

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591904

研究課題名(和文)大腸癌浸潤先進部CEACAM1発現細胞を標的とした新規癌治療の開発

研究課題名(英文)Novel therapeutic strategy for CEACAM1 expressing colorectal cancer cells beyond the invasion front

研究代表者

横山 省三 (Yokoyama, Shozo)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：90398462

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌培養細胞においてCEACAM1-4S (short cytoplasmic isoform)の強制発現により、CD44の発現、ALDH活性および足場非依存性増殖が促進した。大腸癌原発巣浸潤先進部におけるCEACAM1-Sの強発現群は有意に予後不良であった。CEACAM1-4Lの強制発現およびその発現によるHollow spheroid形成にて、大腸癌培養細胞は5FUに対する感受性が低下し、逆にCEACAM1-4Sの強制発現により感受性が向上した。術後補助化学療法を施行したStage III症例においてHollow spheroid形成は再発に関する独立した危険因子であった。

研究成果の概要(英文)：Enhanced CEACAM1-4S (short cytoplasmic isoform) induced CD44 expression, increased ALDH1 activity, and anchorage independent growth of colorectal cancer cells compared with vector control, suggesting that a possibility that CEACAM1-4S induce CSC property. In clinical setting, Overexpression of CEACAM1-S (short cytoplasmic isoform) at the invasion front of colorectal cancer tissue indicated poor survival of patients. By addition of 5FU to colorectal cancer cells on plastic, CEACAM1-4L transfected HT29 cells significantly survived in comparison with CEACAM1-4S or vector control transfected cells. In 3D culture, addition of 5FU induced apoptotic burst of colorectal cancer sphere formed by CEACAM1-4S. A multivariate analysis for recurrence after curative surgery and adjuvant chemotherapy for Stage III colorectal cancer patients showed that the hollow spheroid formation beyond the invasive front is an independent risk factor.

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：CEACAM1 大腸癌 癌幹細胞様特性 抗癌剤感受性

1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞により腫瘍が形成され、さらにその細胞群により組織が形成される。逆に、転移巣など原発巣から離れた部位に組織を形成した場合、癌組織の恒常性の維持のために自己複製と分化のバランスを保つという概念に基づけば、そこにがん幹細胞が存在している可能性がある。これまでに、浸潤および分化誘導に関係する分子として、CEACAM1 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1) に着目しその浸潤転移への関与および分化誘導能について検討してきた。CEACAM1 は上皮細胞や血球系細胞、血管内皮細胞に発現する I 型膜貫通型糖蛋白であり Immunoglobulin super family および CEA family に属する接着分子である。3 個または 4 個の細胞外ドメインと long isoform (CEACAM1-L) または short isoform (CEACAM1-S) の細胞内ドメインを有する。浸潤に関する報告として、悪性黒色腫では beta3 integrin と共に浸潤を促進することが報告されており、甲状腺癌では、細胞外基質への接着が亢進し、浸潤能を高めることが報告されている。一方、CEACAM1 の腺管形成に関する報告として、乳腺上皮細胞株 MCF10F の lumen formation に CEACAM1 が関与すること (Huang J et al: *J Cell Sci* 1999)、乳癌細胞株 MCF7 に CEACAM1-4S を遺伝子導入し、3D culture (Matrigel) 中で培養すると、lumen formation を形成し、腺管内腔は apoptosis によって形成されること (Kirshner J et al: *PNAS* 2003.)、CEACAM1-4S による lumen formation は細胞内ドメインの Thr と Ser の phosphorylation によりコントロールされている (Chen CJ et al: *JBC* 2007) こと、乳癌 (MCF7) 培養細胞に CEACAM1 の強制発現させた乳癌細胞株 MCF7 が、humanized fat pad マウスモデル (*in vivo*) で上皮細胞の極性を誘導し lumen formation (分化型腺管組織) を形成する (Yokoyama S et al: *Oncogene* 2007) ことを報告してきた。さらに、前立腺癌 (PC-3) 培養細胞に CEACAM1 を強制発現させることで細胞遊走を抑制し、anoikis を誘導することで lumen formation を 3 次元培養および humanized fat pad マウスモデルで誘導することを証明した (Yokoyama S et al: submitted)。一方、大腸癌において、CEACAM1 は腺腫や早期癌で発現の低下を認め、進行大腸癌原発巣では再度強く発現することが知られているが、これまでに私は、細胞内 domain specific な抗体を使うことで、CEACAM1 が進行大腸癌において浸潤先進部で再発現することを明らかにした。さらに、大腸癌発育先進部間質に CEACAM1 が強く染色される腺管の prototype である中空を伴う球体、Hollow spheroid, HS (3 次元培養やマウスモデルで観察検討されている形体形成) を発見し、

その形成が大腸癌の転移や予後に関連することを明らかにした。この中空を伴う球体は原発巣から離れた発育先進部間質に存在し、組織形成を開始していると考えられる。前述したように、がん幹細胞が組織において癌組織の恒常性の維持のために自己複製と分化のバランスを保つという役割を果たすと考えると、この中空を伴う球体形成内にがん幹細胞が存在している可能性がある。これまでにわれわれは、免疫組織学的染色により、この大腸癌発育先進部間質に浸潤性に存在する腺管の内腔が CD133 で染色されることを確認している。さらに、preliminary な data として CEACAM1 を遺伝子導入した大腸癌培養腫瘍株 HT29 を 3 次元培養にて組織構築させたのちに、5FU で処理し apoptosis について検討したところ、CEACAM1-4S (short cytoplasmic domain isoform) を遺伝子導入した HT29 が 5FU 添加により apoptosis が引き起こされることを確認した。

2. 研究の目的

がん幹細胞が組織構築する初期の段階での癌制御により、転移形成を抑制することが可能となる。われわれは CEACAM1 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1) による腺管形成の検討から大腸癌発育先進部間質に CEACAM1 が強く染色される腺管の prototype である中空を伴う球体を見出し、大腸癌の転移、予後と関連することを明らかにした。この大腸癌発育先進部間質に存在する腺管の解析により、がん幹細胞が組織形成する段階である初期の転移巣形成のメカニズムを明らかにすること、また、がん幹細胞自体がもつ放射線や抗がん剤に対する抵抗性のみでなく、組織構築による抵抗性をも検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) CEACAM1 発現によるがん幹細胞様特性誘導に関する研究

【基礎的研究】

CEACAM1 の発現と、その細胞内ドメイン isoform balance が癌幹細胞誘導に関与するかを検討するために、大腸癌細胞株を用いて基礎的検討を行った。CEACAM1 を中等度発現する大腸癌細胞 HT29 と HCT116 を使用した。HT29 細胞および HCT116 細胞に CEACAM1-4L, CEACAM1-4S を強制発現させ、HT29 細胞の CEACAM1 細胞内ドメイン isoform balance を変化させ、Flow cytometry にてがん幹細胞マーカー、CD44、CD133、ALDH 活性について検討した。また、がん幹細胞様特性である足場非依存性増殖について、anchorage independent assay にて確認した。

【臨床的研究】

<対象>

1999 年から 2008 年に和歌山県立医科大学

第2外科にて、大腸癌肝転移に対して手術を施行した67例を対象とした。

<方法>

大腸癌原発巣および肝転移巣のホルマリン固定パラフィン包埋保存された標本から薄切切片を作成した。

一次抗体に CEACAM1-long cytoplasmic domain(CEACAM1-L) または CEACAM1-short cytoplasmic domain(CEACAM1-S) に特異的な抗体 (Dr. JE. Shively, City of Hope, CA, USA より提供) を用いて免疫組織化学染色を施行し、生存率について検討した。統計学的処理として、Kaplan-Meier 法で検討した。

(2)CEACAM1 細胞内ドメイン isoform balance および大腸癌発育先進部 Hollow spheroid 形成による 5FU 感受性変化に関する検討

【基礎的研究】

<対象>

大腸癌培養細胞(HT29, LS174T)を用いた。

<方法>

大腸癌培養細胞に CEACAM1-4L または CEACAM1-4S の強制発現、CEACAM1 の強制抑制 (shRNA) を行った。遺伝子導入はリポフェクション法を用いた。5FU に対する感受性変化を2次元または3次元(Matrigel™)で観察した。

【臨床的研究】

<対象>

和歌山県立医科大学附属病院第2外科にて2002年1月~2005年1月に手術を施行した大腸癌症例314例のうち、術後補助化学療法を施行したStage III 症例82例を対象とした。

<方法>

Hollow spheroid 有無を確認し、再発および予後に関する解析を、ロジスティック回帰にて多変量解析、log rank test および Kaplan-Meier 法により生存率を解析した。

4. 研究成果

(1)CEACAM1 発現によるがん幹細胞様特性誘導に関する研究

【基礎的研究】

CEACAM1 を中等度発現する大腸癌細胞 HT29 と HCT116 に CEACAM1-4L または CEACAM1-4S を強制発現させ、CEACAM1 細胞内ドメイン isoform balance を変化させ、Flow cytometry にてがん幹細胞マーカー、CD44、CD133、ALDH 活性について検討した結果、HT29 細胞において、CEACAM1-4L および CEACAM1-4S の強制発現により、CD44 の発現が増強され、ALDH 活性が増強した。CEACAM1-4S の発現により、より強く増強された。CD133 の発現増強は認められなかった。HCT116 細胞においては、CEACAM1-4S のみが CD133、CD44 の発現の増強を認め、ALDH 活性も増強したが、CEACAM1-4L の発現においては有意な変化を認めなかった。また、がん幹細胞様特性である足場非依

存性増殖について、anchorage independent assay にて確認した結果、CEACAM1-4S の強制発現により、足場非依存性増殖が促進された。以上のことから、CEACAM1-4S の発現増強が、がん幹細胞様特性を誘導する可能性が示唆された。

【臨床的研究】

1999年から2008年に和歌山県立医科大学第2外科にて、大腸癌肝転移に対して手術を施行した67例を対象とし、原発巣と肝転移巣の CEACAM1 の発現の強さについて検討した結果、全例、肝転移巣で CEACAM1-L および CEACAM1-S の原発巣より強い発現が認められた。CEACAM1-L は全例大腸癌原発巣浸潤先進部で強い発現を認めたが、CEACAM1-S の強い群と弱い群が存在し、生存に関して比較検討したところ CEACAM1-S が浸潤先進部で強く発現していた群が有意に予後不良であった ($p<0.006$)。

(2)CEACAM1 細胞内ドメイン isoform balance および大腸癌発育先進部 Hollow spheroid 形成による 5FU 感受性変化に関する検討

【基礎的研究】

大腸癌培養細胞(HT29, LS174T)に CEACAM1-4L または CEACAM1-4S の強制発現または CEACAM1 の強制抑制 (shRNA) を行い 5FU に対する感受性変化を2次元で検討した結果、CEACAM1-4L の強制発現にて、大腸癌培養細胞 HT29 は 5FU に対する感受性が低下し、CEACAM1-4S の強制発現により感受性が向上した。LS174T 細胞においては CEACAM1-4S の強制発現または CEACAM1 の発現抑制により 5FU の感受性は増加した。3次元(Matrigel™)にて Hollow spheroid 形成をさせたのち、5FU と添加し、5FU への感受性を検討したところ、CEACAM1-4L の強発現は有意に 5FU 抵抗となった ($p<0.05$)。一方、CEACAM1-4S 強制発現により spheroid 崩壊像が優位に観察された ($p<0.001$)。

【臨床的研究】

HS 形成が治療抵抗性を示すことを明らかにするため、術後補助化学療法を施行した Stage III 症例 82 例を対象に、再発および予後に関する多変量解析を行うと、再発に関する危険因子は HS であった ($p<0.05$)。生存率を解析したところ、HS は有意に予後不良予測因子であった ($p=0.028$)。

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 3 件)

1. Kiriya S, Yokoyama S, Ueno M, Hayami S, Ieda J, Yamamoto N, Yamaguchi S, Mitani Y, Nakamura Y, Tani M, Mishra L, Shively JE, Yamaue H. CEACAM1 Long Cytoplasmic Domain Isoform is Associated with Invasion and Recurrence of Hepatocellular Carcinoma. Ann Surg Oncol. 2014 Jan 6.

[Epub ahead of print] 査読有

2. Tamura K, Yokoyama S, Ieda J, Takifuji K, Hotta T, Matsuda K, Oku Y, Watanabe T, Nasu T, Kiriyama S, Yamamoto N, Nakamura Y, Shively JE, Yamaue H. Hollow spheroids beyond the invasive margin indicate the malignant potential of colorectal cancer. *BMJ Open*. 2011 Aug 11;1(1):e000179. doi: 10.1136/bmjopen-2011-000179. 査読有

3. Ieda J, Yokoyama S, Tamura K, Takifuji K, Hotta T, Matsuda K, Oku Y, Nasu T, Kiriyama S, Yamamoto N, Nakamura Y, Shively JE, Yamaue H. Re-expression of CEACAM1 long cytoplasmic domain isoform is associated with invasion and migration of colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2011 Sep 15;129(6):1351-61. doi: 10.1002/ijc.26072. Epub 2011 May 25. 査読有

[学会発表](計 24 件)

1. 横山省三、瀧藤克也、堀田 司、松田健司、渡邊高士、三谷泰之、家田淳司、水本有紀、山上裕機: Capecitabine を用いた局所進行直腸癌に対する術前化学放射線療法. 第 80 回大腸癌研究会 2014.1.24 東京

2. Shozo Yokoyama, Junji Ieda, Naoyuki Yamamoto, Yasuyuki Mitani, Yuki Mizumoto, Katsunari Takifuji, Tsukasa Hotta, Kenji Matsuda, Takashi Watanabe, Masaji Tani and Hiroki Yamaue: Hollow spheroids beyond the invasive front indicates the malignant potential of colorectal cancer. 2014 GI Cancer Symposium 2014.1.18 San Francisco, USA

3. 横山省三、山本直之、家田淳司、瀧藤克也、堀田 司、松田健司、渡邊高士、三谷泰之、山口俊介、水本有紀、山上裕機: 新たな治療ターゲットとしての大腸癌浸潤先進部 Hollow spheroid. 第 26 回日本バイオセラピー学会 2013.12.6 盛岡

4. 横山省三、桐山茂久、上野昌樹、速水晋也、家田淳司、山本直之、山口俊介、Lopa Mishra、John E. Shively、谷 眞至、山上裕機: 肝細胞癌の浸潤・再発における CEACAM1 long cytoplasmic domain isoform dominance の役割. 第 72 回日本癌学会 2013.10.5 横浜

5. Shozo Yokoyama, Shigehisa Kiriyama, Masaki Ueno, Shinya Hayami, Junji Ieda, Naoyuki Yamamoto, Shunsuke Yamaguchi, Yasuyuki Mitani, Yasushi Nakamura, Masaji Tani, Lopa Mishra, John E. Shively, and Hiroki Yamaue: CEACAM1 long

cytoplasmic domain isoform is associated with invasion and recurrence of hepatocellular carcinoma. 23th International CEA Symposium 2013.8.16 Ohio, USA

6. 横山省三、桐山茂久、上野昌樹、山口俊介、家田淳司、速水晋也、山上裕機: CEACAM1 細胞内ドメイン isoform バランスと肝細胞癌悪性度. 第 22 回日本がん転移学会 2013.7.12 長野

7. 横山省三、山本直之、瀧藤克也、堀田 司、松田健司、渡邊高士、三谷泰之、岩本博光、山口俊介、中森幹人、岩橋 誠、山上裕機: 大腸癌浸潤先進部間質における間葉上皮転換 Hollow spheroid. 第 113 回日本外科学会 2013.4.11 福岡

8. 横山省三、瀧藤克也、堀田 司、松田健司、渡邊高士、三谷泰之、家田淳司、竹井 陽、水本有紀、山上裕機: 切除可能進行直腸癌に対する Capecitabine を用いた術前化学放射線療法. 第 55 回和歌山消化器外科談話会 2013.4.6 和歌山

9. 横山省三、家田淳司、瀧藤克也、堀田 司、松田健司、渡邊高士、三谷泰之、山本直之、岩本博光、山上裕機: 大腸癌発育先進部の Hollow Spheroid による悪性度診断. 第 9 回日本消化管学会 2013.1.29 東京

10. 横山省三、瀧藤克也、堀田 司、松田健司、渡邊高士、三谷泰之、家田淳司、岩本博光、山上裕機: 局所進行直腸癌に対する術前化学放射線療法と側方郭清. 第 78 回大腸癌研究会 2013.1.18 東京

11. 横山省三、山本直之、家田淳司、瀧藤克也、堀田 司、松田健司、渡邊高士、三谷泰之、山口俊介、山上裕機: 新たな治療ターゲットとしての大腸癌浸潤先進部間質における間葉上皮転換. 第 40 回和歌山悪性腫瘍研究会 2012.12.15 和歌山

12. 横山省三、瀧藤克也、堀田 司、松田健司、渡邊高士、三谷泰之、山本直之、岩本博光、川井 学、谷 眞至、山上裕機: Stage III 結腸癌の術後補助化学療法後の転移形式と再発因子. 第 74 回日本臨床外科学会 2012.11.30 東京

13. 横山省三、瀧藤克也、堀田 司、松田健司、渡邊高士、家田淳司、岩本博光、山上裕機: 大腸癌悪性度診断における大腸癌浸潤先進部間質における Hollow spheroid の意義. 第 67 回日本大腸肛門病学会 2012.11.16 福岡

14. 横山省三: 大腸癌浸潤先進部間質におけ

る間葉上皮転換 Hollow spheroid の臨床的意義. 第 2 回大阪紀州消化器懇話会 2012.11.10 大阪

15. 横山省三、家田淳司、瀧藤克也、堀田 司、松田健司、渡邊高士、三谷泰之、山本直之、山口俊介、山上裕機: 大腸癌先進部における中空を伴う球体形成 Hollow spheroid の臨床的意義. 第 17 回日本外科病理学会 2012.10.4 仙台

16. 横山省三、瀧藤克也、堀田 司、松田健司、渡邊高士、三谷泰之、山本直之、中森幹人、岩橋 誠、山上裕機: 切除可能進行直腸癌に対する capecitabine を用いた術前化学放射線療法: 第 67 回日本消化器外科学会 2012.7.19 富山

17. 横山省三、家田淳司、山本直之、瀧藤克也、堀田 司、松田健司、渡邊高士、三谷泰之、山口俊介、山上裕機: 大腸癌転移カスケードにおける浸潤先進部間質内での形態変化 CEACAM1 発現 Hollow spheroid . 第 21 回日本がん転移学会 2012.7.13 広島

18. Shozo Yokoyama , Shigehisa Kiriyama, Naoyuki Yamamoto, Yasuyuki Mitani, Shunsuke Yamaguchi, John E. Shively, and Hiroki Yamaue. Distribution and movement pattern of CEACAM1 and beta1 integrin -The movement like Brownian motion-. 22nd International CEA Symposium 2012.6.2 フランス

19. 横山省三、田村耕一、家田淳司、山本直之、瀧藤克也、堀田 司、松田健司、山上裕機: 大腸癌浸潤先進部における中空を伴う球体形成 Hollow spheroids の臨床的意義. 第 24 回日本バイオセラピー学会 2011.12.2 和歌山

20. 横山省三、田村耕一、家田淳司、瀧藤克也、堀田 司、松田健司、奥 善全、那須 亨、山本直之、岩本博光、津村亜矢子、川井 学、谷 眞至、内山和久、山上裕機: 大腸癌先進部における管腔を伴う球体形成 Spheroid with a hollow の臨床病理学的意義. 第 73 回日本臨床外科学会 2011.11.17 東京

21. 横山省三、田村耕一、家田淳司、瀧藤克也、堀田 司、松田健司、山本直之、山上裕機: 大腸癌先進部における CEACAM1 を発現する中空を伴う球体形成 Spheroid with a hollow の臨床的意義. 第 31 回日本分子腫瘍マーカー研究会 2011.10.2 名古屋

22. Shozo Yokoyama, Naoyuki Yamamoto, Junji Ieda, Katsunari Takifuji, Tsukasa Hotta, Kenji Matsuda, John E. Shively, and Hiroki Yamaue: Spheroid

without hollow induced by CEACAM1-4S gains chemosensitivity to 5-fluorouracil (5FU). 21st International CEA Symposium 2011.9.11 ドイツ

23. 横山省三、田村耕一、家田淳司、瀧藤克也、堀田 司、松田健司、奥 善全、桐山茂久、山本直之、山上裕機: 新たな治療ターゲットとしての大腸癌発育先進部の分化型細胞巢 第 66 回日本消化器外科学会総会 2011.7.15 名古屋

24. 横山省三、田村耕一、家田淳司、瀧藤克也、堀田 司、松田健司、山本直之、山上裕機: 大腸癌先進部における中空を伴う球体形成 Spheroid with a hollow と低分化胞巢 budding との比較 第 75 回大腸癌研究会 2011.7.8 東京

〔その他〕
ホームページ等
和歌山県立医科大学第 2 外科のホームページ (<http://www.wakayama-med.ac.jp/med/2nd-surgery/>)にて発表論文を公表している。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 省三 (YOKOYAMA, SHOZO)
和歌山県立医科大学 医学部 助教
研究者番号: 90398462

(2) 研究分担者

堀田 司 (HOTTA, TSUKASA)
和歌山県立医科大学 医学部 講師
研究者番号: 50244744

瀧藤 克也 (TAKIFUJI, KATSUNARI)
和歌山県立医科大学 医学部 講師
研究者番号: 00254540

松田 健司 (MATSUDA, KENJI)
和歌山県立医科大学 医学部 助教
研究者番号: 30398458

山上 裕機 (YAMAUE, HIROKI)
和歌山県立医科大学 医学部 教授
研究者番号: 20191190