

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460933

研究課題名(和文)食道癌3次元培養モデルを用いた癌幹細胞ニッチの解析

研究課題名(英文) Analysis of cancer stem cell niche by using esophageal organotypic 3D culture system

研究代表者

小松 嘉人 (Yoshito, Komatsu)

北海道大学・大学病院・准教授

研究者番号：60333598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では食道3次元培養モデルを用いて食道扁平上皮癌(ESCC)の癌幹細胞ニッチ解析を行った。ESCCにおいては腫瘍浸潤部において癌幹細胞ニッチが形成されており、上皮間葉転換(EMT)が癌幹細胞の維持において重要な役割を有していた。間質の線維芽細胞より放出されるEGFはEMTを誘導し、腫瘍浸潤部において癌幹細胞を増幅した。EGFR阻害剤を用いることで、癌幹細胞ニッチの形成が阻害され、癌幹細胞が抑制されることを3次元培養モデルを用いて示した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed cancer stem cell niche of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) by using organotypic 3D culture system. Invasive fronts formed cancer stem cell niche in ESCC and epithelial-mesenchymal transition (EMT) had a pivotal role for maintenance of cancer stem cells. EGF released from fibroblasts induced EMT and cancer stem cells were increased in invasive fronts of ESCC. EGFR inhibitors suppressed EMT and formation of cancer stem cell niche and cancer stem cells were decreased in organotypic 3D culture.

研究分野：腫瘍学

キーワード：癌幹細胞 癌幹細胞ニッチ EGFR阻害剤 食道扁平上皮癌

1. 研究開始当初の背景

癌幹細胞の表面マーカーとして CD24、CD44、CD90、CD133、EpCAM、ALDH1 活性等が用いられているが (Cancer Cell. 21;283:2012)、食道扁平上皮癌 (ESCC) における癌幹細胞表面マーカーの報告は少ない。申請者らは複数の ESCC 細胞株を用いて、CD24Low/CD44High 細胞が ESCC における癌幹細胞であることを見出した (Gastroenterology. 142 (S1);S59:2012)。CD24Low/CD44High 細胞は間葉系細胞の形態、性質を有し、各種抗癌剤 (5FU、CCDP) に対し有意に治療抵抗性であった。ヌードマウス、ESCC 細胞株を用いた連続腫瘍移植実験では、わずか 10 個の CD24Low/CD44High 細胞で腫瘍形成が認められた。重要なことに、連続腫瘍移植実験で CD24Low/CD44High 細胞は親腫瘍と同性質 (分化度) の腫瘍を再形成した。これらの結果は ESCC において間葉系の性質を持った CD24Low/CD44High 細胞が癌幹細胞であることを示している。

申請者らは ESCC 三次元培養モデル (Nat Protoc. 7;235:2012) を用いて、ESCC の浸潤部において TGF- β を介した epithelial-mesenchymal transition (EMT) が起こっており、この EMT が ESCC の悪性度、進展に深く関与していることを報告してきた (Cancer Res. 71;6836:2011、Carcinogenesis. 31;1344:2011、Cancer Res. 70;4174:2010)。EMT を起こした間葉系癌細胞が癌幹細胞であることが示唆されており (Nat Rev Cancer. 9;265:2009)、ESCC の浸潤部において EMT を起こした間葉系癌細胞が癌幹細胞である可能性が考えられる。In vitro の実験系では TGF- β を用いて ESCC 細胞株に EMT を誘導すると、癌幹細胞である CD24Low/CD44High 細胞が著明に増加した。

興味深いことに、三次元培養で用いる線維芽細胞の種類により ESCC の間質への浸潤の程度が異なることが報告されており (Proc Natl Acad Sci U S A. 107;11026:2010)、癌間質の線維芽細胞が ESCC の EMT、浸潤を制御していることを示唆している。ESCC では浸潤部において EMT を起こした間葉系癌細胞が癌幹細胞であると考えられ、間質の線維芽細胞が癌幹細胞を維持する重要な因子である可能性がある。他の固形癌において癌幹細胞の維持、増殖に線維芽細胞が重要であることが報告されている (Cancer Metast Rev. 31;195:2012)。

以上の学術的背景および申請者らが行ってきた研究より、申請者は ESCC において線維芽細胞が癌間質との境界で癌細胞に EMT を誘導し、この EMT が癌幹細胞の維持、増殖に重要であると考えた。

2. 研究の目的

本研究は食道扁平上皮癌三次元培養モデルを用いて癌幹細胞と線維芽細胞により形成される癌間質の相互作用を解析し、癌幹細胞ニッチ形成に重要な因子を同定すること

を目的に遂行される。生体内の腫瘍の性質を維持したまま腫瘍細胞の培養が可能である食道癌三次元培養法を用いることで、癌幹細胞ニッチの癌細胞と線維芽細胞を分離した網羅的な解析が容易となる。さらに臨床検体から分離された腫瘍細胞も三次元培養法を用いることで培養可能であり、より実臨床に則した癌幹細胞ニッチの解析が可能である。本研究による食道扁平上皮癌の癌幹細胞ニッチ解析は、癌幹細胞を標的とした新たな治療法開発の萌芽となる。

3. 研究の方法

ESCC 癌幹細胞ニッチ形成に必要な線維芽細胞側因子の同定

(1) ESCC 癌幹細胞を効率良く増幅させる線維芽細胞の同定

三次元培養モデルにおいて ESCC 細胞の浸潤が軽度である皮膚線維芽細胞と高度な浸潤を誘発する ESCC 由来線維芽細胞 (Proc Natl Acad Sci U S A. 107;11026:2010) を用いて三次元培養を行う (Nat Protoc. 7;235:2012)。三次元培養から ESCC 細胞を分離し、FACS により癌幹細胞 (CD24Low/CD44High 細胞) の割合を測定する。高度な浸潤を呈する ESCC 由来線維芽細胞を用いた三次元培養では CD24Low/CD44High 細胞が効率良く増幅されていることが予想される。さらに複数の線維芽細胞を用いて三次元培養を行い、CD24Low/CD44High 細胞を効率良く増幅させる線維芽細胞を同定する。

(2) 線維芽細胞を用いた RNA シーケンシング

上述の実験(1)で同定された、三次元培養モデルにおいて CD24Low/CD44High 細胞を増幅させない線維芽細胞と著明に CD24Low/CD44High 細胞を増幅させる線維芽細胞を用いて三次元培養を行う。三次元培養のマトリックス部の線維芽細胞のみを分離し、線維芽細胞由来の total RNA および microRNA を抽出する。Total RNA からは Dynabeads[®] mRNA DIRECTTM Kit (Lifetechnologies) を用いて poly A tail を有する mRNA のみを精製する。精製された mRNA、microRNA から Ion Total RNA-Seq Kit ver. 2 (Lifetechnologies) を用いてライブラリーを作成し、次世代シーケンサー (Ion PGMTM システム、Lifetechnologies) により網羅的に解析する。ESCC 癌幹細胞ニッチ形成に重要な遺伝子、経路を同定する。

(3) 線維芽細胞を用いたサイトカインアレイ

上記の実験(2)と同様に CD24Low/CD44High 細胞を増幅させない線維芽細胞と CD24Low/CD44High 細胞を効率良く増幅させる線維芽細胞を用いて三次元培養を行う。三次元培養 14 日目に ESCC 細胞からなる上皮部分を除き、新たな培地を加えてさらに 2 日間の培養を行う。培養上清を回収し、Proteome ProfilerTM Array (Human cytokine array panel A、R&D systems) により解析し、ESCC の浸潤、癌幹細胞ニッチの形成に重要なサイトカインを同定する (Proc Natl Acad Sci U

S A. 105;2865:2008)

(4)動物実験

上記実験により同定されたサイトカインの阻害剤の効果を、マウス腫瘍移植モデルを用いて検証する。ヌードマウスに ESCC 細胞を皮下移植し、移植後 2 週目より阻害剤の投与を開始する。経時的に腫瘍サイズを測定し、腫瘍移植後 6 ~ 8 週目にマウスをと殺する。腫瘍細胞を分離し CD24Low/CD44High 細胞の割合を FACS により測定、また、SMA の免疫組織染色により線維芽細胞の活性を評価する。同様に臨床で ESCC に対して使用されている抗癌剤 (5FU, CDDP) の併用投与を行う。阻害剤により ESCC 癌幹細胞ニッチの形成が抑制され癌幹細胞が低下、抗癌剤に対する感受性が回復されることが期待される。

4 . 研究成果

線維芽細胞より放出される EGF が ESCC 細胞に EMT を誘導し、CD44High/CD24Low 癌幹細胞を増幅させることを明らかにした。3 次元培養において EGFR 阻害剤を用いると腫瘍細胞へのマトリックス内への浸潤が抑制され、ESCC において癌幹細胞ニッチを形成している腫瘍浸潤部が有意に減少した。3 次元培養から腫瘍細胞を分離し FACS で解析を行っても、CD44High/CD24Low 癌幹細胞は EGFR 阻害剤により有意に抑制されていた。しかし、EGFR 阻害剤は CD44High/CD24Low 癌幹細胞を完全に消失させることはできなかった。既存の CD44High/CD24Low 癌幹細胞は EGFR に既に非依存性になっており、EGFR 阻害剤に対して抵抗性であることが明らかとなった。動物実験においても、EGFR 阻害剤単独では CD44High/CD24Low 癌幹細胞を抑制することはできず、腫瘍抑制効果は認められなかった。また、ESCC 細胞に強く EMT を誘導する線維芽細胞と EMT を誘導しない線維芽細胞を比較すると、EGF の発現には有意差が無かった。これらの結果は EGF 単独ではなく、線維芽細胞から放出される他の因子が ESCC 癌幹細胞ニッチ形成に重要であることを示唆している。本研究ではサイトカインアレイ、DNA マイクロアレイにより線維芽細胞から放出される、癌幹細胞ニッチ形成、EMT 誘導に重要な役割を持つ可能性のある候補因子を複数同定している。今後、癌幹細胞ニッチを標的とした新たな治療法開発の萌芽となることが期待される。

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 4 件)

- 1) Kobayashi T, Ishida J, Shimizu Y, Kawakami H, Suda G, Muranaka T, Komatsu Y, Asaka M, Sakamoto N. Decreased RNA-binding motif 5 expression is associated with tumor progression in gastric cancer. *Tumour Biol.* 2017 Mar;39(3):1010428317694547. (査読有り)
- 2) Mizushima T, Ohnishi S, Shimizu Y,

Hatanaka Y, Hatanaka KC, Hosono H, Kubota Y, Natsuizaka M, Kamiya M, Ono S, Homma A, Kato M, Sakamoto N, Urano Y.

Fluorescent imaging of superficial head and neck squamous cell carcinoma using a -glutamyltranspeptidase-activated targeting agent: a pilot study. *BMC Cancer.* 2016 Jul 7;16:411. (査読有り)

3) Maehara O, Sato F, Natsuizaka M, Asano A, Kubota Y, Itoh J, Tsunematsu S, Terashita K, Tsukuda Y, Nakai M, Sho T, Suda G, Morikawa K, Ogawa K, Chuma M, Nakagawa K, Ohnishi S, Komatsu Y, Whelan KA, Nakagawa H, Takeda H, Sakamoto N. A pivotal role of Krüppel-like factor 5 in regulation of cancer stem-like cells in hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2015;16(10):1453-61. (査読有り)

4) Sato F, Kubota Y, Natsuizaka M, Maehara O, Hatanaka Y, Marukawa K, Terashita K, Suda G, Ohnishi S, Shimizu Y, Komatsu Y, Ohashi S, Kagawa S, Kinugasa H, Whelan KA, Nakagawa H, Sakamoto N. EGFR inhibitors prevent induction of cancer stem-like cells in esophageal squamous cell carcinoma by suppressing epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Biol Ther.* 2015;16(6):933-40. (査読有り)

[学会発表](計 3 件)

- 1) Fumiyuki Sato, Mitsuteru Natsuizaka, Osamu Maehara, Ayaka Asano, Yoshimasa Kubota, Jun Itoh, Seiji Tsunematsu, Yoko Tsukuda, Katsumi Terashita, Masato Nakai, Takuya Sho, Goki Suda, Kenichi Morikawa, Koji Ogawa, Shunsuke Ohnishi, Naoya Sakamoto. KLF5 promotes tumorigenicity of hepatocellular carcinoma by upregulation of cancer stem-like cells. Digestive Disease Week and the 116th annual meeting of the American Gastroenterological Association. 2015. Washington DC, USA.
- 2) Mitsuteru Natsuizaka, Bongani Kaimila, Yoshimasa Kubota, Yutaka Hatanaka, Katsuji Marukawa, Katsumi Terashita, Fumiyuki Sato, Shunsuke Ohnishi, Goki Suda, Shinya Ohashi, Shingo Kagawa, Kelly Whelan, Anil K Rustgi, Hiroshi Nakagawa, Naoya Sakamoto. EGFR inhibitors eliminate esophageal cancer stem cells by suppressing epithelial-mesenchymal transition. Digestive Disease Week and the 115th annual meeting of the American Gastroenterological Association. 2014. Chicago, USA.
- 3) Fumiyuki Sato, Mitsuteru Natsuizaka, Shinya Ohashi, Shingo Kagawa, Masaki Kuwatani, Hiroshi Kawakami, Shunsuke Ohnishi, Yoshito Komatsu, Mototsugu Kato,

Naoya Sakamoto. EGFR inhibitors suppress epithelial-mesenchymal transition and diminish cancer stem-like cells in esophageal squamous cell carcinoma. 日本癌学会総会. 2014. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

小松 嘉人 (KOMATSU YOSHITO)

北海道大学・北海道大学病院・准教授

研究者番号: 60333598

(2)研究分担者

夏井坂 光輝 (NATSUIZAKA MITSUTERU)

北海道大学・大学院医学研究科・客員研究員

研究者番号: 80642446

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし