

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790969

研究課題名（和文） ヒト胃癌幹細胞の機能解析

研究課題名（英文） Characterization of side population cells in human gastric cancer

研究代表者

伊藤 亮（ITO RYO）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：40445218

研究成果の概要（和文）：

胃癌臨床検体より樹立された初代培養細胞（MK7313/MK8213/MK8515）及びXenograftからside population（SP）細胞が0.04-0.20%の頻度でSP細胞が検出された。このSP細胞についてin vivo造腫瘍能および抗癌剤（5FU, CDDP, PTX）を用いた薬剤抵抗性の検証を行った結果、MP細胞に比べSP細胞は薬剤抵抗性が高く、腫瘍形成能が高い傾向が認められ癌幹細胞様の特性を有していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Human gastric cancer (GC) primary culture cell (MK7313, MK8515, MK8213) were analyzed using flow cytometry for SP cell isolation, and all GC primary culture showed a distinct fraction of SP cells, ranging from 0.04 to 0.20%. We demonstrated stem cell-like characteristics of SP cells as a possible subpopulation with enriched CSCs, as indicated by ABC transporter gene expression (ABCC1 and ABCG2), chemo-resistance and tumorigenicity in vivo. These SP cells demonstrate higher tumorigenicity in vivo than does the overall cell population in the parent tissue. In conclusion, we demonstrate that solid tumor tissue such as human GC contains CSCs, with the existence of heterogeneity and distinct hierarchy in malignancy, suggesting the future possibility of a novel therapeutic tool targeting CSCs for overcoming this malignant disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
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：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：癌幹細胞、SP 細胞

1. 研究開始当初の背景

生体幹細胞は、自己複製により未分化性を保ったまま増殖し、多分化能により多岐に渡る細胞を産み出すとされ、各組織構築における細胞源と考えられる。幹細胞は造血幹細胞の発見に始まり、腫瘍細胞の中にも自己複製能、多分化能を有する癌幹細胞なるものが存在するのではないかという概念が提唱された。

皮膚、筋、乳腺などの組織において SP 細胞が幹細胞と類似した特性を示すことが報告され始めている。SP 細胞とは、蛍光色素 Hoechst33342 で染色し、フローサイトメトリーにより UV レーザーを照射することにより 450nm (Hoechst red) および 675nm (Hoechst blue) の 2 次元に展開される。SP 細胞は、蛍光強度の高い大部分の細胞分画である MP 細胞よりさらに蛍光強度の低い細胞分画に位置する少数細胞集団である。この SP 細胞は、その細胞表面に存在する膜蛋白である ABC transporter によって DNA 結合色素 Hoechst33342 を排出することができる。そして、ABC transporter の阻害剤である reserpine を加えるとことで、SP 分画は消失する。

近年、白血病細胞、乳癌、脳腫瘍などの悪性腫瘍においても、癌幹細胞 Cancer stem cells (CSCs) の存在が報告されている。さらに大腸がん、肝細胞癌などから分離された SP 細胞にも癌幹細胞様特性を持つことが報告されるようになってきており、癌幹細胞の分離・同定する手技の一つとして SP 細胞分離

法を用いる方法が注目されるようになってきた。

そこで、われわれは胃癌における癌幹細胞の同定を目的とし、ヒト胃癌細胞株を用いて、SP 細胞が癌幹細胞様特性を有するか否かを検証した。

フローサイトメトリー (FACS) を用いた SP 解析法により 5 種類のヒト胃癌細胞株 SP 細胞および MP 細胞の分離を行った。その結果、未分化型腺癌由来である MKN45 においても SP 比が高く検出された。さらに reserpine を添加することにより SP 分画が消失することも確認された。MKN45 を用いて FACS により分離した SP 細胞および MP 細胞をそれぞれ *in vitro* で培養したところ、SP 細胞からは再度 SP 細胞と MP 細胞の両方の細胞分画が生じたが、MP 細胞からは MP 細胞しか派生しなかった。増殖能は SP 細胞の方が高かった。

しかしながら、長期培養では、MP 細胞からも SP 細胞群を生じた。さらに、SP 細胞では無血清培地下で Sphere 形成と長期継代培養が可能であった。このことから SP 細胞が自己複製能様の特性を有することが示唆された。また、SP 細胞に対し脂肪分化誘導を行ったところ、オイルレッド O 染色性の脂肪滴形成が確認され、SP 細胞は癌細胞以外への細胞の分化能を保持することが明らかになった。SP 細胞および MP 細胞を NOG マウスに移植したところ、SP 細胞は MP 細胞に比べて造腫瘍能が高いことが示唆された。

以上より MKN45 より得られた SP 細胞は増殖能が高く、自己複製能様の性質、造腫瘍能をもち、癌幹細胞様特性を持つ可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、胃癌細胞株と同様にヒト胃癌臨床検体において、癌幹細胞様特性を持つか否か検証を行う。ヒト胃癌臨床検体より SP 細胞と MP 細胞を分離し、side population (SP)細胞について、癌幹細胞様特性を持つか検証する。また SP 解析だけではなく、CD133 などその他の細胞表面マーカーを用いても、癌幹細胞用特性を持つか解析および評価を行う。さらに自己複製や分化・増殖を制御する分子、蛋白、遺伝子の同定を目指す。

3. 研究の方法

- (1) FACS を用いた SP 解析
- (2) FACS を用いた癌幹細胞表面マーカー (CD133 など) 解析
- (3) ヒト胃癌臨床検体より得られた癌細胞より得た total RNA を用いた遺伝子・蛋白研究
- (4) 癌の浸潤、転移に関わる EMT(Epithelial-to-Mesenchymal Transition)能の解析
- (5) NOG マウスへの移植による造腫瘍能の解析
- (6) 種々の抗がん剤耐性評価とそのメカニズムの解析

4. 研究成果

幹細胞は、自己複製により未分化性を維持しつつ増殖を繰り返し、多分化能により組織再構築を担っている細胞源と考えられる。

現在までに、造血幹細胞をはじめ皮膚、

筋、乳腺などの組織における DNA 結合色素 Hoechst33342 の高排出能を有する細胞分画 side population(SP)細胞が幹細胞と類似した特性を示すことが報告されてきた。

われわれは、Hoechst33342 を用いてヒト胃癌臨床検体より樹立できた 3 種類の初代培養細胞 (MK7313/MK8213/MK8515) を用いてフローサイトメトリーにより SP 解析を行った。細胞におけ SP 細胞の割合は 0.04 ~ 0.20%であった。SP 細胞比と胃癌悪性度ならびに患者生存率との相関関係では有意なデータは得られなかった。

In vivo 造腫瘍能において、SP 細胞は、MP 細胞に比べ、高い腫瘍形成能を有している傾向が示唆された。また、薬剤感受性試験では、MP 細胞に比べ SP 細胞は、cisplatin(CDDP)、fluorouracil (5-FU) に対し感受性が低い傾向が示唆された。

更に、胃癌患者より入手した臨床検体を用いた腫瘍形成能の評価において、SP 細胞は MP 細胞に比べ高い腫瘍形成能を有する傾向が示唆された。

以上の結果から、SP 細胞分離により、胃癌細胞株および臨床検体に存在する癌幹細胞を含むと思われる細胞集団分離の可能性を示唆した。

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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

- ・発表者：福田和正
- ・発表タイトル：胃癌における Tumor-initiating cells (TICs) の分離・同定
- ・学会名：第 18 回日本がん転移学会
- ・発表年月日：2009 年 7 月 24 日

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

伊藤 亮 (ITO RYO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：40445218

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし