

様 式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460417

研究課題名(和文) 胃分化型腺癌における基底膜接着幹細胞の同定および生物学的意義と胃型腸型形質発現

研究課題名(英文) Identification of gastric cancer stem cell and its association with gastric/intestinal mucin phenotype

研究代表者

大上 直秀 (Oue, Naohide)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・准教授

研究者番号：60346484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、胃癌の癌幹細胞を同定することである。胃癌細胞のスフェロイドではモノレイヤーで培養した場合と比較し、KIFC1、KIF11、IQGAP3の発現が亢進していた。KIFC1は高分化腺癌、KIF11は腸型形質の胃癌、IQGAP3は胃型形質の胃癌において特に高発現していた。これらをノックダウンするとスフェロイド形成が阻害されたことから、胃癌の癌幹細胞の形成に重要であることが示唆された。一方、食道扁平上皮癌においては放射線化学療法後の腫瘍細胞にポドプランニンが染色され、癌幹細胞のマーカーになる可能性がある。今後はKIFC1、KIF11の阻害剤の効果を検討する予定である。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to identify the gastric cancer stem cell. We found that KIFC1, KIF11, and IQGAP3 were expressed more than two-fold higher in spheroid body-forming cells than in parental cells by microarray analysis. Both the number and size of spheres from gastric cancer cells were significantly reduced upon KIFC1, KIF11, and IQGAP3 siRNA-transfection compared with negative control siRNA-transfection. Immunohistochemical analysis demonstrated that these molecules were overexpressed in gastric cancer. Gastric cancer cases positive for KIFC1 were found more frequently in intestinal type cases. Gastric cancer cases positive for KIF11 were found more frequently in intestinal mucin cases, and those positive for IQGAP3 were found more frequently in gastric mucin cases. In esophageal squamous cell carcinoma, podoplanin was expressed in chemo-radiation therapy-resistant cells. Our results showed that KIFC1, KIF11, and IQGAP3 likely plays an important role in cancer stem cell.

研究分野：分子病理学

キーワード：病理学 胃癌 癌幹細胞 KIF IQGAP3

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景として、申請者は遺伝子発現の異常を網羅的にとらえることを目的とし、胃癌組織を材料に SAGE 法で解析、多くの癌特異的遺伝子を同定し、血清マーカー、組織マーカーとしての有用性を報告してきた。分泌分子 Reg IV は腸型の粘液形質を有する胃癌(腸型胃癌)で発現しており、ステージ I の胃癌を検出できる血清腫瘍マーカーであることを示した。一方、分泌分子 olfactomedin 4 は胃型の粘液形質を有する胃癌(胃型胃癌)で高発現していた。ELISA 法での解析によって、olfactomedin 4 と Reg IV とを組み合せれば、50%以上の胃癌を検出できる高感受性マーカーであることを示した。CAST 法による膜蛋白質の解析では、デスモソームの構成分子である desmocollin 2 が胃癌で特に高発現しており、腸型形質の胃癌で発現していた。このような研究を通じ、胃癌において特徴的に高発現している分子の多くは胃型・腸型形質に関連しており、胃癌の病態解明、診断・治療戦略を構築するためには、胃型・腸型に分けて解析することが重要であるという結論に至った。

一方、癌の発生、再発過程において癌幹細胞の重要性が指摘されている。癌幹細胞は ABC トランスポーターに代表される薬剤耐性遺伝子の発現と、自己複製能等の特徴を持つ。即ち癌幹細胞は治療抵抗性であり、臨床的には腫瘍が消失しても、癌幹細胞が生存している限り再発してくると考えられている。癌幹細胞のマーカーを発現している症例は予後不良とされているが、組織学的にどのような細胞が癌幹細胞なのか実態は全く分かっていない。正常組織においては幹細胞の同定はある程度進んでおり、特に *Drosophila* においては基底膜に接着している、腸管内腔にほとんど面していない細胞が幹細胞の性質を有していることが報告されている。この細胞は基底膜接着幹細胞と呼ばれ、非対称性分裂により基底膜に接着していない前駆細胞に分裂し、分化した腸上皮細胞に分裂するというモデルが提唱されている。また、基底膜接着幹細胞は全周性にインテグリンを発現しており極性が消失していることも報告されている。申請者の前年度までの研究で、高分化型の胃癌ではこのような基底膜接着幹細胞様の腫瘍細胞は癌幹細胞のマーカーである CD133 が陽性であることを見出しており、癌幹細胞と正常組織の幹細胞は組織学的に類似していると考えている。さらにこれまでの解析で、胃型形質を有する胃癌細胞株である TMK-1 では、幹細胞の性格を有する side-population 細胞においてインテグリン $\alpha 2$ が高発現していることも明らかにしており、このような観点からも癌幹細胞と正常幹細胞はある程度共通した性質を有していると考えられる。実際のヒト胃癌組織において組織学的な観点から癌幹細胞と見なされる細胞を同定し、胃型・腸型形質を発現する分

化過程を明らかにすることは、胃癌の病態解明に必要な不可欠であり、研究が発展すれば治療戦略の構築、治療効果の判定・予測に貢献できる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、胃癌における基底膜接着幹細胞に類似した細胞の組織学的な特徴を明らかにし、胃癌の癌幹細胞を同定することである。はじめに基底膜が保たれている非浸潤性の高分化腺癌を材料に解析を行う。胃型形質と腸型形質の胃癌で幹細胞の性質が異なる可能性もあるため、胃型・腸型形質に分類し解析を行う。非癌部胃粘膜および小腸・大腸組織もあわせて解析を行う。次に既存の癌幹細胞マーカーである CD133、CD44、ALDH1 が同一の細胞に局在するか否かを検討し、組織形態学的な観点からも基底膜接着幹細胞様細胞と判定される細胞において、細胞全周性に発現するインテグリンを同定する。anaphase の癌細胞に着目し、非対称性分裂時の基底膜接着幹細胞様細胞において、胃型・腸型形質がどのように変化するかを検討する。基底膜接着幹細胞様細胞の性質が明らかになれば、基底膜を有しない浸潤性の腫瘍についても解析を行う。

これらの解析と並行し、胃癌細胞株を材料に様々なインテグリンの発現、局在を免疫染色で検討するとともに、分布、形態学的特徴を明らかにする。セルソーターを用いてインテグリン陽性細胞を分離し、細胞全周性に発現するインテグリンの種類を同定する。さらにインテグリンが全周性に発現する細胞をセルソーターで分離し、幹細胞の性格の有無について解析する。すなわち、スフェロイド形成能、マウスの皮下に移植した場合の造腫瘍能、自己複製能を評価する。蛍光ラベルされた BrdU 取込みによる非対称性分裂の解析を行い、胃型・腸型形質発現の変化を解析し、幹細胞としての性質の有無について検討する。さらに side-population 細胞との違いを明らかにするため、GeneChip を用いて遺伝子発現プロファイルを作成し、インテグリンが全周性に発現している細胞に特異的なマーカーを同定する。このような方法により、より幹細胞に特異性の高いマーカーを同定することができる。マーカー同定後は胃癌組織を材料に基底膜接着幹細胞様細胞における発現を検討する。

上記解析に加え、癌幹細胞より構成されるスフェロイドにも注目し、スフェロイド形成に関連する遺伝子の同定も行う。

3. 研究の方法

胃癌組織を材料にインテグリンの免疫染色を施行し、基底膜接着幹細胞様の細胞において全周性に染色されるインテグリンの種類を同定する。胃型・腸型マーカーとの蛍光二重免疫染色を行い、基底膜接着幹細胞様細胞と前駆細胞で胃型・腸型マーカーがどのよ

うに変化しているのかを解析する。

胃癌細胞株を材料にセルソーターでインテグリン陽性細胞を分離し、幹細胞の性質の有無を検討するとともに、GeneChipを用いて特異的マーカーを同定する。

胃癌細胞株を材料にモノレイヤーの状態 で培養したものと、スフェロイドを形成させた状態で培養したものから mRNA を抽出し、GeneChip を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、これらを比較し幹細胞が含まれているスフェロイドを形成させた状態で培養したもので発現が上昇している遺伝子を抽出し、胃癌組織における発現および分布を免疫染色で解析する。さらに siRNA でノックダウンし、スフェロイドの大きさ、数の変化について解析する。

4. 研究成果

平成 25 年度では、幹細胞の局在が明らかとなっている食道扁平上皮を材料に、幹細胞マーカーの一つであるポドプラニンの解析を行った。外科的に切除された食道扁平上皮癌 85 例を材料にポドプラニンの発現を免疫染色で検討したところ、食道非腫瘍部では幹細胞が存在すると予想されている papillary basal cell に染色された。一方、腫瘍部においては主に 3 パターンに分類された。すなわち、腫瘍胞巣の辺縁に染色されるパターン (31%)、腫瘍胞巣全体に染色されるパターン (19%)、全く染色されないパターン (51%) である。臨床病理学的因子との関連を解析した結果、ポドプラニンが腫瘍胞巣全体に染色される症例はそれ以外の症例と比較し有意にステージが進行しており、さらに予後不良であった。放射線化学療法が施行された症例についてもポドプラニンの発現を免疫染色で検討した結果、腫瘍胞巣全体に染色されるパターン、全く染色されないパターンのみが認められ、腫瘍胞巣の辺縁に染色されるパターンは認められなかった。幹細胞は放射線化学療法に対し抵抗性を示すことから、ポドプラニンが腫瘍胞巣全体に染色されるパターンにおいてはポドプラニン陽性細胞が幹細胞と考えられ、腫瘍胞巣の辺縁に染色されるパターンではポドプラニン陽性細胞は幹細胞ではないと考えられた。ポドプラニンは転写因子である SIX1 によって発現が誘導されたことから、今後は SIX1 陽性の細胞が幹細胞にどのように関わるのかを検討する予定である (論文投稿中)。

平成 26 年度からは、癌幹細胞により構成されるスフェロイドにおいて高発現する遺伝子の同定を行った。胃癌細胞株 MKN-45、MKN-74 を材料に、モノレイヤーの状態 で培養したものと、スフェロイドを形成させた状態で培養したものから mRNA を抽出し、GeneChip を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。MKN-45、MKN-74 いずれにおいてもスフェロイドにおいて発現が亢進していた遺伝子は KIF 遺伝子ファミリーであった (図 1)。KIF 遺伝

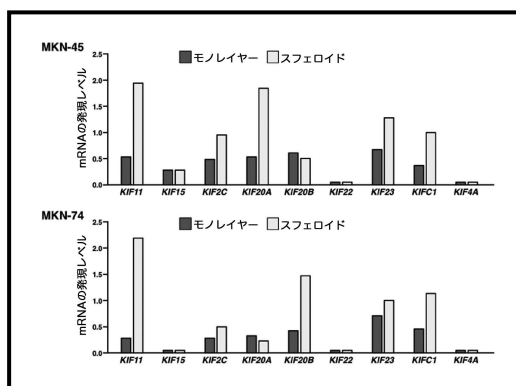


図 1 スフェロイド形成により発現が亢進している遺伝子

子はモーター蛋白質として染色体の分配に関わっているが胃癌における発現異常については解析されていない。平成 26 年度は利用可能な抗体がある KIFC1 について解析を行った。外科的に切除された胃癌 166 例を材料に KIFC1 の発現を免疫染色で解析した結果、KIFC1 は非腫瘍部胃粘膜ではほとんど染色されなかったのに対し、胃癌組織では多くの腫瘍細胞の核に染色された。合計で 59 例 (36%) の症例で陽性例を認め、臨床病理学的因子との関連を解析した結果、KIFC1 陽性例は有意に高分化腺癌が多く、予後不良であった。次に MKN-74 を材料に KIFC1 の発現を siRNA でノックダウンし、スフェロイド形成能について検討した結果、ノックダウンした細胞ではスフェロイドの数、大きさ、いずれもが低下した。以上の結果から、KIFC1 は高分化腺癌の発生に関わっていると考えられ、予後予測に有用なマーカーであることが示唆された。

平成 27 年度では、スフェロイドにおいて高発現している遺伝子である KIF11 と IQGAP3 に注目し解析を進めた。外科的に切除された胃癌 166 例を材料に KIF11 の発現を免疫染色で解析した結果、KIF11 は非腫瘍部胃粘膜ではほとんど染色されなかったのに対し、胃癌組織では多くの腫瘍細胞の核に染色された。合計で 119 例 (72%) の症例で陽性例を認め、臨床病理学的因子との関連を解析した結果、KIF11 陽性例は有意に腸型形質の胃癌を高頻度に認めた。次に MKN-74 を材料に KIF11 の発現を siRNA でノックダウンし、スフェロイド形成能について検討した。その結果、ノックダウンした細胞ではスフェロイドの数、大きさ、いずれもが低下した。以上の結果から、KIF11 は腸型形質の胃癌の発生に関わっていると考えられた。

IQGAP3 は膜貫通蛋白質で Erk のリン酸化に関わっている。小腸の幹細胞の維持に関わっていることが想定されているが、胃癌における IQGAP3 の発現解析は報告がなく、免疫染色で解析した。外科的に切除された胃癌 165 例を材料に IQGAP3 の発現を免疫染色で解析した結果、IQGAP3 は非腫瘍部胃粘膜では腺窩上皮に弱く染色されるのみであったが、胃癌

組織では腫瘍細胞の細胞膜に強い発現を認めた。合計で 34 例 (26%) の症例で陽性例を認め、臨床病理学的因子との関連を解析した結果、IQGAP3 陽性例は有意に胃型形質の胃癌であり、予後不良であった。次に MKN-74 を材料に IQGAP3 の発現を siRNA でノックダウンし、スフェロイド形成能について検討した。その結果、ノックダウンした細胞ではスフェロイドの数、大きさ、いずれもが低下した。また Erk のリン酸化も低下した。以上の結果から、IQGAP3 は胃型形質の胃癌の発生に関わっていると考えられた。

尚、KIF11、IQGAP3 いずれも基底膜接着幹細胞様細胞において発現を認めたものの、それ以外の細胞でも発現を認め、幹細胞特異的なマーカーと断定するには至らなかった。

研究期間全体を通じ、胃癌においては幹細胞形成に KIF 遺伝子群が重要であることが明らかとなった。原因はなお不明であるが、KIF 遺伝子群は正常細胞では阻害しても生存できることが知られており、癌特異的な治療標的になることが期待されている。今後は KIFC1、KIF11 の阻害剤の効果を検討する予定である。また IQGAP3 は細胞表面蛋白質であり、IQGAP3 に対する抗体を用いれば IQGAP3 陽性細胞のみを分離可能である。今後は IQGAP3 陽性細胞の生物学を検討する予定である。

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 23 件)

1. Que N, Mukai S, Imai T, Pham T, Oshima T, Sentani K, Sakamoto N, Yoshida K, Yasui W: Induction of KIFC1 expression in gastric cancer spheroids. *Oncol Rep*, in press. 査読有
2. Mukai S, Que N, Oshima T, Mukai R, Tatsumoto Y, Sakamoto N, Sentani K, Tanabe K, Egi H, Hinoi T, Ohdan H, Yasui W: Overexpression of Transmembrane Protein BST2 is Associated with Poor Survival of Patients with Esophageal, Gastric, or Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol*, in press. 査読有
3. Goto K, Ishikawa S, Honma R, Tanimoto K, Sakamoto N, Sentani K, Que N, Teishima J, Matsubara A, Yasui W: The transcribed-ultraconserved regions in prostate and gastric cancer: DNA hypermethylation and microRNA-associated regulation. *Oncogene*, in press. 査読有
4. Oo HZ, Sentani K, Mukai S, Hattori T, Shinmei S, Goto K, Sakamoto N, Naito Y, Anami K, Trang PT, Yanagihara K, Que N, Yasui W: Fukutin, identified by the Escherichia coli ampicillin secretion trap (CAST) method, participates in tumor

progression in gastric cancer. *Gastric Cancer*, 19:443-52, 2016. 査読有

5. Anami K, Que N, Noguchi T, Sakamoto N, Sentani K, Hayashi T, Naito Y, Oo HZ, Yasui W: TSPAN8, identified by Escherichia coli ampicillin secretion trap, is associated with cell growth and invasion in gastric cancer. *Gastric Cancer*, 19:370-80, 2016. 査読有

6. Hibino Y, Sakamoto N, Naito Y, Goto K, Oo HZ, Sentani K, Hinoi T, Ohdan H, Que N, Yasui W: Significance of miR-148a in Colorectal Neoplasia: Downregulation of miR-148a Contributes to the Carcinogenesis and Cell Invasion of Colorectal Cancer. *Pathobiology*, 82:233-41, 2015. 査読有

7. Naito Y, Que N, Pham TT, Yamamoto M, Fujihara M, Ishida T, Mukai S, Sentani K, Sakamoto N, Hida E, Sasaki H, Yasui W: Characteristic miR-24 Expression in Gastric Cancers among Atomic Bomb Survivors. *Pathobiology*, 82:68-75, 2015. 査読有

8. Que N, Sentani K, Sakamoto N, Yasui W: Clinicopathologic and molecular characteristics of gastric cancer showing gastric and intestinal mucin phenotype. *Cancer Sci*, 106:951-8, 2015. 査読有

9. Goto K, Que N, Hayashi T, Shinmei S, Sakamoto N, Sentani K, Teishima J, Matsubara A, Yasui W: Oligophrenin-1 is associated with cell adhesion and migration in prostate cancer. *Pathobiology*, 81:190-8, 2014. 査読有

10. Naito Y, Yasuno K, Tagawa H, Sakamoto N, Que N, Yashiro M, Sentani K, Goto K, Shinmei S, Oo HZ, Yanagihara K, Hirakawa K, Yasui W: MicroRNA-145 is a potential prognostic factor of scirrhous type gastric cancer. *Oncol Rep*, 32:1720-6, 2014. 査読有

11. Shinmei S, Sentani K, Hayashi T, Sakamoto N, Goto K, Zarni Oo H, Naito Y, Teishima J, Matsubara A, Que N, Kuniyasu H, Yasui W: Identification of PRL1 as a novel diagnostic and therapeutic target for castration-resistant prostate cancer by the Escherichia coli ampicillin secretion trap (CAST) method. *Urol Oncol*, 32:769-78, 2014. 査読有

12. Oo HZ, Sentani K, Sakamoto N, Anami K, Naito Y, Uraoka N, Oshima T, Yanagihara K, Que N, Yasui W: Overexpression of ZDHHC14 promotes migration and invasion of scirrhous type gastric cancer. *Oncol Rep*, 32:403-10, 2014. 査読有

13. Oo HZ, Sentani K, Sakamoto N, Anami K, Naito Y, Oshima T, Yanagihara K, Que N, Yasui W: Identification of novel

transmembrane proteins in scirrhus-type gastric cancer by the Escherichia coli ampicillin secretion trap (CAST) method: TM9SF3 participates in tumor invasion and serves as a prognostic factor. Pathobiology, 81:138-48, 2014. 査読有

14. Sakamoto N, Naito Y, Que N, Sentani K, Uraoka N, Zarni Oo H, Yanagihara K, Aoyagi K, Sasaki H, Yasui W: MicroRNA-148a is downregulated in gastric cancer, targets MMP7, and indicates tumor invasiveness and poor prognosis. Cancer Sci, 105:236-43, 2014. 査読有

15. Naito Y, Sakamoto N, Que N, Yashiro M, Sentani K, Yanagihara K, Hirakawa K, Yasui W: MicroRNA-143 regulates collagen type III expression in stromal fibroblasts of scirrhus type gastric cancer. Cancer Sci, 105:228-35, 2014. 査読有

16. Uraoka N, Que N, Sakamoto N, Sentani K, Oo HZ, Naito Y, Noguchi T, Yasui W: NR1D1, which encodes nardilysin protein, promotes esophageal cancer cell invasion through induction of MMP2 and MMP3 expression. Cancer Sci, 105:134-40, 2014. 査読有

17. Que N, Anami K, Schetter AJ, Moehler M, Okayama H, Khan MA, Bowman ED, Mueller A, Schad A, Shimomura M, Hinoi T, Aoyagi K, Sasaki H, Okajima M, Ohdan H, Galle PR, Yasui W, Harris CC: High miR-21 expression from FFPE tissues is associated with poor survival and response to adjuvant chemotherapy in colon cancer. Int J Cancer, 134:1926-34, 2014. 査読有

18. Sentani K, Matsuda M, Que N, Uraoka N, Naito Y, Sakamoto N, Yasui W: Clinicopathological significance of MMP-7, laminin γ 2 and EGFR expression at the invasive front of gastric carcinoma. Gastric Cancer, 17:412-22, 2014. 査読有

19. Que N, Naito Y, Hayashi T, Takigahira M, Kawano-Nagatsuma A, Sentani K, Sakamoto N, Zarni Oo H, Uraoka N, Yanagihara K, Ochiai A, Sasaki H, Yasui W: Signal peptidase complex 18, encoded by SEC11A, contributes to progression via TGF- α secretion in gastric cancer. Oncogene, 33:3918-26, 2014. 査読有

20. Reynolds A, Wharton N, Parris A, Mitchell E, Sobolewski A, Kam C, Bigwood L, El Hadi A, Münsterberg A, Lewis M, Speakman C, Stebbings W, Wharton R, Sargen K, Tighe R, Jamieson C, Hernon J, Kapur S, Que N, Yasui W, Williams MR: Canonical Wnt signals combined with suppressed TGF β /BMP pathways promote renewal of the native human colonic epithelium. Gut, 63:610-21, 2014. 査読有

21. Goto K, Que N, Shinmei S, Sentani K,

Sakamoto N, Naito Y, Hayashi T, Teishima J, Matsubara A, Yasui W: Expression of miR-486 is a potential prognostic factor after nephrectomy in advanced renal cell carcinoma. Mol Clin Oncol, 1:235-240, 2013. 査読有

22. Akagi I, Okayama H, Schetter AJ, Robles AI, Kohno T, Bowman ED, Kazandjian D, Welsh JA, Que N, Saito M, Miyashita M, Uchida E, Takizawa T, Takenoshita S, Skaug V, Møllerup S, Haugen A, Yokota J, Harris CC: Combination of protein coding and noncoding gene expression as a robust prognostic classifier in stage I lung adenocarcinoma. Cancer Res, 73:3821-32, 2013. 査読有

23. Sentani K, Sakamoto N, Shimamoto F, Anami K, Que N, Yasui W: Expression of olfactomedin 4 and claudin-18 in serrated neoplasia of the colorectum: a characteristic pattern is associated with sessile serrated lesion. Histopathology, 62:1018-27, 2013. 査読有

〔学会発表〕(計6件)

1. 大上直秀: SAGE法・CAST法から同定した胃癌関連マーカーとその意義. 第35回日本分子腫瘍マーカー研究会、2015年10月7日、「名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)」

2. Que N: Significance of KIF18A in spheroid formation of gastric cancer cells. AACR Annual Meeting 2015, April 18-22, 2015, 「Philadelphia (USA)」

3. Que N: Significance of spheroid formation associated genes in gastric cancer. The 8th International Conference of the International Society of Gastroenterological Carcinogenesis、2014年11月13-14日、「ホテル日航福岡(福岡県・福岡市)」

4. 大上直秀: SAGE法・CAST法から明らかとなった胃癌における分泌および細胞表面蛋白と胃型・腸型形質との関連. 第103回日本病理学会総会、2014年4月24-26日、「広島国際会議場(広島県・広島市)」

5. 大上直秀: SPC18はTGF- α の分泌を促進し胃癌の進行に関与する. 第86回日本胃癌学会総会、2014年3月20-22日、「パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)」

6. 大上直秀: 食道扁平上皮癌におけるpodoplaninおよび分化マーカーの発現と予後との関連. 第22回日本がん転移学会学術集会・総会、2013年7月11-12日、「ホテルブエナビスタ(長野県・松本市)」

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/byori1/in dex.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

大上 直秀 (OUE, Naohide)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・
准教授

研究者番号： 6 0 3 4 6 4 8 4