

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月14日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591720

研究課題名（和文）上皮間葉移行による抗癌剤耐性能獲得機構と骨髄幹細胞

研究課題名（英文）Mechanism of drug resistance by Epithelial-Mesenchymal Transition and bone marrow stem cell

研究代表者

堤 莊一（TSUTSUMI SOICHI）

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30323356

研究成果の概要（和文）：

抗癌剤耐性ヒト大腸癌細胞株を作成するために細胞株を5-FUに暴露し耐性株を樹立した。親株と比較して5-FU耐性株は、約40倍の濃度において耐性となった。親株と5-FU耐性株を比較したところ、形態学的な変化は認めず、細胞増殖能にも差異を認めなかった。MMP、E-カドヘリン、ビメンチンのタンパク発現に関して、5-FU耐性株と親株を比較したが差は認めなかった。

ヌードマウス移植モデルを用いて検討したが、腫瘍の増殖能、転移能において親株と5-FU耐性株に差は認めなかった。腫瘍内のSnail、Slug、Twist、MMP2、E-カドヘリン、ビメンチンを測定したが、マウス移植前の親株、5-FU耐性株と発現量に差は認めなかった。抗癌剤耐性と上皮間葉移行の明らかな関連はないと思われた。

研究成果の概要（英文）：

The epithelial to mesenchymal transition (EMT) is a molecular process through which an epithelial cell undergoes differentiation into a mesenchymal phenotype. The relationship between EMT and resistance to an anti-cancer drug in colorectal cancer remains unknown. In this study, we investigated the acquisition of EMT by 5-FU in colorectal cell lines. 5-FU resistant cell lines did not change into a mesenchymal phenotype. This study suggests that EMT phenotype may not play a significant role in anti-cancer agent resistance in colorectal cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	200,000	60,000	260,000
2010年度	200,000	60,000	260,000
2011年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	500,000	150,000	650,000

研究分野：消化器外科

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：上皮間葉移行、抗癌剤耐性、骨髄幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT; 上皮間葉移行) 上皮細胞が間葉系様細胞に形態変化する現象であり、発生における原腸陥入、神経提細胞の運動や器官形成過程に重要と言われている。また、EMTが運動能の亢進や細胞外基質の蓄積をもたらすことから、癌細胞の浸潤や線維化との関連も数多く報告されており、筆者も報告してきた (Clin Cancer Res. 10: 7775-7784, 2004. Tsutsumi et al.)。我々は、抗癌剤感受性試験を行う際に、癌細胞に5-FUやタキサン系の抗癌剤を暴露するが、耐性を獲得した癌細胞は紡錘型細胞様形態に変化することを確認した。このことから、抗癌剤耐性は癌細胞レベルのEMTによって獲得される可能性があると考えた。さらにその結果、耐性癌細胞は細胞運動能や浸潤能が誘導され悪性度を増すと考えられる。しかし、一度転移が成立すると癌細胞はMesenchymal-Epithelial Transition (MET; 間葉上皮移行) により上皮細胞の性格を取り戻し転移先で増殖するような可逆性を備えている。

現在、新規抗癌剤の開発は進歩しているが、抗癌剤耐性獲得癌は難治性で多くの課題が残されている。今回、EMT-METとの双方間移行のメカニズム、細胞ストレス耐性との関係、骨髄幹細胞動因という観点から研究をデザインした。

## 2. 研究の目的

Epithelial-Mesenchymal Transition と Mesenchymal-Epithelial Transitionとの双

方向に移行が存在するかを検討する。我々が開発したヌードマウス移植モデル (Cancer Lett. 169: 77-85, 2001. Tsutsumi et al.) を用いて直腸腫瘍と転移性肝腫瘍を作成する。このモデルを用いてEMTとMETとの双方に移行が存在するかを確認する。

抗癌剤治療により癌組織にEMTが誘導されるかを検討する。*In vitro*の実験では、癌細胞株を抗癌剤に暴露することによりEMTが誘導されることを確認している。今回は、消化管担癌マウスに対して抗癌剤治療を行い、マウスの癌にEMTが誘導されるかを検討する。

抗癌剤処理または放射線照射後の消化管には組織の線維化が生ずる。腫瘍のEMT誘導および組織の線維化は、骨髄細胞の関与があるかを検討する。

癌幹細胞という概念があるが、消化管癌の癌幹細胞が骨髄由来であるか、また腫瘍関連線維芽細胞が骨髄細胞由来であるかを検討する。

## 3. 研究の方法

抗癌剤耐性ヒト大腸癌細胞株 (SW480, HT29, HCT116) を作成した。これらの細胞では、E-カドヘリンの発現低下とSnailの発現上昇を確認している。これらの細胞を、我々が開発したヌードマウス移植モデルを用いて直腸に腫瘍を移植する。同時に、脾臓に移植し肝転移も作成する。腫瘍形成後に腫瘍を摘出し、EMTおよびMETの存在の有無を確認する。また、マイクロダイセクションを持ちいてRT-PCRにより、Snail、Slug、Twist、MMP2、E-カドヘリン、ビメンチンを測定する。APCminマウスを飼育し大腸癌発生マウスに

5-FU、塩酸イリノテカン、オキザリプラチン、タキソテール等の抗癌剤を投与するモデルを作成する。抗癌剤投与後に腫瘍を切除し、マイクロダイセクションを持ちいて RT-PCR により、Snail、Slug、Twist、MMP2、E-カドヘリン、ビメンチンを測定する。抗癌剤非投与群と投与群、原発巣と肝転移巣等を比較し EMT との関連を検討する。

#### 4. 研究成果

抗癌剤耐性ヒト大腸癌細胞株を作成するために SW480、HT29、HCT116 細胞株を 5-FU に暴露し耐性株を樹立した。親株と比較して 5-FU 耐性株は、約 40 倍の濃度において耐性となった。親株と 5-FU 耐性株を比較したところ、形態学的な変化は認めず、細胞増殖能にも差異を認めなかった。MMP、E-カドヘリン、ビメンチンのタンパク発現に関して、5-FU 耐性株と親株を比較したが差は認めなかった。

我々の開発したヌードマウス移植モデルを用いて直腸に腫瘍を移植したが、腫瘍の増殖能、転移能において親株と 5-FU 耐性株に差は認めなかった。また、脾臓転移モデルを用いても転移能に差は認めなかった。ヌードマウスへ移植した腫瘍の切除標本からマイクロダイセクションを持ちいて RT-PCR により、腫瘍内の Snail、Slug、Twist、MMP2、E-カドヘリン、ビメンチンを測定したが、マウス移植前の親株、5-FU 耐性株と発現量に差は認めなかった。HT29 細胞株を用いたヌードマウス脾臓転移モデルにおいて、肝転移巣から腫瘍組織を採取し HT29 転移株を樹立した。親株と比較したが、形態学的な変化、細胞増殖能、5-FU 耐性能に差異を認めなかった。

今回、5-FU 耐性株を作成し上皮間葉移行との関連について検討した。5-FU 耐性株と親株において、形態学的変化、細胞増殖能、転移能に差は認めなかった。また、上皮間葉移行

と関連があると報告されている因子 (Snail、Slug、Twist、MMP2、E-カドヘリン、ビメンチン) を測定したが、5-FU 耐性株と親株の間に発現量の差は認めなかった。以上の結果から、抗癌剤耐性と上皮間葉移行の明らかな関連はないと思われた。

#### 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 21 件)

1. Transient gene silencing of galectin-3 suppresses pancreatic cancer cell migration and invasion through degradation of  $\beta$ -catenin. Kobayashi T, Shimura T, Yajima T, Kubo N, Araki K, Tsutsumi S, Suzuki H, Kuwano H, Raz A. Int J Cancer. 査読有 2011 Jan 20. doi: 10.1002/ijc.25946
2. Transient silencing of galectin-3 expression promotes both in vitro and in vivo drug-induced apoptosis of human pancreatic carcinoma cells. Kobayashi T, Shimura T, Araki K, Tsutsumi S, Suzuki H, Kuwano H, Raz A. Clin Exp Metastasis. 査読有 28: 367-376, 2011.
3. Process of distant lymph node metastasis in colorectal carcinoma: implication of extracapsular invasion of lymph node metastasis. Fujii T, Tabe Y, Tsutsumi S, Asao T, Kuwano H. BMC Cancer. 査読有 11: 216, 2011.
4. Mosapride citrate improves postoperative ileus of patients with colectomy. Toyomasu Y, Mochiki E, Fujii T, Tsutsumi S, Asao T, Kuwano H. J Gastrointest Surg. 査読有 15: 1361-1367, 2011.

5. Effects of subcutaneous drain for the prevention of incisional SSI in high-risk patients undergoing colorectal surgery. Fujii T, Tabe Y, Yajima R, Yamaguchi S, Tsutsumi S, Asao T, Kuwano H. *Int J Colorectal Dis.* 査読有 26: 1151-1155, 2011.
6. Extracapsular invasion as a risk factor for disease recurrence in colorectal cancer. Fujii T, Tabe Y, Tsutsumi S, Asao T, Kuwano H. *World J Gastroenterol.* 査読有 17: 2003-2006, 2011.
7. Kugel hernia repair through an anterior approach with laparoscopic observation. Fujii T, Asao T, Tabe Y, Yajima R, Tsutsumi S, Takahashi A, Kuwano H. *Am Surg.* 査読有 77: 242-244, 2011.
8. Novel method of the double-loop slip-knot: preknitting on the laparoscopic forceps enables easy and secure intracorporeal ligation. Asao T, Tsutsumi S, Satoru Y, Fujii T, Mochiki E, Kuwano H. *Surg Endosc.* 査読有 25: 2487-2491, 2011.
9. Transanal local excision in the treatment of rectal carcinoid: results and implications. Fujii T, Tabe Y, Tsutsumi S, Asao T, Kuwano H. *Hepatogastroenterology.* 査読有 58: 1168-1170, 2011.
10. Effectiveness of intraperitoneal hyperthermo-chemotherapy for malignant peritoneal mesothelioma and estimation of its effect by repeated FDG-PET. Yamaguchi S, Asao T, Tsutsumi S, Fujii T, Yamauchi H, Kuwano H. *Hepatogastroenterology.* 査読有 58: 861-864, 2011.
11. Relationship between C-reactive protein levels and wound infections in elective colorectal surgery: C-reactive protein as a predictor for incisional SSI. Fujii T, Tabe Y, Yajima R, Tsutsumi S, Asao T, Kuwano H. *Hepatogastroenterology.* 査読有 58: 752-755, 2011.
12. Use of a handheld, semiconductor (cadmium zinc telluride)-based gamma camera in navigation surgery for primary hyperparathyroidism. Fujii T, Yamaguchi S, Yajima R, Tsutsumi S, Uchida N, Asao T, Oriuchi N, Kuwano H. *Am Surg.* 査読有 77: 690-693, 2011.
13. Clinical significance of melanoma antigen-encoding gene-1 (MAGE-1) expression and its correlation with poor prognosis in differentiated advanced gastric cancer. Ogata K, Aihara R, Mochiki E, Ogawa A, Asao T, Kuwano H. *Ann Surg Oncol.* 査読有 18: 1195-203, 2011.
14. Mosapride citrate improves postoperative ileus of patients with colectomy. Toyomasu Y, Mochiki E, Fujii T, Tsutsumi S, Asao T, Kuwano H. *J Gastrointest Surg.* 査読有 15: 1361-1367, 2011.
15. Inhibition of autophagy augments 5-fluorouracil chemotherapy in human colon cancer in vitro and in vivo model. Li J, Hou N, Faried A, Tsutsumi S, Kuwano H. *Eur J Cancer.* 査読有 46: 1900-1909, 2010.

16. Primary mucinous adenocarcinoma of the ileum. Toyomasu Y, Tsutsumi S, Yamaguchi S, Mochiki E, Asao T, Kuwano H. Int Surg. 査読有 95: 60-62, 2010.
17. Intragastric monosodium L-glutamate stimulates motility of upper gut via vagus nerve in conscious dogs. Toyomasu Y, Mochiki E, Yanai M, Ogata K, Tabe Y, Ando H, Ohno T, Aihara R, Zai H, Kuwano H. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 査読有 298: R1125-1135, 2010.
18. Thickness of subcutaneous fat as a strong risk factor for wound infections in elective colorectal surgery: impact of prediction using preoperative CT. Fujii T, Tsutsumi S, Matsumoto A, Fukasawa T, Tabe Y, Yajima R, Asao T, Kuwano H. Dig Surg. 査読有 27: 331-335, 2010.
19. Characterization of special propulsive contractions during rectal evacuation in a canine model of intestinal extrinsic denervation and rectal transection. Tabe Y, Mochiki E, Yanai M, Toyomasu Y, Ando H, Ohno T, Tsutsumi S, Asao T, Kuwano H. Int J Colorectal Dis. 査読有 25: 53-61, 2010.
20. Adenocarcinoma of Ascending Colon Associated with Sarcoid Reaction in Regional Lymph Nodes. Fujii T, Tsutsumi S, Asao T. Case Rep Gastroenterol. 査読有 4: 118-123, 2010.
21. Implication of an Intramammary Sentinel Lymph Node in Breast Cancer: Is This a True Sentinel Node? Fujii T, Tsutsumi S, Asao T, Kuwano H. Breast Care (Basel). 査読有 5: 102-104, 2010. [学会発表] (計 3 件)
1. 堤 莊一、石橋敬一郎、木暮和夏子、平山 功、片山和久、内田信行、保田 尚邦、細内康男、根岸 健、浅尾高行、西田保二、石田 秀行、桑野博行：一般口演 大腸癌に対するBevacizumab治療継続の有効性・安全性の検討第Ⅱ相試験 SILK Study 【中間報告】 第 48 回日本癌治療学会学術集会 平成 22 年 10 月 28-30 日 京都
2. 堤 莊一、鮫島 伸一、馬場 秀夫、岡村 修、植竹 宏之、大植 雅之、桑野博行、渡邊 昌彦、杉原 健一：ワークショップ 3 「転移性大腸癌に対する化学療法と手術のタイミング」切除不能大腸癌二次治療例に対する FOLFIRI と IRIS との第Ⅲ相臨床試験. 第 65 回日本消化器外科学会総会 平成 22 年 7 月 14-16 日 山口
3. 堤 莊一、藤井孝明、須藤利永、矢島玲奈、森田廣樹、木暮和夏子、加藤寿英、山内逸人、浅尾高行、桑野博行：一般口演 切除不能進行再発大腸癌に対する標準化学療法の均てん化 第 110 回日本外科学会定期学術集会 平成 22 年 4 月 8-10 日 名古屋
6. 研究組織  
 (1) 研究代表者  
 堤 莊一 (TSUTSUMI SOICHI)  
 群馬大学・大学院医学系研究科・助教  
 研究者番号：3 0 3 2 3 3 5 6
- (2) 研究分担者  
 浅尾 高行 (ASAO TAKAYUKI)  
 群馬大学・大学院医学系研究科・准教授  
 研究者番号：4 0 2 1 2 4 6 9
- 藤井 孝明 (FUJII TAKAAKI)  
 群馬大学・医学部・助教  
 研究者番号：4 0 5 0 7 3 3 1

桑野 博行 (KUWANO HIROYUKI)  
群馬大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：90186560

高坂 貴行 (KOSAKA TAKAYUKI)  
群馬大学・医学部・助教  
研究者番号：00507329

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：