

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591944

研究課題名(和文) SAGE法による新たな消化器癌幹細胞特異的遺伝子の同定とその機能解析

研究課題名(英文) Identification of new specific genes in esophageal and gastric cancer stem cells by SAGE method and analyses of the gene functions

研究代表者

浜井 洋一 (Hamai, Yoichi)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：90423384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：CD44を幹細胞マーカーとする食道癌、胃癌細胞株をFACSによりCD44+/-でソーティングし細胞を収集。CD44+/-細胞のmRNAを用いSAGE法で網羅的遺伝子発現解析を行い、発現の異なる遺伝子を抽出。有望遺伝子に対しRNAi法で発現抑制を行い、FACSにてSP細胞の検出を行い癌幹細胞活性を持つ細胞群の変化を観察。Cell migration assayを行い癌細胞の転移能の変化を検討。Cell invasion assayを行い浸潤能への影響について評価。細胞株に数種類の抗癌剤を接触させMTT assayにてその遺伝子発現の有無における増殖能の変化を評価した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the function of specific gene selected by serial analysis of gene expression method (SAGE) for gastric and esophageal cancer stem cell. We firstly sorted the human gastric and esophageal cancer cell line due to markers of CD44+ or - by fluorescence-activated cell sorting (FACS), and separately collected each cells with CD44+ or CD44-. Subsequently, we exhaustively analyzed and compared the gene expressions of messenger ribonucleic acid (mRNA) derived from cells with CD44+ and CD44- marker. Analyses of gene functions for a promising specific gene in cancer stem cell (CD44+ cell) selected by SAGE method was performed by RNAi method, cell migration, cell invasion, and thiazolyl blue tetrazolium bromide(MTT) assay.

研究分野：消化器外科

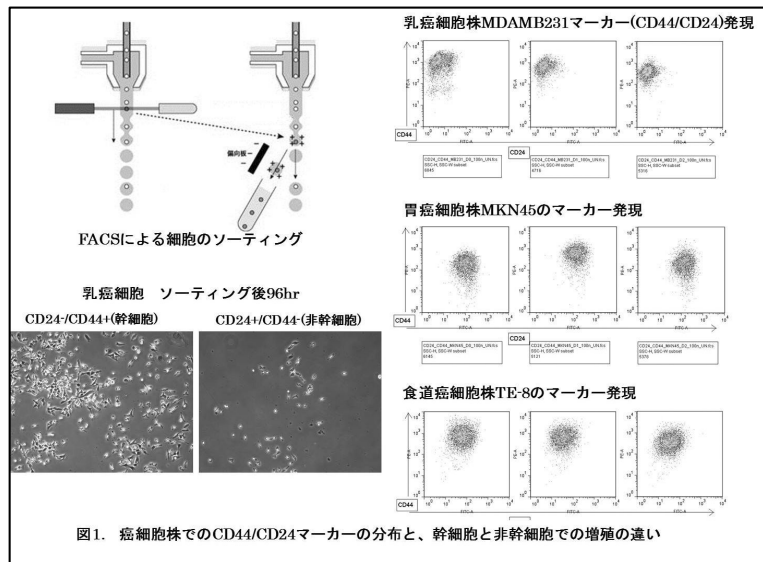
キーワード：癌幹細胞 食道癌 胃癌 SAGE法

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌組織の中には自己複製能と多分化能を持ち合わせた癌幹細胞が存在し階層性を構成している。癌幹細胞は少数の分画であるにもかかわらず、抗癌剤、放射線に対し抵抗性を有し通常癌細胞を供給する。このため、癌幹細胞は癌細胞集団全体の運命を左右する決定的な役割をもち、癌の再発・転移に深く関与している。癌根治のためには癌幹細胞の機能の解明およびそれを標的とした治療開発が必須である。

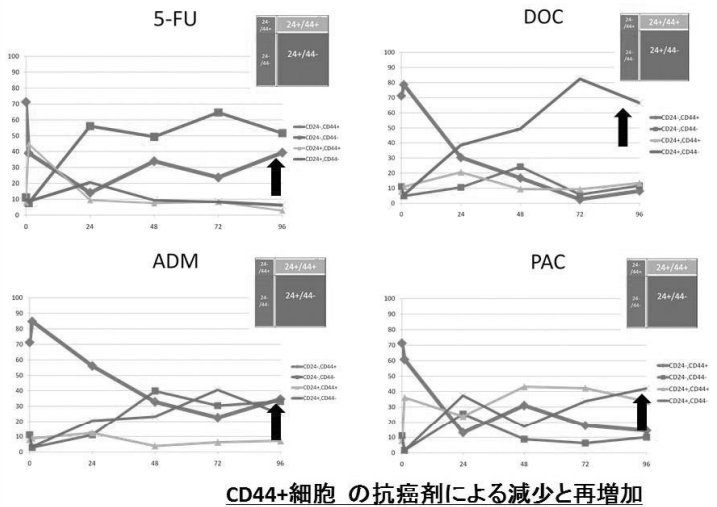
(2) 造血系腫瘍においては古くから幹細胞の概念は知られていたが、近年、固形癌においても幹細胞の研究結果が報告されている。臓器によって報告されている幹細胞マーカーが異なるが、CD44 または CD133 という2つの細胞表面抗原のいずれかが陽性という結果が大半を占めており、乳癌においては正常乳腺組織幹細胞マーカーとして導入された CD44+/CD24- 細胞集団が癌幹細胞研究のよいモデルとなっている。その他、胃癌、頭頸部癌、食道癌などにおいても CD44+ 細胞分画に癌幹細胞としての特徴(自己複製能、多分化能、腫瘍複製能、治療抵抗性)を有する細胞が存在することが指摘されている。

(3) 我々は現在まで、乳癌、食道癌、胃癌細胞株において CD44 表面抗原による癌幹細胞の FACS (fluorescence activated cell sorting) による分取(ソーティング)を行い、それらの細胞での増殖能(図1)および抗癌剤効果の比較、抗癌剤投与後の CD44+ 細胞の分布変化を検討してきた(図2)。



(4) 癌における包括的遺伝子発現解析法として代表的なものに DNA マイクロアレイと SAGE 法 (Serial Analysis of Gene Expression 法) がある。SAGE 法は未知、既知の遺伝子

乳癌細胞株での抗癌剤処理後の幹細胞マーカー分布変化



食道癌細胞株TE-8におけるDocetaxel投与によるCD44発現の変化

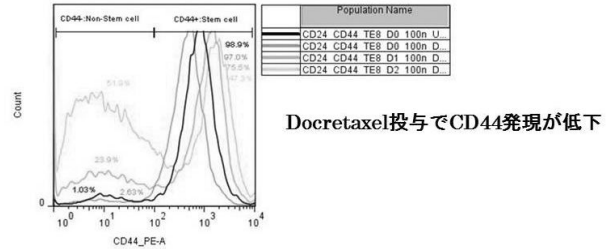


図2. 細胞株での抗癌剤処理後の幹細胞マーカー分布変化

を何万という単位で包括的に調べることが可能な手法であり、事前の mRNA 配列情報は不要である。発現解析データは定量的であり、数値化し遺伝子プロファイルを作成すれば、他の細胞との比較がコンピューター上で容易に行える。その原理は、mRNA の poly A テールから最も近いCATG から下流 10 塩基(これを名札(tag)と定義している)を PCR で増幅後、いくつも直列に連結、クローニングベクターに組み込み、シークエンスして tag の出現頻度と種類を解析するものである。tag 配列はわずか 10 塩基であるが、個々の遺伝子で特異性が高く対応する遺伝子を特定でき、tag の個数を数えればその遺伝子の発現量が分かる。

2. 研究の目的

本研究では SAGE 法を用い、食道癌および胃癌細胞株において、幹細胞および非幹細胞が含まれる CD44(+)と CD44(-)細胞群の包括的遺伝子発現解析を行い、これにより得られた複数の癌幹細胞関連遺伝子の機能解析を行う。SAGE 法にて消化器癌細胞株における CD44+/-細胞の遺伝子発現プロファイルを比較することにより、幹細胞に特異的に発現する遺伝子を複数同定することが可能である。癌幹細胞機能のさらなる解明、悪性度診断、予後予測、治療効果予測に応用可能な新たな

癌幹細胞分子マーカーの確立、癌幹細胞を標的とした治療開発につながる。

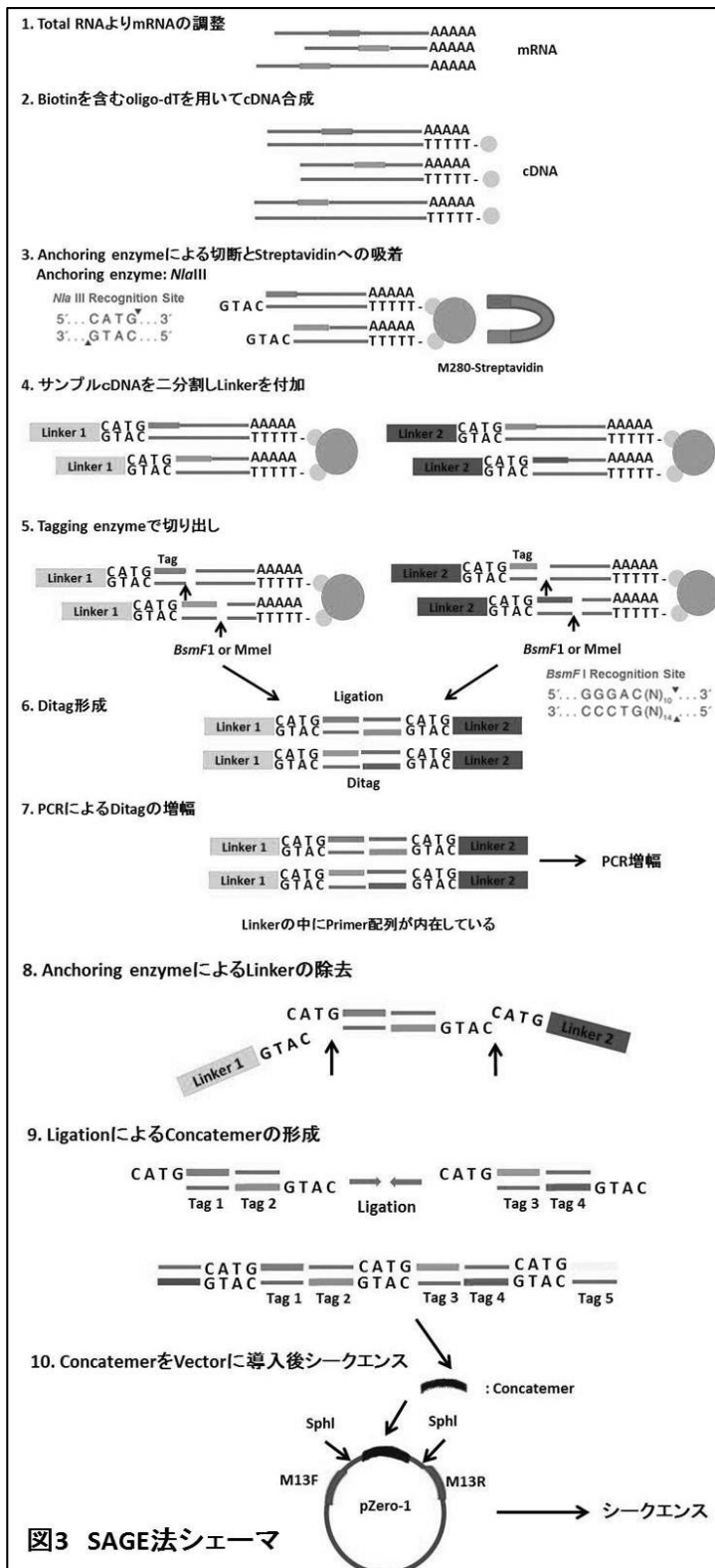
### 3. 研究の方法

(1) SAGE 法による食道癌、胃癌細胞株での遺伝子解析 (図 3)

食道癌、胃癌細胞株における CD44(+)細胞の幹細胞特性の確認

CD44(+)細胞および(-)細胞の分取、貯蓄

SAGE 法による CD44(+)細胞と CD44(-)細胞の遺伝子解析、SAGE ライブラリー作成



(2) 癌幹細胞特異的遺伝子の機能解析  
食道癌、胃癌細胞株における CD44(+)細胞、(-)細胞での発現の異なる遺伝子の抽出  
癌幹細胞特異的遺伝子の機能解析  
新規癌幹細胞関連遺伝子の同定

### 4. 研究成果

本研究の目的は SAGE 法(Serial Analysis of Gene Expression 法)による食道癌、胃癌幹細胞における包括的遺伝子発現解析、新たな癌幹細胞特異的遺伝子の同定、その遺伝子の機能解析である。これまで以下の通り研究を実施した。

(1) CD44 を癌幹細胞マーカーとしている食道癌、胃癌細胞株を FACS にて CD44+/- でソーティングする。これを複数回行うことで SAGE 法に使用する細胞の分別、収集を行った。

(2) CD44(+)と CD44(-)細胞から抽出した mRNA を用い SAGE 法により網羅的な遺伝子発現解析を行い、CD44+/-それぞれの細胞株で発現の異なる遺伝子の抽出を行った。これにより幹細胞に特異的な発現を持つ候補遺伝子の抽出が可能であり、この中から有望な遺伝子の機能解析を行った。

(3) RNAi 法 を用いて恒常的に発現抑制を行い、細胞機能の変化を検討した。FACS にて SP 細胞の検出を行い、癌幹細胞活性を持つ細胞群の変化を観察した。Cell migration assay を行い癌細胞の転移能の変化を検討した。Cell invasion assay を行い浸潤能への影響について評価した。細胞株に数種類の抗癌剤を接触させ MTT assay にてその遺伝子発現の有無における増殖能の変化を評価した。

(4) 今後、ヌードマウスを用い、これらの遺伝子発現が腫瘍増殖能に及ぼす影響について in vivo にて検証する。本研究は新規癌幹細胞分子マーカーの発見、癌幹細胞を標的とした治療開発につながる。

### 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 10 件)

- Hamai Y, Hihara J, Emi M, Murakami Y, Kenjo M, Nagata Y, Okada M. Results of Neoadjuvant Chemoradiotherapy With Docetaxel and 5-Fluorouracil Followed by Esophagectomy to Treat Locally Advanced Esophageal Cancer. *Ann Thorac Surg* (in press) 査読有
- Hamai Y, Hihara J, Taomoto J, Yamakita I,

Ibuki Y, Okada M. Effects of neoadjuvant chemoradiotherapy on postoperative morbidity and mortality associated with esophageal cancer. *Dis Esophagus*. 2015,28,358-364 査読有

3. Ibuki Y, Hamai Y, Hihara J, Taomoto J, Kishimoto I, Miyata Y, Okada M. Emergency escape surgery for a gastro-bronchial fistula with respiratory failure that developed after esophagectomy. *Surg Today*. 2015,45,369-373 査読有

4. Hamai Y, Hihara J, Taomoto J, Yamakita I, Ibuki Y, Okada M. Hemoglobin level influences tumor response and survival after neoadjuvant chemoradiotherapy for esophageal squamous cell carcinoma. *World J Surg*. 2014,38,2046-2051 査読有

5. Okita R, Miyata Y, Hamai Y, Hihara J, Okada M. Lung abscess presenting as tension pyopneumothorax in a gastrointestinal cancer patient. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2014,20,478-481 査読有

6. Hihara J, Hamai Y, Emi M, Aoki Y, Taomoto J, Miyata Y, Okada M. Esophageal bypass operation prior to definitive chemoradiotherapy in advanced esophageal cancer with tracheobronchial invasion. *Ann Thorac Surg*. 2014,97,290-295 査読有

7. Sakogawa K, Aoki Y, Misumi K, Hamai Y, Emi M, Hihara J, Shi L, Kono K, Horikoshi Y, Sun J, Ikura T, Okada M, Tashiro S. Involvement of homologous recombination in the synergism between cisplatin and poly (ADP-ribose) polymerase inhibition. *Cancer Sci*. 2013,104,1593-1599 査読有

8. Hamai Y, Hihara J, Em i M, Taomoto J, Aoki Y, Kishimoto I, Ibuki Y, Okada M. Treatment outcomes and prognostic factors for thoracic esophageal cancer with clinical evidence of adjacent organ invasion. *Anticancer Res*. 2013,33,3495-3502 査読有

9. Aoki Y, Sakogawa K, Hihara J, Emi M, Hamai Y, Kono K, Shi L, Sun J, Kitao H, Ikura T, Niida H, Nakanishi M, Okada M, Tashiro S. Involvement of ribonucleotide reductase-M1 in 5-fluorouracil-induced DNA damage in esophageal cancer cell lines. *Int J Oncol*. 2013,42,1951-1960 査読有

10. Hamai Y, Hihara J, Aoki Y, Taomoto J, Kishimoto I, Kobayashi Y, Miyata Y, Aikata H, Chayama K, Okada M. Airway stenting for tracheal obstruction due to lymph node metastasis of hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res*. 2013,33,1761-1764 査読有

〔学会発表〕(計7件)

1. 浜井洋一、檜原 淳、埜本純哉、山北伊知

子、伊富貴雄太、岡田守人. 進行食道癌に対する術前化学放射線療法の効果予測因子の検討. 第114回日本外科学会定期学術集会. 2014/4/3 京都

2. 浜井洋一、檜原 淳、埜本純哉、青木義朗、岸本伊知子、岡田守人. 食道癌術後合併症に対する術前化学放射線療法の影響と合併症予測因子の検討. 第67回日本食道学会学術集会. 2013/6/13 大阪

3. Yoichi Hamai, Jun Hihara, Junya Taomoto, Ichiko Kishimoto, Yuta Ibuki, Morihito Okada. Pre-therapeutic hemoglobin level has a significant impact on tumor response and outcome in neoadjuvant chemoradiotherapy for esophageal squamous cell carcinoma. *European Cancer Congress 2013/9/27 Amsterdam*. Netherlands.

4. 浜井洋一、檜原 淳、恵美 学、青木義朗、迫川賢士、岸本伊知子、岡田守人. 食道癌切除術後合併症に対する術前化学放射線療法の影響. 第113回日本外科学会定期学術集会. 2013/4/11 福岡

5. Yoichi Hamai, Jun Hihara, Manabu Emi, Yoshiro Aoki, Morihito Okada. Treatment outcomes and prognostic factors of thoracic esophageal cancer with clinical evidence of adjacent organ invasion. 13th World congress of the international society for diseases of the esophagus. 2012/10/15 Venice. Italia.

6. Jun Hihara, Yoichi Hamai, Ichiko Yamakita, Yuta Ibuki, Junya Taomoto, Takaoki Furukawa, Morihito Okada. Pattern of recurrence after neoadjuvant chemoradiotherapy followed by surgery in locally advanced squamous cell carcinoma of the esophagus. 14th World congress of the international society for disease of the esophagus. 2013/9/22 Vancouver. Canada.

7. Ichiko Yamakita, Jun Hihara, Yuta Ibuki, Yoshiro Aoki, Junya Taomoto, Yoichi Hamai, Manabu Emi, Morihito Okada. Phase II study of docetaxel and 5-fluorouracil with concurrent radiotherapy in patients with unresectable locally advanced esophageal cancer. 2013/9/22. Vancouver. Canada.

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

浜井 洋一 (HAMAI YOICHI)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教  
研究者番号：90423384

(2)研究分担者

岡田 守人 (OKADA MORIHITO)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授  
研究者番号：70446045

(4)研究協力者

檜原 淳 (HIHARA JUN)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・講師

研究者番号：10322744

古川 高意 (FURUKAWA TAKAOKI)

広島大学・病院・医科診療医

研究者番号：00736530

山北 伊知子 (YAMAKITA ICHIKO)

広島大学・病院・医科診療医

研究者番号：70634088