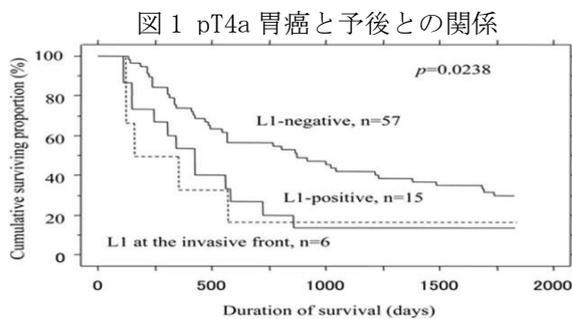
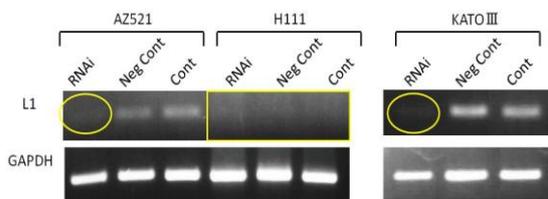


図1 pT4a 胃癌と予後との関係

### (4) 胃癌細胞株を用いた siRNA と網羅的遺伝子解析

さまざまな胃癌細胞株で L1 の mRNA、蛋白レベルでの発現を定量し、このうち、L1 が強発現している細胞株 KATOIII で siRNA 法によりその発現を抑制した。L1 抑制株は、RT-PCR、Western blotting 法により mRNA、蛋白レベルで L1 発現が抑制されていることを確認した(図2)。同時に siRNA 法による経時的な抑制効果を検討したところ、siRNA 処理された KATOIII は処理後 2, 3 日目をピークに 4 日目まで抑制されていた。

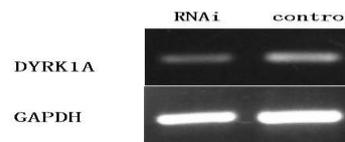
図2 L1 の発現と RNAi による抑制の確認



さらに、親株と L1 抑制株の間のさまざまな遺伝子発現の変化についてマイクロアレイにより網羅的に解析した。この結果、約 40000 遺伝子のうち 50 遺伝子が L1 抑制株で

4 倍以上に強発現し、20 遺伝子が 1 / 4 以下に抑制されていた。このうち DYRK1A (the dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1A) は L1 抑制株でその発現が 1 / 8 以下に抑制されていた。この発現低下は、RT-PCR 法でも確認した(図3)。DYRK1A は、DYRK family の 1 つであり、細胞増殖、細胞分裂、神経細胞への分化など、種々の過程を制御する働きがあるとされ、また、p53 を介してアポトーシスを調節する働きがあるという報告がみられる。今後本研究とは別にこの分子の機能を追求する予定である。

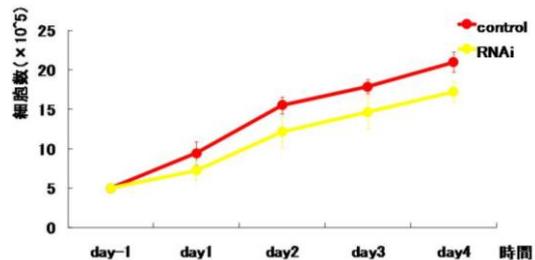
図3 DYRK1A の発現抑制



### (5) L1 の細胞増殖、遊走に与える影響

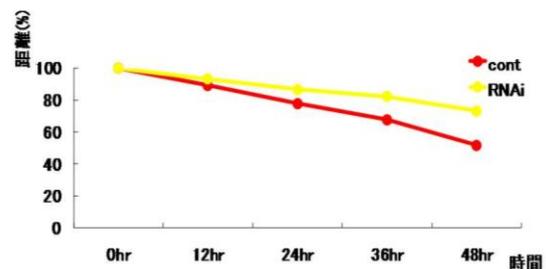
親株と L1 抑制株で増殖能(図4)、遊走能(図5)を比較した。

図4 L1 発現と増殖能の比較



L1 の発現を抑制することにより、細胞の増殖は抑制された。

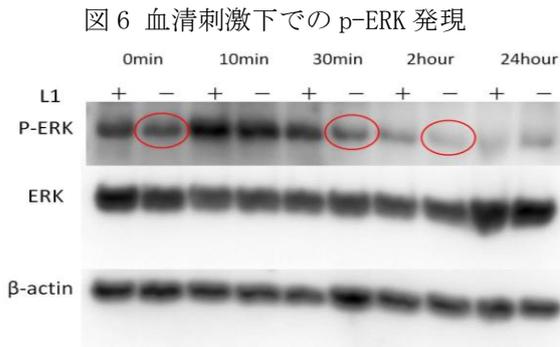
図5 L1 発現と遊走能の比較



また、L1 の発現を抑制することにより、遊走能も抑制された。

親株と L1 抑制株で Western blotting を行い、p-ERK の発現を確認したところ、L1 を抑制することによって、p-ERK が低下することが判明した。さらに、血清刺激を行い、p-ERK pathway を活性化させた状態でその発現の違いを確認したところ、total ERK に変化は見られなかったのに対して、p-ERK が明らかに

減弱していることがわかった(図6)。



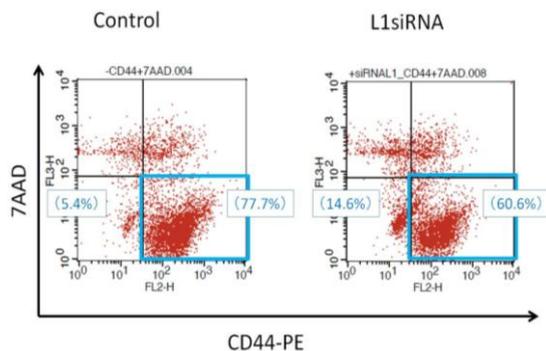
また、細胞増殖を司る回路のひとつとして Akt pathway があげられるが、KATOIII, AZ521 いずれの培養細胞株でも L1 を抑制することによる p-Akt の発現の変化は認めなかった。以上より、L1 による細胞増殖や遊走機能の促進は、過去に報告されている他癌種と同様に、p-ERK を介して起こっていることがわかった。

#### (6) L1 発現と胃癌癌幹細胞マーカー (CD44) との関連

L1 抑制株においては、本研究を実施中に他の研究グループから胃癌幹細胞マーカーの有力候補と報告された CD44 の発現も抑えられていることを、flow cytometry で確認した(図7)。

#### (7) 考察

micrometastasis の定義を満たさない程度の少数の細胞がリンパ節に遺残しても予後には影響がないとされるが、腹腔内の場合には高率に腹膜転移再発につながる。このことから、腹腔内に播種する細胞には幹細胞の性格を持つものがある(そのような細胞が原発巣



を離れ、腹腔内に播種する)との仮説をたてて研究を実施したが、この仮説は今回は実証されなかった。腹膜転移が起きやすいことは microenvironment に帰する問題かもしれない(腹腔内がリンパ節よりも癌の生存・増殖に適している)。抗癌剤治療が効きにくいのは、癌の性質(幹細胞が多量に含まれる)よ

りも、薬剤の移行に問題があるのかもしれない。こう考えると、腹腔内投与等 drug delivery の工夫と免疫学的機徐をもつ薬剤の使用で腹膜転移例の予後の改善が期待できる可能性がある。現在高度医療評価制度を利用して実施している抗癌剤腹腔内投与の研究において、追い風となる結果と受け止められる。

一方、L1 という glioma の幹細胞マーカーが胃癌に発現し、高発現例、腫瘍先進部における発現例の予後は不良であること、ERK のリン酸化を介して細胞の運動能、増殖能にかかわる他、他の stem cell marker の発現にも影響を及ぼすことを見出した。この分子については、今後さらなる検討が必要で、他癌種における報告を見る限り、胃癌の薬物療法における分子標的として有望な可能性も示唆された。

#### 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1件)

Y. Kodera, H. Nakanishi, S. Ito, K. Misawa, Y. Ito, G. Nakayama, M. Koike, M. Fujiwara, Y. Yamamura, A. Nakao  
Expression of L1 Cell Adhesion Molecule Is a Significant Prognostic Factor in pT3-stage Gastric Cancer  
Anticancer Research、査読有、29、2009、4033-4040

[学会発表] (計3件)

① T. Ito, Y. Kodera, C. Tanaka, N. Ohashi, G. Nakayama, M. Koike, M. Fujiwara, H. Nakanishi, A. Nakao  
Role of L1 cell adhesion molecule in gastric carcinoma  
2011 ASCO Gastrointestinal Cancers Symposium (2011.1.20-22 サンフランシスコ)

② 神野敏美, 小寺泰弘, 藤原道隆, 小池聖彦, 中山吾郎, 中尾昭公  
胃癌患者における予後因子としての L1CAM 発現と遺伝子発現の変化について  
第110回日本外科学会(2010.4.10名古屋)

③ 神野敏美, 小寺泰弘, 藤原道隆, 小池聖彦, 中尾昭公  
胃癌患者における短期的予後のマーカーとしての L1CAM 発現について  
第68回日本癌学会(2009.10.2横浜)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小寺 泰弘 (YASUHIRO KODERA)

名古屋大学大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：10345879

(2)研究分担者

中尾 昭公 (AKIMASA NAKAO)

名古屋大学大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70167542

(3)連携研究者

中西 速夫 (HAYAO NAKANISHI)

愛知県がんセンター腫瘍病理学・室長

研究者番号：20207830