

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591872

研究課題名(和文)大腸癌幹細胞とそのニッチ相互作用の解析

研究課題名(英文)Cancer stem cells in colorectal cancer and the prognostic significance markers

研究代表者

鄭 允文(ZHENG, Yun-Wen)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：80404995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：癌幹細胞は腫瘍の形成に寄与するだけでなく治療抵抗性を示すことから術後の再発・転移の一因と考えられている。そこで、本研究では大腸癌原発巣から分離した腫瘍形成能の高い細胞群に注目して解析を行い、再発や転移等の予後不良因子の特定を行った。その結果、CD44バリエーションアイソフォーム2(CD44v2)の発現量と予後には相関関係があり、高発現群では予後不良であった。この結果からCD44のバリエーションアイソフォームと細胞外マトリクス、ヒアルロン酸の結合が癌幹細胞の未分化性の維持や転移に重要な役割を担うと考えられた。より詳細なCD44v2の機能を解明することで、大腸癌の予後改善に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)： CD133 and CD44 are putative cancer stem cell markers in colorectal cancer (CRC). However, their clinical significance is currently unclear. In this study, we evaluated primary CRC cell to determine the significance of several cancer stem cell markers, including CD133 and CD44, as predictors of tumorigenesis and prognosis. We found that CD44+, CD133+ and CD133+CD44+ sub-populations were significantly more tumorigenic than the total cell population. The clinical samples expressed several transcript variants of CD44. Variant 2 was specifically overexpressed in both primary tumours and xenografts in comparison with the normal mucosa. A prognostic assay using qRT-PCR showed that the CD44v2high group had a significantly worse prognosis than the CD44v2low group. In conclusion, CD44 is an important CSC marker in CRC patients. And the CRC patients with high expression of CD44v2 have a poorer prognosis than patients with other CD44 variants.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：CD44variant2 予後予測因子 大腸癌 癌幹細胞 CD133

1. 研究開始当初の背景

消化器癌は年間罹患者数が 25 万人を超える主要な悪性疾患の一つである。

癌幹細胞研究は、癌の発生・再発・転移などを幹細胞システムという視点から理解することで、従来のアプローチでは解明し得なかった発癌機構に関して新しい知見を見出す可能性を有した研究である。いかなる癌細胞も腫瘍を形成、維持できるという従来の考え方と異なり、癌細胞社会のなかに中心的役割を果たす癌幹細胞が存在し、この細胞のみが腫瘍を形成し得るという新しい知見のもとに、急速に発展しつつある研究分野である。

発癌、転移、再発における中心的役割を担う癌幹細胞ニッチを明らかにすることにより、悪性新生物の一元的理解につながる可能性がある。その結果をもとに行う予後診断等にとどまらず、癌幹細胞を根絶する分子標的治療に応用することが可能である。本研究により、大腸癌における“癌幹細胞”の分離と大腸癌マーカーの特性解析が実施されることにより、幹細胞システムという視点から大腸癌における再発・転移機構の解明が進むことが期待される。癌幹細胞或いはそのニッチを標的とした新規化学・放射線療法が確立されれば、従来では治療低感受性の再発・転移巣についても有効な治療法を開発することが可能となり、大腸癌患者の治療成績の向上および QOL の向上につながることを期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は大腸癌原発巣から分離した癌細胞による腫瘍形成能の確認を行う。形成された腫瘍をもとに、CD133, CD44 を含む大腸癌または大腸正常粘膜の幹細胞として報告された各種マーカーの重要性を明らかにし、予後予測マーカーとしての価値を評価することである。さらに、癌の再発・転移に密接に関連していると考えられる癌幹細胞に対する特異的な治療標的分子の特定を試みる。

3. 研究の方法

大腸癌の臨床検体より単離された、ごく少数かつ低頻度でしか存在しない癌幹細胞をフローサイトメトリーと蛍光標識モノクローナル抗体等を用いた高精度な細胞分離法を用いて純化、回収した。その癌幹細胞を用いて、未分化性および増殖機構の解明を行った。次いで CD133, CD44 発現レベルにより、各細胞分画を単離し、NOD/SCID マウスの皮下に移植することで腫瘍形成能を評価した。さらに皮下移植片 (xenograft) の遺伝子発現解析を行い、腫瘍再構築における重要なマーカーを同定した。

さらに、大腸癌 cDNA ライブラリーを用い

て各マーカーの発現と予後予測因子としての重要性を評価し、新たに同定したマーカーの有用性を検証した。

実験 1: 臨床検体の大腸癌原発巣から得られた細胞群を NOD/SCID マウスに移植し腫瘍形成能を評価することで腫瘍再構築における CD133 および CD44 の重要性を検討した。

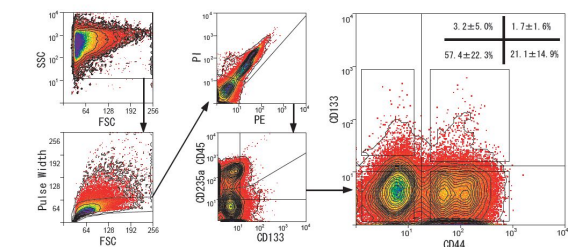
2007 年 4 月から 2011 年 8 月まで、横浜市立大学付属病院、横浜市立大学付属市民総合医療センター、神奈川県立がんセンターにて大腸癌 (結腸癌, 直腸癌) と診断され手術を受けた症例のうち、患者の同意を得られ、十分な検体量が得られた 77 症例を対象とした。研究にあたり各施設において倫理委員会の承認を得ている。

実験 2: 研究協力者大島らによる 167 症例の癌部、非癌部から合成された cDNA ライブラリーを用いて癌幹細胞関連マーカーの mRNA 発現による予後解析を行った。定量 PCR については前述の遺伝子発現解析方法に基づいて行った。臨床病理学的特徴については TNM 分類 (NICC, 7th edition, 2009) を用いた。

4. 研究成果

(1) フローサイトメトリー及び腫瘍形成解析

フローサイトメトリーにより CD133, CD44 で分画化した各細胞画分の腫瘍形成能を評価した (図 1)。各分画細胞の割合は腫瘍 (n=77) vs 正常組織 (n=20) では、CD133⁺CD44⁻: 57.4 ± 22.3% vs 70.9 ± 3.0% (Mean ± SD) (p=0.001)、CD133⁺CD44⁺: 3.2 ± 5.0% vs 1.2 ± 0.8% (p=0.001)、CD133⁻CD44⁺: 21.1 ± 14.9% vs 25.2 ± 10.8% (p=0.249)、CD133⁻CD44⁻: 1.7 ± 1.6% vs 1.4 ± 1.2% (p=0.468)であった。77 例のうち、腫瘍形成アッセイを施行できた症例は 63 例であった。このうち 21 例で腫瘍形成が認められ、42 例では認められなかった。腫瘍形成アッセイでは CD44⁺、CD133⁺分画とも全細胞分画 (non-fraction) と比較し、有意に腫瘍形成能が高かった。対して CD133⁻、CD44⁻分画は腫瘍形成能が低かった。癌幹細胞頻度では、CD133⁺CD44⁺分画が 1/3160 と最も頻度が高かった。また腫瘍形成能評価においては、CD133⁺CD44⁺、CD44⁺分画ではわずか 100 細胞で腫瘍が形成された。しかし CD133⁺CD44⁺分画と CD44⁺分画の間では腫瘍形成能に統計学的有意差は認められなかった。



意差は認められなかった。

図1 腫瘍細胞の表面抗原解析

(2) xenograft 解析

次に、形成された xenograft の表面抗原解析を行った。形成した xenograft を単一細胞に分離し、フローサイトメトリーを用いて幹細胞マーカーである CD133 および CD44 の表面抗原の発現頻度を検討した。その結果、CD44⁺分画と CD133⁺CD44⁺分画の割合は原発巣と比較し xenograft で有意に上昇していた (*:p=0.014, **: p=0.020, 図 2)。CD133⁺分画については有意差を認められなかった。

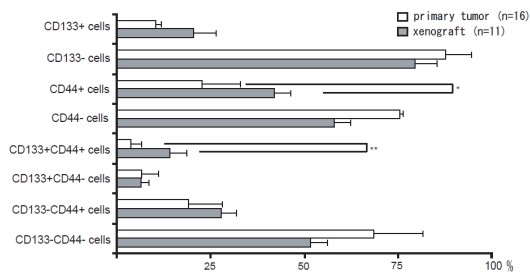


図2 原発巣, xenograft のフローサイトメトリー解析結果

Ki-67 の免疫組織化学染色により原発巣および xenograft における増殖能を評価したところ、xenograft から得られた CD133⁺CD44⁺および CD133⁻CD44⁺細胞は原発巣と比較して Ki67 陽性率は有意に高く、この分画は細胞増殖能が高いことが示された。一方、CD133⁻CD44⁻細胞では原発巣、xenograft ともに Ki67 陽性が見られず、増殖能が認められなかった。以上の結果から、CD44⁺と CD133⁺CD44⁺細胞が腫瘍再構築の際に重要な役割を担っていることが示唆された。

(3) CD44variant 解析

CD44 にはスタンダードアイソフォームに加えて 1~10 の変異体(variant)が存在している。我々は大腸癌における CD44variant の重要性を同定するために、exon 特異的 PCR を行った。CD44 standard、variant2-10 について正常組織、原発巣および xenograft で発現解析を行った。CD44 standard は正常組織と原発巣では発現が認められたが、xenograft では認められなかった(図 3A)。Variant 3~10 については xenograft を含むすべての検体で発現が見られたが(図 3B)、variant 2 (CD44v2) については正常組織と比較し、明らかに腫瘍組織、xenograft で過剰発現していた(図 4)。この結果より、大腸癌においては CD44 スタンダードアイソフォームではなく、variant 2 の発現が腫瘍特異的に高く、重要な役割を担っている可能性が示唆された。そこで、大腸癌ライブラリーを用いて、CD44v2 との予後解析を検証した。

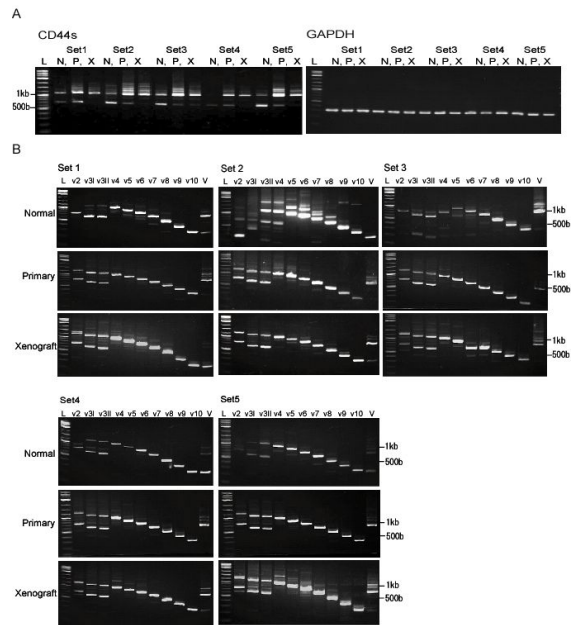


図3 正常粘膜, 原発巣, xenograft 5 セット (患者 5 人分) における CD44s, v2-10 の発現比較

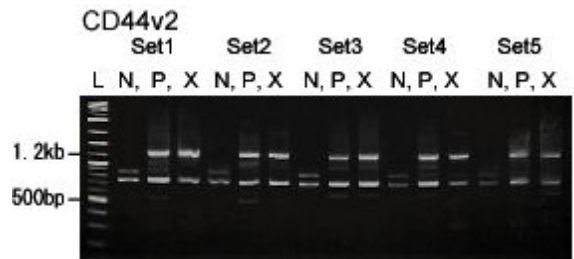


図4 正常粘膜, 原発巣, xenograft における CD44v2 の発現

(4) cDNA ライブラリーにおける予後解析

予後関連癌幹細胞マーカーとの相関を検証するために、CD44v2 が含まれる 167 症例を対象とし、各マーカーの発現量で、高発現群と低発現群の 2 群に分け全生存期間を比較した。CD44v2 高発現群 (n=84, 5 年生存率 (5-OS) = 74%) は低発現群 (n=84, 5-OS = 88%) より有意に予後不良であった (p=0.041)。他の癌幹細胞マーカー CD133、LGR5、EphB2、Musashi-1 については有意な差は認められなかった。マーカーを組み合わせると、LGR5 高発現グループで有意に予後不良があり LGR5 の重要性が示唆された。

さらに Stage IV 症例では、CD44v2 高発現群と CD44v2 低発現群の 5 年生存率は、それぞれ 36% と 73% と大きな差が見られ、CD44v2 高発現群では予後不良であった (n=0.03)。

全生存率に対する予後規定因子を検討したところ、病期 (TNM stage)、術後補助化学療法に加え CD44v2 の発現が確認され、CD44v2 は単独で予後予測因子であった。

以上の結果から、CD44v2 は大腸癌幹細胞マーカーおよび予後予測因子としても有用であった。今後、更に CD44v2 の機能を解明することで、その高発現患者に対するオーダーメイド治療の開発につながり、大腸癌の予後改善に寄与すると考えられる。

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 20 件)

Ozawa M, Ichikawa Y*, Zheng YW*, Oshima T, Miyata H, Nakazawa K, Guan HB, Shiozawa M, Akaike M, Watanabe K, Ota M, Fujii S, Kunisaki C, Ishikawa T, Tanaka K, Akiyama H, Endo I, and Taniguchi H. Prognostic significance of CD44 variant 2 upregulation in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2014 (in press) (*equal contribution) 査読有

DOI:10.1038/bjc.2014.253

Zheng YW*, Tsuchida T*, Shimao T, Li B, Takebe T, Zhang RR, Sakurai Y, Ueno Y, Sekine K, Ishibashi N, Imajima M, Tanaka T, and Taniguchi H: The CD133+CD44+ Precancerous Subpopulation of Oval Cells is a Therapeutic Target for Hepatocellular Carcinoma. *Stem Cells Dev* 2014 (in press) (*equal contribution) 査読有

DOI:10.1089/scd.2013.0577

Okuda R, Sekine K, Hisamatsu D, Ueno Y, Takebe T, Zheng YW, Taniguchi H. Tropism of cancer stem cells to a specific distant organ. *In Vivo* 2014, 28(3):361-5. 査読有

<http://iv.iarjournals.org/content/28/3/361.abstract>

Koike H, Ueno Y, Naito T, Shiina T, Nakata S, Ouchi R, Obana Y, Sekine K, Zheng YW, Takebe T, Isono K, Koseki H, Taniguchi H. Ring1B Promotes Hepatic Stem/Progenitor Cell Expansion via Simultaneous Suppression of Cdkn1a and Cdkn2a. *Hepatology* 2014 Feb 4. Epub ahead of print 査読有.

DOI:10.1002/hep.27046.

Zheng YW*, Nie YZ*, Tsuchida T, Zhang RR, Aoki K, Sekine K, Ogawa M, Takebe T, Ueno Y, Sakakibara H, Hirahara F, Taniguchi H. The evidence of sophisticatedly heterogeneous population of human umbilical vein endothelial cells. *Transplant Proc* 2014, 46, 1251-3 (*equal contribution) 査読有

DOI:10.1016/j.transproceed.2013.11.077.

Tsuchida T*, Zheng YW*, Zhang RR, Takebe T, Ueno Y, Sekine K, Taniguchi H. The development of humanized liver with Rag1 knockout rats. *Transplant Proc* 2014,

46, 1191-3 (*equal contribution) 査読有
DOI:10.1016/j.transproceed.2013.12.026.

Zhang RR, Takebe T, Sekine K, Koike H, Zheng YW, Taniguchi H. Identification of Proliferating Human Hepatic Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Transplant Proc* 2014, 46(4):1201-4 査読有
DOI:10.1016/j.transproceed.2013.12.021.

Takebe T, Koike N, Sekine K, Fujiwara R, Amiya T, Zheng YW and Taniguchi H. Engineering of human hepatic tissue with functional vascular networks. *Organogenesis* 2014, 10(2)/Epub ahead of print 査読有

DOI:10.4161/org.27590

Zheng YW*, Nie YZ*, Taniguchi H. Cellular Reprogramming and Hepatocellular Carcinoma Development. *World J Gastroenterol* 2013, 19(47):8850-60 (*equal contribution) (invited review) 査読有

DOI:10.3748/wjg.v19.i47.8850.

Liu NM, Yokota T, Maekawa S, Lü P, Zheng YW, Taniguchi H, Yokoyama U, Kato T, Minamisawa S. Transcription profiles of endothelial cells in the rat ductus arteriosus during a perinatal period. *PLoS ONE* 2013, 8(9):e73685 査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0073685

Tanaka H, Tanaka S, Sekine K, Kita S, Okamura A, Takebe T, Zheng YW, Ueno Y, Tanaka J, Taniguchi H: The generation of pancreatic β -cell spheroids in a simulated microgravity culture system. *Biomaterials* 2013, 34(23):5785-91. 査読有

DOI:10.1016/j.biomaterials.2013.04.003.

Sun L, Moritake T, Zheng YW, Suzuki K, Gerelchuluun A, Hong ZS, Zenkoh J, Taniguchi H, Tsuboi K. In vitro stemness characterization of radioresistant clones isolated from a medulloblastoma cell line ONS-76. *J Radiat Res* 2013, 54(1):61-9. 査読有

DOI: 10.1093/jrr/rrs078

Zheng YW, Tsuchida R, Taniguchi H: A novel concept of identifying precancerous cells to enhance anti-cancer therapies. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2012, 19(6):621-5. (invited review) 査読有

DOI: 10.1007/s00534-012-0546-2

Koike H, Kubota K, Sekine K, Takebe T, Ouchi R, Zheng YW, Ueno Y, Tanigawa N, Taniguchi H. Establishment of automated culture system for murine induced pluripotent stem cells. *BMC Biotechnol* 2012, 12(1):81. 査読有

DOI: 10.1186/1472-6750-12-81.

Takebe T, Koike N, Sekine K, Enomura M, Ueno Y, Zheng YW, Taniguchi H: Generation of human vascular network in vitro. *Transplant Proc* 2012, 44(4):1130-3.

査読有

DOI:10.1016/j.transproceed.2012.03.039.
Takebe T, Sekine K, Suzuki Y, Enomura M, Tanaka S, Ueno Y, Zheng YW, Taniguchi H: Self-organization of human hepatic organoid by recapitulating organogenesis in vitro. *Transplant Proc* 2012, 44(4):1018-20. 査読有

DOI:10.1016/j.transproceed.2012.02.007.
Kobayashi S, Takebe T, Zheng YW, Mizuno M, Yabuki Y, Maegawa J, and Hideki Taniguchi: Presence of cartilage stem/progenitor cells in adult mice auricular perichondrium. *PLoS ONE* 2011, 6(10): e26393. 査読有

DOI:10.1371/journal.pone.0026393.
Kobayashi S, Takebe T, Inui M, Iwai S, Kan H, Zheng YW, Maegawa J, Taniguchi H: Reconstruction of human elastic cartilage by a CD44+ CD90+ stem cell in the ear perichondrium. *PNAS* 2011, 108: 14479-84. 査読有

DOI:10.1073/pnas.1109767108.
Li B*, Zheng YW*, Sano Y, Taniguchi H: Evidence for Mesenchymal-Epithelial Transition Associated with Mouse Hepatic Stem Cell Differentiation. *PLoS ONE* 2011, 6(2): e17092. (*equal contribution) 査読有
DOI:10.1371/journal.pone.0017092.

Ishikawa M, Sekine K, Okamura A, Zheng YW, Ueno Y, Koike N, Tanaka J, Taniguchi H: Reconstitution of hepatic tissue architectures from fetal liver cells obtained from a three-dimensional culture with a rotating wall vessel bioreactor. *J Biosci Bioeng* 2011, 111(6):711-8. 査読有
DOI:10.1016/j.jbiosc.2011.01.019.

〔学会発表〕(計 19件)

谷口英樹: iPS細胞を用いた代謝性臓器の創出技術開発拠点 第13回日本再生医療学会総会 シンポジウム Mar.4-6,2014 京都

Zhang RR, Takebe T, Zheng YW et al: Generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. The 13th Congress of the Asian Society of Transplantation. Sep. 2-6, 2013. Kyoto, Japan.

Zhang RR, Zheng YW, Takebe T et al: Liver repopulation and replacement in a diphtheria toxin-induced liver damage model with human proliferative hepatocytes. International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 11th Annual Meeting. June 12-15, 2013. Boston, MA, USA.

Tsuchida T, Zheng YW, et al: Generation of the rats with humanized liver. The 13th Congress of the Asian Society of Transplantation. Sep. 2-6, 2013. Kyoto,

Japan.

Takebe T et al: Creation of vascularized and functional human liver from an induced pluripotent stem cell-derived organ bud transplant. The 13th Congress of the Asian Society of Transplantation. Sep. 2-6, 2013. Kyoto, Japan.

Zheng YW et al: Flow cytometric identification and characterization of endothelial progenitor cells in human umbilical vein endothelial cells. The 13th Congress of the Asian Society of Transplantation. Sep. 2-6, 2013. Kyoto, Japan.

谷口英樹: iPS細胞からヒト臓器を作る! - 如何にして器官発生を模倣するのか? - 第31回日本肝移植研究会招待講演 Jul.4-5,2013 熊本県

谷口英樹: iPS細胞からヒト臓器を作る! - 薬剤評価系への波及効果 - 日本動物実験代替法学会第25回大会招待講演 Dec.8,2012 東京都

谷口英樹: ヒトiPSを用いたファーマコセロミクス基盤技術の開発 第127回日本薬理学会関東部会 シンポジウム Oct.20,2012 東京都

Zheng YW et al: High-expression of cancer stem cell markers is associated with poor prognosis in colorectal cancer.第71回日本癌学会学術総会 2012年9月19-21日 札幌

Tsuchida T, Zheng YW et al: The acyclic retinoid peretinoin inhibits the development of precancerous cells to block hepatocellular carcinogenesis in rats. 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月19-21日 札幌

Zhang RR, Zheng YW et al: Generation of almost complete liver replacement with SCID-Alb-TRECK-Tg mice.第12回日本再生医療学会総会 2013年3月21-23日 横浜

Zheng YW et al: Identifying precancerous cells to enhance anti-cancer therapies. BIT's 10th Annual Congress of International Drug Discovery Science and Technology. Nov 8-10, 2012. Nanjing, China.

Zheng YW et al: SELF-RENEWAL VERSUS DIFFERENTIATION AS WELL AS THE LIVER REPOPULATION CAPABILITY OF HUMAN HEPATIC STEM CELLS. International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 10th Annual Meeting. June 13-16, 2012. Yokohama, Japan.

Tsuchida T, Zheng YW et al: BLOCK HEPATOCELLULAR CARCINOGENESIS OF RATS BY REMOVAL OF PRECANCEROUS CELLS WITH AN ACYCLIC RETINOID. International Society for Stem Cell Research (ISSCR)

10th Annual Meeting. June 13-16, 2012. Yokohama, Japan.

Zheng YW et al: CONSTRUCTION OF CHIMERIC MICE WITH HUMAN IMMATURED HEPATOCYTES. Zhang RR, International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 10th Annual Meeting. June 13-16, 2012. Yokohama, Japan.

谷口英樹：消化管における幹細胞研究の現状と展望 第47回日本移植学会招待講演 Oct.4-6,2011 宮城県

Akimoto K, Zheng YW et al: aPKC regulates mammary luminal progenitor cell propagation and its disruption involves in tumor initiation 第70回日本癌学会学術総会 2011年10月3-5日 名古屋

Ozawa M, Zheng YW et al: Over-expression of cancer stem cell markers predicted poor prognosis in colorectal cancer. AACR 102nd Annual Meeting 2011, April 2-6, 2011. Orlando, Florida. USA

〔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

鄭 允文 (ZHENG, Yun-Wen)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号：80404995

(2) 研究分担者

谷口 英樹 (TANIGUCHI, Hideki)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号：70292555

武部 貴則 (TAKABE, Takanori)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：20612625

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

小澤 真由美 (KOZAWA, Mayumi)
横浜市立大学・医学研究科・大学院生

関 鴻斌 (GUAN, Hong-Bin)
横浜市立大学・医学研究科・大学院生

近藤 諒久 (KONDO, Akihisa)
横浜市立大学・医学研究科・大学院生

大田 貢由 (OTA, Mitsuyoshi)
横浜市立大学・市民総合医療センター・准教授
研究者番号：60315794

辰巳 健志 (TATSUMI, Kenji)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号：80567628

市川 靖史 (ICHIKAWA, Yasushi)
横浜市立大学・医学研究科・准教授
研究者番号：70254208

遠藤 格 (ENDO, Itaru)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号：60211091

大島 貴 (OSHIMA, Takashi)
横浜市立大学・市民総合医療センター・准教授
研究者番号：10448665

藤井正一 (FUJII, Shoichi)
横浜市立大学・市民総合医療センター・准教授
研究者番号：70326065