

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 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700876

研究課題名（和文）スキルス胃癌幹細胞制御における TGF- β の機能解析

研究課題名（英文）Tumorigenic capacity of diffuse-type gastric carcinoma-initiating cells is inhibited by TGF-beta.

研究代表者

江幡 正悟（EHATA SHOGO）

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90506726

研究成果の概要（和文）：スキルス胃癌の中には、5-8%の割合でアルデヒド脱水素酵素 ALDH1 発現する画分があるが、この画分に含まれる細胞群は高い腫瘍形成能、自己複製能、多分化能を有することがわかった。マイクロアレイを用いて ALDH1 陽性細胞の遺伝子発現解析を行った結果、REG4 が新たな癌幹細胞のマーカーとして同定された。スキルス胃癌細胞に発現している REG4 を標的とすることで、同疾患の新たな治療戦略が創出されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：ALDH1+ cells, constituted 5-8% of the human diffuse-type gastric carcinoma cells, were more tumorigenic and able to self-renew and generate heterogeneous cell populations. Using gene expression microarray analyses, we identified REG4 as a novel marker for cancer-initiating cells. Targeting REG4 in cancer cells may provide a novel strategy in the treatment of diffuse-type gastric carcinoma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：腫瘍学

科研費の分科・細目：腫瘍生物学

キーワード：TGF-beta、スキルス胃癌、癌幹細胞、ABCG2/BCRP、ALDH1

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年の研究から腫瘍を形成する細胞集団は不均一であり、少ないながらも、しかし高率に、腫瘍を形成する未分化な細胞集団が存在することが分かっている。この集団は癌幹細胞と呼ばれ、抗癌剤や放射線療法などの治療後の再発に深く関与していると推察されている。この癌幹細胞モデルは急性骨髄性白血病で初めて提唱されたが、現在では乳癌、脳腫瘍、肺癌などの固形腫瘍においてもこの

モデルが適応されており、悪性腫瘍の臨床検体から、腫瘍形成能の高い細胞群が同定されている。これら腫瘍形成能の高い細胞群に感受性のある治療戦略をとることが、難治性悪性腫瘍の克服につながると考えられる

(2) 一方で、外科手術による根治の期待しがたいスキルス胃癌においては、いまだ癌幹細胞活性を有する細胞集団が同定されておらず、以降の解析が行えていない。

(3) 研究代表者は平成 20 年度より、スキルス胃癌細胞株中に存在するであろう癌幹細胞に着目して研究を行ってきた。とくに FACS 解析において SP 細胞と呼ばれる細胞群が存在することが判明したが、SP 細胞は多くの癌において癌幹細胞が濃縮された画分であるとされており、スキルス胃癌においても同様のことが言えるのではないかと想定していた。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、スキルス胃癌中の SP 細胞や癌幹細胞マーカー強発現細胞群が、治療の標的と目される“癌幹細胞”であることを、実験病理学的に証明する。

(2) さらにこれら癌幹細胞群の特性を解析することで、より効率よく癌幹細胞を濃縮するための新規マーカーの検索し、より効率よく癌幹細胞を駆逐する治療の創出を試みた。

3. 研究の方法

(1) 複数種のスキルス胃癌細胞株から癌幹細胞マーカー陽性細胞を単離し、移植実験から腫瘍形成能を、また培養実験から多分化能、自己複製能を評価した。実験に用いたスキルス胃癌細胞は大阪市立大学医学部腫瘍外科、ならびに安田女子大学生命薬学講座から供与を受けた。また細胞の単離は研究代表者の所属する施設、もしくは癌研究会癌化学療法センター基礎研究部で行った。

(2) 上述の結果に基づき、妥当性のある癌幹細胞マーカーを選定した。選定したマーカーを強発現する細胞の遺伝子発現を、マイクロアレイを用いて網羅的に解析し、癌幹細胞の遺伝子発現プロファイリングを行った。

(3) 遺伝子発現プロファイルの結果、スキルス癌幹細胞に特異的に発現している遺伝子をみだし、それらの遺伝子の腫瘍形成への寄与を評価した。

4. 研究成果

(1) スキルス胃癌細胞内には一定の確率で ABCG2 発現細胞 (SP 細胞)、もしくは ALDH1 陽性細胞が存在することが確認された。これらの細胞群は、腫瘍形成能に長け、自己複製能を有するなど、癌幹細胞様の性格を有していることを発見した (図 1)。さらに ABCG2 遺伝子の発現レベルや ALDH1 遺伝子の発現レベルは、TGF-beta により負に制御されていることがわかった。

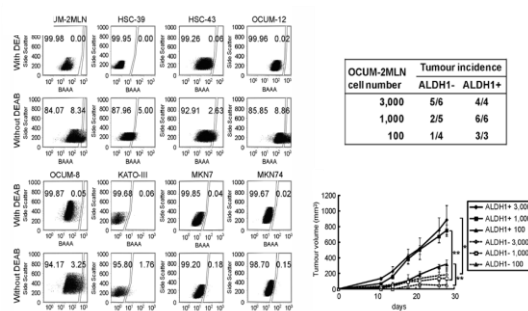


図1 各スキルス胃癌細胞中のALDH1陽性細胞と腫瘍形成能の評価

(2) 特にクロマチン免疫沈降実験から、スキルス胃癌細胞では、TGF-beta の下流で転写因子 Smad が ABCG2 遺伝子のプロモーター領域もしくはエンハンサー領域に直接的に結合することで、この遺伝子の転写が調節されていることも見出された。またヒトスキルス胃癌原発腫瘍組織では、TGF-beta シグナル伝達因子である Smad の発現レベルと ALDH1 の発現レベルが逆相関していることも判明した。

(3) 次に cDNA マイクロアレイから、スキルス胃癌中の ALDH1 陽性細胞の遺伝子発現をプロファイリングし、ALDH1 陽性細胞の腫瘍形成に重要な遺伝子の探索を試みた (図 2)。この結果、複数種のスキルス胃癌細胞由来の ALDH1 陽性細胞では REG4 遺伝子の発現レベルが亢進していることが判明した。

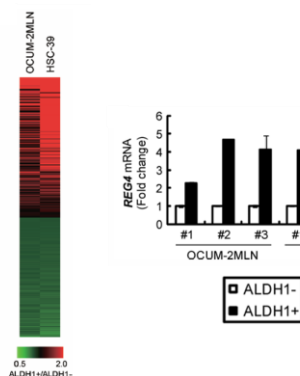


図2 ALDH1陽性細胞の遺伝子発現解析とREG4発現

(4) ALDH1 陽性細胞に発現している REG4 をノックダウンすることで、ALDH1 陽性細胞の造腫瘍活性が大きく低下することから、REG4 が新規分子標的となることが示唆された (図 3)。今後はスキルス胃癌中の REG4 発現の機能解析を詳細に行い、治療標的としての妥当性を評価する。REG4 の翻訳産物は分泌タンパクであり、このタンパクの生理学的作用や、効率よい機能阻害の方法を探索する。

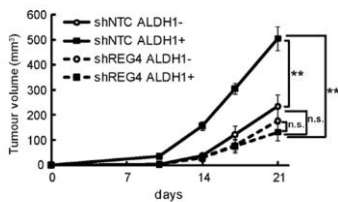


図3 ALDH1陽性細胞中のREG4ノックダウンによる腫瘍形成の抑制

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4件)

①Katsuno Y, Ehata S, Yashiro M, Yanagihara K, Hirakawa K, Miyazono K, Coordinated expression of REG4 and aldehyde dehydrogenase 1 regulating tumorigenic capacity of diffuse-type gastric carcinoma-initiating cells is inhibited by TGF-beta, *Journal of Pathology*, 査読有、掲載確定、DOI:10.1002/path.4020

② Miyazono K, Ehata S, Koinuma D, Tumor-promoting functions of transforming growth factor-beta in progression of cancer, *Upsala Journal of Medical Sciences*, 査読有、Vol. 117, No. 2, 2012, pp. 143-152, DOI:10.3109/03009734.2011.638729

③Shirai YT, Ehata S, Yashiro M, Yanagihara K, Hirakawa K, Miyazono K, Bone morphogenetic protein-2/4 play tumor suppressive roles in human diffuse-type gastric carcinoma, *American Journal of Pathology*, 査読有、2011, Vol. 179, No. 6, 2011, pp. 2920-2930, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.08.022>

④Ehata S, Johansson E, Katayama R, Koike S, Watanabe A, Hoshino Y, Katsuno Y, Komuro A, Koinuma D, Kano MR, Yashiro M, Hirakawa K, Aburatani H, Fujita N, Miyazono K, Transforming growth factor-beta decreases the cancer-initiating cell population within diffuse-type gastric carcinoma cells, *Oncogene*, 査読有、Vol. 30, No. 14, 2011, pp. 1693-1705, DOI:10.1038/onc.2010.546

[学会発表] (計6件)

①Yoko Katsuno, Shogo Ehata, Masakazu Yashiro, Kazuyoshi Yanagihara, Kosei

Hirakawa, Kohei Miyazono, Cancer-initiating cell population in diffuse-type gastric carcinoma cells has high ALDH1 activity, 2011年10月5日、愛知県名古屋市名古屋国際会議場、第70回日本癌学会総会

②Yo-taro Shirai, Shogo Ehata, Masakazu Yashiro, Kosei Hirakawa, Kohei Miyazono, Bone morphogenetic protein-2/4 play tumor suppressive roles in human diffuse-type gastric carcinoma, 2011年10月5日、愛知県名古屋市名古屋国際会議場、第70回日本癌学会総会

③Shogo Ehata, Erik Johansson, Ryohei Katayama, Sumie Koike, Akira Watanabe, Yukari Hoshino, Yoko Katsuno, Akiyoshi Komuro, Daizo Koinuma, Mitsunobu R. Kano, Masakazu Yashiro, Kosei Hirakawa, Hiroyuki Aburatani, Naoya Fujita, Kohei Miyazono, TGF-beta diminishes the Side Population fraction of the diffuse-type gastric cancer cells, 2011年4月30日、神奈川県横浜市パシフィコ横浜、第100回日本病理学会総会

④Shogo Ehata, Ryohei Katayama, Sumie Koike, Yukari Hoshino, Yoko Katsuno, Daizo Koinuma, Mitsunobu Kano, Masakazu Yashiro, Kosei Hirakawa, Naoya Fujita, Kohei Miyazono, TGF-beta diminishes the SP fraction of the diffuse-type gastric carcinoma cells, 2010年9月23日、大阪府大阪市大阪国際会議場、第69回日本癌学会総会

⑤Yoko Katsuno, Shogo Ehata, Masakazu Yashiro, Kosei Hirakawa, Kohei Miyazono, Cancer-initiating cell population in diffuse-type gastric carcinoma cells has high ALDH1 activity, 2010年9月23日、大阪府大阪市大阪国際会議場、第69回日本癌学会総会

⑥Yo-Taro Shirai, Shogo Ehata, Masakazu Yashiro, Kosei Hirakawa, Kohei Miyazono, BMP plays a tumor suppressive role in diffuse-type gastric carcinoma development, 2010年9月22日、大阪府大阪市大阪国際会議場、第69回日本癌学会総会

[図書] (計1件)

①江幡正悟、医歯薬出版株式会社、胃癌における TGF-beta シグナルの役割、別冊「医学のあゆみ」TGF-beta シグナル研究、メカニズ

ムの解明から新たな治療へ、2011、937-941

[その他]

ホームページ等

<http://beta-lab.umin.ac.jp/>

(東京大学・大学院医学系研究科・病因病理学専攻・分子病理学分野ホームページ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江幡 正悟 (EHATA SHOGO)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90506726

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし