

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791450

研究課題名(和文) 消化管神経内分泌腫瘍における lumican の機能解明と新規治療薬の開発

研究課題名(英文) Elucidation of lumican and development of the new therapeutic drug for gastrointestinal neuroendocrine carcinoma

研究代表者

進士 誠一 (Shinji, Seiichi)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：80409193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：消化管神経内分泌癌(NEC)における lumican の発現と役割について検討。免疫染色では lumican は NEC の細胞質と腫瘍間質に発現。上行結腸神経内分泌癌由来の培養細胞株 NENMS-1 を用いた検討では、NENMS-1 のスフェアで Src, CD133, lumican mRNA 発現が高値で、lumican 過剰発現 NENMS-1 で細胞増殖の抑制、スフェア形成能の抑制、細胞遊走の抑制が見られた。Aldefluor assay で陽性分画と陰性分画の比較では、陽性分画で CD133 と lumican mRNA の発現が高値を示した。以上より、lumican は消化管 NEC の CSC マーカーとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that NEC contains a subpopulation of cancer stem cells (CSCs), we examined expression and role of lumican and CSC marker in gastrointestinal neuroendocrine carcinoma (NEC). Cytoplasm and tumor stroma were positively stained for lumican by immunohistochemical analysis. We used established cell line (NENMS-1) derived from ascending colon NEC cancer patient. Src, CD133 and lumican mRNA were over expressed in sphere than wild by quantitative RT-PCR analyses. Lumican-overexpressing NENMS-1 was reduced cell growth, sphere formation and cell migration compared with wild and Control-GFP. CD133 and lumican mRNA expression were high in positive compartmentation by aldefluor assay. From the above, it was suggested lumican may become a CSC marker for gastrointestinal NEC.

研究分野：消化器外科

キーワード：消化管神経内分泌癌 がん幹細胞 細胞外基質 lumican

1. 研究開始当初の背景

(1)消化管原発で内分泌系の性質と表現型を有する腫瘍は消化管神経内分泌腫瘍 (Neuroendocrine Neoplasms : NEN) と総称され、増殖能に基づき神経内分泌腫瘍 G1 (Neuroendocrine tumor: NET G1), 神経内分泌腫瘍 G2 (Neuroendocrine tumor: NET G2), 神経内分泌癌 (Neuroendocrine carcinoma: NEC) とに大きく分類され、臨床的性格は大きく異なる。NET の増殖は緩徐であり転移する頻度が低いのにに対し、NEC は急速に増殖し、早期より脈管侵襲と転移をきたし、発見時すでに約 80% の症例がリンパ節転移、約 60% の症例が肝転移を認め 1 年生存率が約 10% と内分泌細胞への分化を有するにも関わらず、著しく生物学的悪性度が高い。しかしながら、国内外を通して NET の悪性化の機構や転移能についての基礎的・臨床的研究は十分に進んでおらず、治療法の一つである化学療法に関しても古くから肺小細胞肺癌に準じたレジメン (VP16 or CPT-11 + CDDP) が行われるのみであった。最近ではソマトスタチンアナログである octreotide (Ann Oncol, 2004; 15: 966-973) やマルチターゲットのチロシンキナーゼ阻害薬である sunitinib (Digestion, 2005;71:131-140) などの分子標的治療薬の有効性が示され、徐々にではあるが NEC に対する治療法が模索されつつある。しかし、これまで樹立された神経内分泌癌培養細胞株が少なかったことなどの理由により、NET の分子生物学的特徴や治療法についての研究は殆ど進んでおらず、いまだ満足のいく治療効果は得られていない。

(2)これまでに申請者らは、消化管 NET に関して、Lumican が NET の細胞分化に関与し、増殖を抑制すること (Shinji S et al., Int J Oncol., 2005; 26: 873-80), 大腸低分化腺癌症例の中に Neuroendocrine differentiation を有し肝転移を生じやすく予後不良な群が存在すること (Shinji S et al., Int J Oncol., 2006; 29: 357-364), (Shinji S et al., in Methods of Cancer Diagnosis, Therapy and Prognosis: Volume 4 Colorectal Cancer, (M. A. Hayat, ed. Springer, 2009), PP.13-24) を共同研究者の日本医科大学統御機構・腫瘍学の Prof. Z. Naito のグループと共に報告してきた。

(3)Lumican は decorin, biglycan 等と同じ小型ロイシンリッチプロテオグリカン (Small Leucine-rich Proteoglycan: SLRP) に属しており、細胞外基質の構成因子とされている。皮膚の真皮や目の角膜には、lumican が豊富に存在しており、膠原線維の重合や配列を調整し

ている。そのため、眼科領域では角膜の創傷治療と関連して研究が進められている。

近年、lumican の腫瘍における機能に関して以下のことが報告された。

- ① 浸潤能の抑制：細胞骨格を再構築し、focal adhesion kinase phosphorylated at tyrosine-397 (pFAK) の脱リン酸化を介した浸潤能抑制 (Cancer Letters, 2009; 283: 92-100)
- ② 血管新生および細胞増殖の抑制：Fas を介して血管内皮細胞の apoptosis を誘導することで、腫瘍血管新生を抑制し腫瘍細胞の増殖を抑制 (Cancer Microenvironment, 2011; 4: 115-126)
- ③ 接着能の抑制：Osteosarcoma cell line は lumican を産生し autocrine の機構で TGF β 2 を介し細胞接着能を抑制 (Int J Biochem Cell Biol., 2011; 43: 928-935)
- ④ 遊走能の抑制：Lumican は melanoma の遊走を抑制 (Exp Cell Res., 2010;17: 2922-31)
- ⑤ 細胞分化に関与：分化度の異なる二種の osteosarcoma cell line を比較し lumican の発現量が異なり、また、lumican siRNA を用いた研究で細胞の分化に関与 (FEBS J., 2008; 275: 350-361)

2. 研究の目的

消化管神経内分泌癌は、リンパ節や肝臓へ転移しやすく手術療法だけでは予後不良な疾患で、有効な治療法はいまだ確立されていない。Lumican は細胞外基質の構成要素の一つである小型ロイシンリッチプロテオグリカンで、膠原線維の重合や配列の調節に関与している。近年、melanoma, osteosarcoma などで lumican が腫瘍細胞の遊走・接着・増殖に抑制的に働くことが明らかにされた。これまでに我々は、lumican の発現は消化管神経内分泌腫瘍の分化度や増殖能の抑制に関与することを報告してきた。今回、消化管神経内分泌癌における lumican のさらなる機能解明を行うことで新規治療薬としての可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1)免疫組織化学染色：手術で摘出された大腸の神経内分泌癌、神経内分泌分化を伴う腺癌、カルチノイドの病理組織標本を用い CSC マーカーと Lumican の免疫染色を行った。

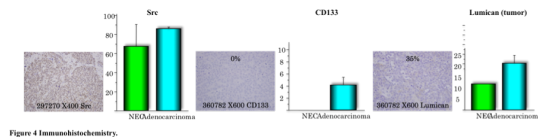
(2)樹立された神経内分泌癌培養細胞株 (NENMS-1) を用いてスフィア形成法を行い CSC マーカーと lumican, Src 遺伝子の発現状況を確認した。

(3)NENMS-1 に lumican 発現ベクターを遺伝子導入し lumican の発現量と個々の形態

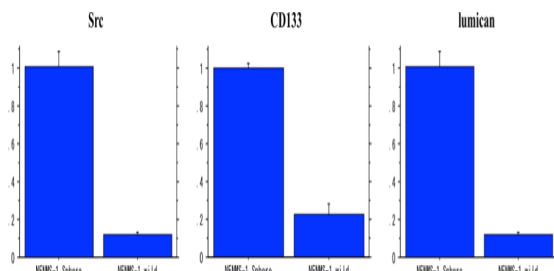
の特徴と細胞増殖能・遊走能・細胞接着能との関連を調べた。

4. 研究成果

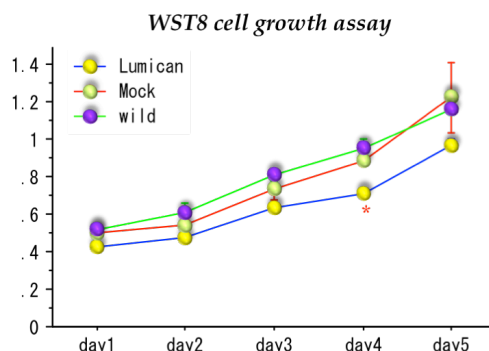
(1)大腸の神経内分泌癌，神経内分泌分化を伴う腺癌，カルチノイドの病理組織切片を用い，腫瘍細胞における CSC マーカーと Lumican の発現を検討した結果，神経内分泌癌において CD24 の発現が高い傾向にあった。Lumican は NEC の細胞質，および腫瘍間質に発現を認めた。



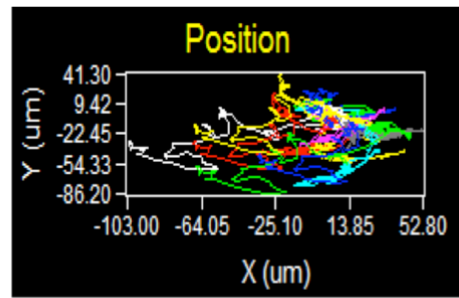
(2)上行結腸神経内分泌癌由来の培養細胞株 NENMS-1 を用い基礎的検討を行った。CSC の性質を確認する方法の一つであるスフェア形成法を行ったところ，NENMS-1 のスフェアでは Src, CD133 といった幹細胞マーカーとともに，lumican の発現が高値を示した。



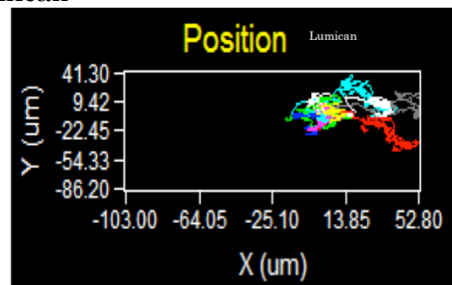
(3)NENMS-1 に lumican 発現ベクターを遺伝子導入し，lumican 過剰発現細胞を作成したところ，lumican 過剰発現 NENMS-1 では細胞増殖の抑制，スフェア形成能の抑制，細胞遊走の抑制が見られた。



Single-cell migration assay
Mock



Lumican



(4)NENMS-1 を用い Aldefluor assay で陽性分画と陰性分画を real time PCR にて比較したところ，陽性分画では CD133 と lumican の発現が高値を示した。

以上より，lumican は，消化管 NEC の CSC マーカーとなる可能性が示唆された。

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 件)

[学会発表] (計 3 件)

① 進士誠一，松田陽子，内田英二. 消化管神経内分泌癌におけるがん幹細胞マーカーの同定と lumican の役割. JDDW2014, 2014年10月25日，ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)

② 進士誠一，松田陽子，石渡俊行，菅隼人，山田岳史，小泉岐博，山岸杏彌，原敬介，吉村久志，内藤善哉，内田英二. 消化管神経内分泌癌培養細胞の樹立とがん幹細胞マーカーの同定. 第114回日本外科学会定期学術集会，2014年4月4日，京都国際会議場(京都府・京都市)

③ 進士誠一，松田陽子，石渡俊行，菅隼人，山田岳史，小泉岐博，山岸杏彌，原敬介，吉村久志，内藤善哉，内田英二. 大腸神経内分泌癌におけるがん幹細胞マーカー. 第80回大腸癌研究会，2014年1月24日，都市センターホテル(東京都・千代田区)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況（計 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 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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

進士 誠一 (SHINJI, Seiichi)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：80409193

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：