

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：81303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640073

研究課題名(和文)新規がん幹細胞マーカーCD274とその幹細胞性維持機構

研究課題名(英文)Role of CD274 in cancer stem cell of cholangiocarcinoma

研究代表者

椎名 正明 (SHIINA, Masaaki)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・その他部局等・研究員

研究者番号：50455820

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)：胆道癌において、CD274は機能的にがん幹細胞維持機構に関与しており、その機構にはALDH活性・細胞周期・ROS産生といったものが関与することが示唆された。また、臨床症例の解析からCD274低発現胆道癌においては予後が悪いことが判明し、実際の胆道癌症例においてもCD274が重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We demonstrate that CD274-low population in cholangiocarcinoma cells have high tumorigenicity, high ALDH activity, low ROS production. Furthermore, CD274 low group in cholangiocarcinoma patients shows poorer prognosis when compared with the CD274 high group. These data strongly suggest that CD274 plays pivotal roles in cancer stem cells of cholangiocarcinoma.

研究分野：消化器病学

キーワード：がん幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

胆管癌は、現在でも最も予後不良な癌種の一つであり、外科手術を中心とした限られた治療手段しか取り得ない。これは早期発見が困難であると共に、放射線や抗癌剤に対して比較的不応性であることが影響している。近年、がん細胞集団の中に「がん幹細胞(Cancer Stem Cell: CSC)」の存在が示唆されている。このがん幹細胞は抗癌剤や放射線照射に対して強い耐性を持ち、治療抵抗性の主因を担っているとされている。従って、効果的ながん治療法の開発には、がん幹細胞の同定とその性状維持に関わる特異的な遺伝子ならびに機能分子の解析が必要不可欠である。我々は、これまで下咽頭癌におけるがん幹細胞を同定してきた。申請者は、胆管癌細胞株を用いて、既知のがん幹細胞マーカーで分画し、NOG マウスに接種して造腫瘍能を比較した。その結果、造腫瘍能の高い分画と低い分画を同定することができ、更にその分画をマイクロアレイで検討したところ、CD274 が候補遺伝子として同定された。実際に CD274 発現で分画し NOG マウスに接種したところ、CD274<sup>low</sup> の分画が免疫不全マウスにおいて著明な造腫瘍能を獲得することを見いだした。

## 2. 研究の目的

本申請課題では、我々が独自に同定したがん幹細胞マーカーCD274 を用いて、胆管癌におけるがん幹細胞性維持機構の解析を行う。さらに、このマーカーを手がかりとして、新たながん幹細胞関連因子の同定を試み、がん幹細胞の分子病理を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) ALDH 活性の解析

がん幹細胞は ALDH (aldehyde dehydrogenase) 活性が高いことが知られている。Aldefluor assay kit を用いて、CD274

の発現によって ALDH 活性が変化するかを検討する。

### (2) 細胞周期の解析

がん幹細胞は静止期に存在することが知られている。そこで、CD274 の発現と細胞周期との関係を検討する。

### (3) 細胞内の ROS の測定

がん幹細胞は細胞内の ROS が低い状態に保たれていることが知られている。そこで、CD274 の発現と ROS の量の関連を FACS で検討する。

### (4) CD274 の機能性に関する検討

CD274 が機能的にがん幹細胞維持機構に関わっているかは不明である。そこで shRNA を用いて CD274 をノックダウンし、がん幹細胞性に変化が生じるかどうかを検討する。

### (5) CD274 と予後との関連

これまで知られているがん幹細胞マーカーは、その発現が高いと予後が悪いことが知られている。そこで、胆道癌症例において CD274 の発現が予後に影響するかどうかを検討するために、CD274 の免疫染色を行い、overall survival との関連を検討する。

## 4. 研究成果

(1)胆管癌細胞株 RBE を、CD274 高発現と低発現でソーティングを行い、aldefluor assay を用いて ALDH 活性を比較したところ、CD274<sup>low</sup> の分画において ALDH 活性が高いことが分かった。

(2)胆管癌細胞株 RBE を、CD274 高発現と低発現でソーティングを行い、Ki67 と propidium iodide で染色して細胞周期の解析を FACS で行ったところ、CD274<sup>low</sup> の分画では G0 期に偏在していることが判明した。

(3)胆管癌細胞株 RBE を、CD274 高発現と低発現を区別し、細胞内の ROS を DCF を用いて測定したところ、CD274<sup>low</sup> の分画では ROS 量が低回していることが判明した。

(4)胆管癌細胞株 RBE を、shRNA を用いて CD274 をノックダウンした。その結果、造腫瘍能は低下し、G0 期の細胞は増加し、ALDH 活性は上昇した。

(5)胆道癌手術検体 91 症例を、CD274 で免疫染色を行った。染色の結果、高発現と低発現の二群に分類し、生存日数との関連を比較した。その結果、CD274 低発現症例では有意に生存日数が短いことが判明した。

以上のことから、CD274 は機能的にがん幹細胞維持機構に関与しており、その機構には ALDH 活性・細胞周期・ROS 産生といったものが関与することが示唆された。また、臨床症例の解析から CD274 低発現胆道癌においては予後が悪いことが判明し、実際の胆道癌症例においても CD274 が重要な役割を果たすことが示唆された。

また、これらの結果を踏まえて、CD274<sup>low</sup> の分画に高発現する遺伝子を探索し、候補となる分子を同定した。現在この分子の機能解析を行っている。

#### 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 1 件)

1. Suppressive expression of CD274 increases tumorigenesis and cancer stem cell phenotypes in cholangiocarcinoma, K. Tamai, M. Nakamura, M. Mizuma, M. Mochizuki, M. Yokoyama, H. Endo, K. Yamaguchi, T. Nakagawa, M. Shiina, M. Unno, K. Muramoto, I. Sato, K. Satoh, K. Sugamura, N. Tanaka, Cancer Sci (2014) 105 667-674. 10.1111/cas.12406

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：  
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

2014 年 6 月 9 日、当研究所のホームページ上において、当該研究成果が論文発表された旨を掲載した。

<http://www.miyagi-pho.jp/mcc/kenkyu/index.html>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

椎名正明 (SHIINA, Masaaki)

宮城県立がんセンター研究所・共同研究員

研究者番号：50455820

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

玉井恵一 (TAMAI, Keiichi)

宮城県立がんセンター研究所・上席主任研究員

研究者番号：40509262

菅村和夫 (SUGAMURA, Kazuo)

宮城県立がんセンター研究所・特任部長

研究者番号：20117360