

## 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25年 6月 7日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591453

研究課題名（和文） 胃癌幹細胞における Wnt シグナル機構の解明と制癌療法への応用

研究課題名（英文） The study of the mechanism of Wnt signal in the gastric cancer stem cell and the application to the cancer therapy.

研究代表者

田邊 和照 (TANABE KAZUAKI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・講師

研究者番号：40379847

研究成果の概要（和文）：本研究は当初胃癌幹細胞における特異的マーカーの同定を目的としていたが、その過程で CD24 を胃癌の悪性化因子の一つであることを見出し、その制御メカニズムを解析することで新たな制癌治療の基盤となる研究となると考え研究を行った。

CD24 発現により胃癌細胞株の接着・浸潤能が増強することが明らかとなった。CD24 発現メカニズムの解析では、通常酸素下に比べて低酸素下で CD24 発現がより亢進していた。CD24 の発現誘導には HIF が関与している可能性が明らかとなり、胃癌細胞の浸潤亢進に CD24 が重要な因子であることを解明した。

研究成果の概要（英文）：This study was originally planned to confirm the specific marker for gastric cancer stem cell. In the study, we found that CD24 is one of factor of malignant potential in gastric cancer. Up-regulation of CD24 results the up-regulation of both adhesion and invasion. Furthermore, CD24 is more expressed under hypoxic condition compare to normoxia. We found that HIFs take part in the induction of the CD24 expression. CD24 plays important rolls in gastric cancer invasion.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：消化器外科学

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：胃十二指腸外科学、癌幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

癌細胞にも幹細胞という細胞集団が存在し、癌の発生・進展・転移において鍵を握っているという概念は1997年に Bonnet らにより白血病で報告され、以降急速に広まりつつある。脳腫瘍や乳癌などいくつかの固形癌において癌幹細胞同定の報告はあるものの胃癌においてはその存在は不定であり今後の研

究の発展が望まれる分野である。これまで胃癌細胞株において癌幹細胞様性質を持つとされる SP (Side Population) 細胞の分離や表面マーカーの同定を試みた報告はあるが未だ同定には至っていない。申請者らはこれまでいくつかの胃癌細胞株および胃癌癌性胸腹水からの臨床検体からの検討により放射線抵抗性を示す細胞集団に

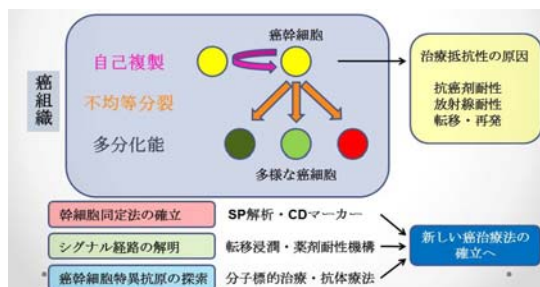
CD44(+),CD133(-),CD24(-)の発現が上昇しており表面マーカーCD44(+),CD133(-),CD24(-)が胃癌幹細胞のマーカーになり得る可能性を有していると考えている。しかし、これらの癌幹細胞(様)集団における増殖機構や化学放射線抵抗性について In vivo 実験および進行胃癌臨床検体を用いて明らかにする。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、胃癌における癌幹細胞(様)集団における特有マーカーを同定し、申請者らがこれまで解明してきた胃癌進展に関わるシグナル機構をもとに胃癌幹細胞(様)集団の増殖機構を明らかにすることで新たな胃癌治療戦略を確立することである。

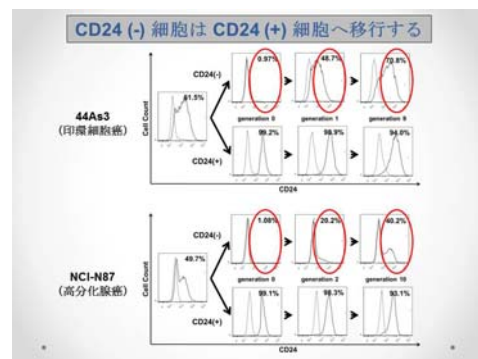
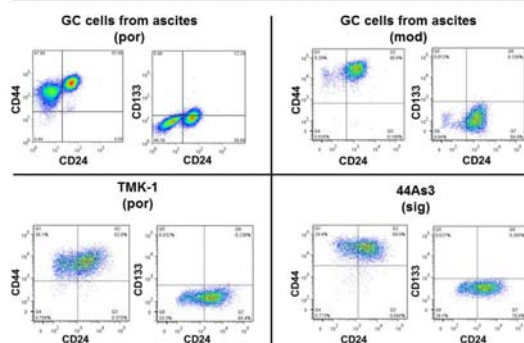
## 3. 研究の方法

癌幹細胞の同定法には CD24・CD44・CD133・integrin などの細胞表面蛋白質や Hoechst 33342 色素の排出能力、aldehyde dehydrogenase 活性などの細胞機能による選別法などが知られている。胃癌幹細胞集団としては、Side Population (以下 SP ; Hoechst 33342 を排出する細胞群) もしくは CD44(+) が報告されている。しかしながら、複数のマーカーを組み合わせた癌幹細胞の選別と、それによる機能解析の報告はない。



これまでの研究では、胃癌細胞株 MKN1 では、CD44(+）・CD133(-)・CD24(-)の細胞集団に放射線耐性の増殖能を有していることを見出し、胃癌細胞株 TMK-1 では、CD44(+）・CD133(-)・CD24(+)の細胞集団で高い細胞浸潤能があることを見出している。

## CD24 Represents Heterogeneity of GC Cells

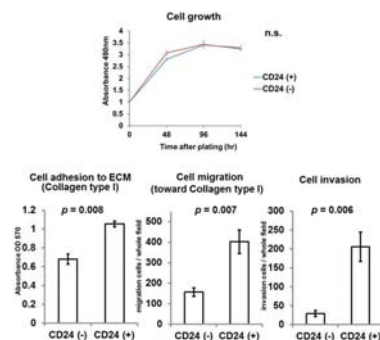


また、SP では CD24(+)細胞は 1%未満であったが、Main Population (MP ; Hoechst 33342 を排出しない細胞群) では約 15%程度 CD24(+)細胞を認めた。さらには、SP を継代する過程で、CD24(+)細胞の増加出現を認めた。この事象により、CD24(-)細胞から CD24(+)細胞に分化する可能性を示唆された。CD24(-)が胃癌幹細胞のマーカーの一つとなりうる可能性が考えられ、胃癌細胞株における CD24 の機能解析と CD24 発現を誘導する因子の探索を行う。

## 4. 研究成果

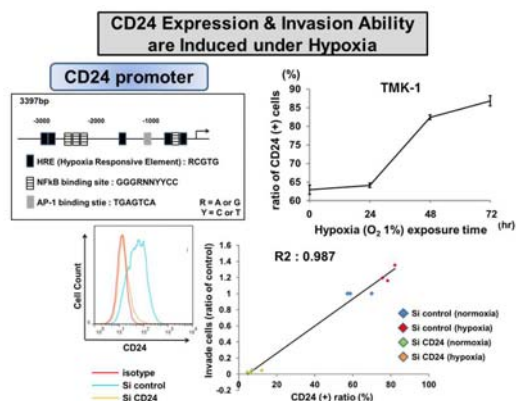
研究の過程で低酸素条件下などでの胃癌細胞は CD24 陰性→陽性転化する傾向がみられ、また CD24 陽性細胞において高い運動能・侵潤能を持つことが明らかとなった。これらの事から、CD24 を胃癌の悪性化因子の一つとしてその制御メカニズムを解析することで新たな制癌治療の基盤となる研究となると考え研究の推進方向を変更した。

## CD24 is Required for Invasion of GC Cells

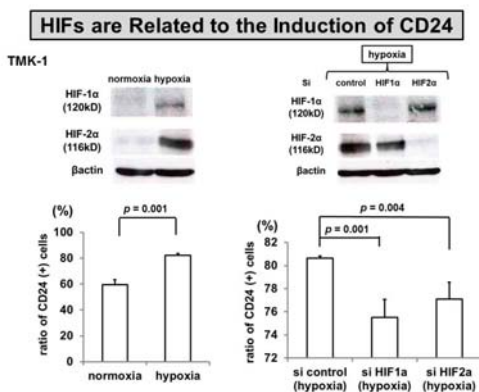


### (1) CD24 発現制御メカニズムの解明

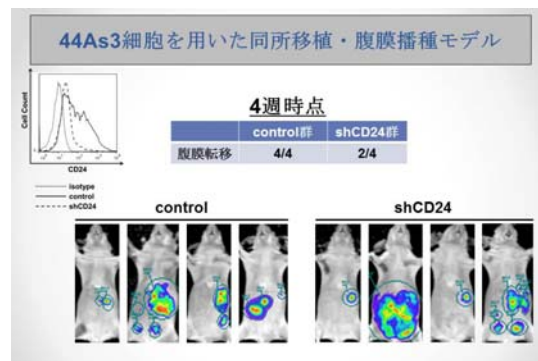
低酸素環境に暴露したところ経時的に CD24 発現が亢進した。CD24 のプロモーター領域に Hypoxia Response Element (HRE) が存在するを見出した。



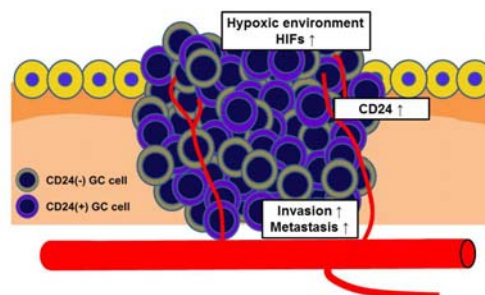
CD24 と HIF との関連について検討したところ、HIF-1 発現抑制により CD24 は抑制され、HIF-1 $\alpha$ , 2 $\alpha$  発現と CD24 発現間に相関を認めた。しかしながら EMT との関連性が高いとされる Snail の過剰発現により CD24 発現が抑制されるといった現象も確認されており、CD24 発現調節機構については NK-kB や ERK など他の伝達経路の解明も必要と考えている。



(2) 動物実験による CD24 制御による転移制御  
胃癌低分化細胞株 TMK-1 と腹膜播種由来細胞株 44As3 を用いてそれぞれの細胞株に Luciferase 遺伝子を導入した細胞株を作成した。これらの細胞株をヌードマウスの脾臓あるいは胃壁漿膜下に接種し、経時的に観察し肝転移、腹膜播種を高率に形成可能であることが確認できた。



また、各々の細胞株において CD24 を Sh CD24 を用いて stable knock down した細胞株の準備が整った。今後はこれらの細胞株を用いて、in vivo 発光・蛍光イメージングを用いて経時的に接種した腫瘍の増殖能および腹膜播種の数・程度、生存率を比較していく予定である。



## 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)

1. Fujikuni Noriaki, Tanabe Kazuaki, Hypoxia induces expression of CD24. 71th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 19-20 Sep 2012, Sapporo.

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田邊 和照 (TANABE KAZUAKI)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・講師  
研究者番号：40379847

(2) 研究分担者

鈴木 崇久 (SUZUKI TAKAHISA)  
広島大学・病院・病院助教  
研究者番号：80467779

徳本 憲昭 (TOKUMOTO NORIAKI)  
広島大学・病院・病院助教  
研究者番号：90564980

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：