

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08970

研究課題名(和文) ヒト検体を用いた消化器癌幹細胞の分化制御機構の解明と遠隔転移抑制法の確立

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of differentiation and metastasis of human gastrointestinal cancer stem cells

研究代表者

馬場 英司 (Baba, Eishi)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：00315475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト消化器癌や周囲の正常組織の切除標本から癌幹細胞、組織幹細胞を分離、培養し、細胞集塊(オルガノイド)形成させて、その特異的な遺伝子や蛋白の発現を解析した。その結果、大腸癌幹細胞から分化した非癌幹細胞は、上皮間葉転換に関わるTWIST1分子の活性化により再び幹細胞性を獲得した。また正常胃組織幹細胞においてE-cadherin分子の発現抑制により印環細胞癌様の形態が誘導された。いずれもこれらの分子を標的とした治療開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Freshly isolated human gastrointestinal cancer stem cells (CSCs) and normal tissue stem cells, which form organoid in our culture system, were examined by comprehensive gene expression analysis. Differentiated colorectal non-CSCs in the culture were demonstrated to retrieve the stem cell features in association with activation of TWIST1, a key molecule of epithelial-mesenchymal transition process. Normal gastric tissue stem cells-derived organoid exhibited signet-ring cell carcinoma-like morphology by inhibition of E-cadherin expression. These molecules regulating the behavior of CSCs and tissue stem cells could possibly become therapeutic targets for cancer chemotherapy.

研究分野：消化器内科学

キーワード：大腸癌 胃癌 癌幹細胞 組織幹細胞 オルガノイド 上皮間葉転換 印環細胞癌

## 1. 研究開始当初の背景

近年の集学的治療の発展により胃癌、大腸癌などの消化器癌の治療成績は向上してきた。特に殺細胞性抗癌薬や分子標的薬を用いた薬物療法は、切除不能進行および再発消化器癌の中心的な治療手段としての役割を果たしている。しかし、これらの薬物療法により腫瘍が縮小し病勢が制御された後に、再発を来して不幸な転機をとる例が多い。その主な原因として、薬物抵抗性の癌幹細胞の残存が考えられてきた。

癌幹細胞の概念は Dick らにより造血器腫瘍において初めて証明された後、様々な癌種でもその存在が報告されてきた。癌幹細胞は、自己複製能と、免疫不全マウスにおける造腫瘍能の2つの性質により定義される。そして腫瘍組織を形成する癌細胞の中で、特定の表面マーカーにより区別が可能である。

癌幹細胞を研究する上で、ヒト臨床検体を扱うことは極めて重要である。癌研究に用いられる細胞株の多くは単一集団で構成され、臨床検体の腫瘍組織のような不均一性を喪失している。また免疫不全マウス移植において、原発腫瘍の組織学的構造を再現できるのはほぼ臨床検体のみである。

ヒト体内で腫瘍が形成される際、癌幹細胞の一部は自己複製し、他の一部は非癌幹細胞へと分化する。この過程を解析する上で、免疫不全マウスへの異種移植実験では、分化過程の経時的な分子レベルの変化を観察することは困難である。癌幹細胞から非癌幹細胞へ分化していく過程、あるいは非癌幹細胞が癌幹細胞性を獲得する過程を経時的に観察するには培養系が必要であった。

本研究計画の準備段階では、ヒト大腸癌の臨床検体の培養系では単一細胞からの経時的变化の安定した解析は未だ困難であった (Kondo et al. PNAS, 2011)。一方、ヒト正常消化管細胞では、マトリゲルを用いた3次元培養により、単一の消化管幹細胞から細胞集塊 (オルガノイド) 培養が可能との報告がなされていた (Sato et al. Gastroenterology, 2011)。我々はそれまでもヒト大腸癌臨床検体より単一の癌幹細胞を分離し、経時的な観察が可能な培養系の確立に取り組んできた。しかし胃癌については、正常粘膜および胃癌由来の幹細胞の培養は確立できていなかった。

大腸癌では、EpCAM+CD44+ヒト大腸癌幹細胞が免疫不全マウスにおける造腫瘍能を有し、この同種移植腫瘍片は CD44+癌幹細胞と CD44-非癌幹細胞により構築されることが示された (Dalerba et al. PNAS, 2007)。一方、胃癌幹細胞のマーカーは未だ明らかでなかった。

この、癌幹細胞から非癌幹細胞への分化は、当時より一方向性と考えられていた。しかし Mani らは、CD44-非癌幹細胞が癌幹細胞様

の性質を獲得し得ることを示し、その癌幹細胞様の性質の獲得には上皮間葉転換 (以下 EMT) が重要な役割を担っていると報告した (Mani et al. Cell, 2008)。EMT により非癌幹細胞が癌幹細胞様性質を獲得すること、あるいは EMT による癌細胞の浸潤、転移能の増強の現象は、細胞株を用いた研究により示されたが、ヒト臨床検体で同様の現象が生じるかは証明されていなかった。

癌の微小環境からの増殖因子は、癌幹細胞の維持、および癌細胞の EMT 誘導にも必須と考えられている。しかしヒト臨床検体由来の癌幹細胞・非癌幹細胞が、この増殖因子等により、どのような分子機序で (1) 幹細胞性を維持し、(2) 癌幹細胞より非癌幹細胞へと分化し、あるいは (3) 非癌幹細胞から幹細胞性を獲得するか (4) EMT を生じるかは不明であった。

これまで我々は、主にヒト大腸癌を対象に臨床検体にわずかに含まれる EpCAM+CD44+癌幹細胞集団をフローサイトメトリーにより分離し、この細胞が免疫不全マウスにおいて造腫瘍能を有し、連続移植が可能であることを確認した。

またこの大腸癌臨床検体由来の単一の癌幹細胞の培養により、オルガノイドの形成は可能であった。そしてこれらのオルガノイド形成癌細胞は、それ以外の癌細胞と比較して特徴的な遺伝子発現プロファイルを有すること、オルガノイド形成癌細胞は一定期間培養後に癌幹細胞および非癌幹細胞の混在した不均一な状態となることを観察していた。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、まずヒト大腸癌臨床検体中にわずかに含まれる癌幹細胞を分離し、単一癌幹細胞より安定した培養系を確立し、これらが分化あるいは EMT を来す過程において、どのような遺伝子発現プロファイルの変化を示すかを解析することを目指した。

具体的には、この培養系では単一大腸癌幹細胞由来のオルガノイドは、癌幹細胞と非癌幹細胞により形成され、それぞれ特徴的な遺伝子発現パターンを示しており、そのパターンは時間と共に変化することが予想された。そのためこの培養過程で (1) 癌幹細胞の幹細胞性の維持、(2) 癌幹細胞から非癌幹細胞への分化、(3) 非癌幹細胞の幹細胞性の獲得、(4) EMT、などの変化に特徴的な遺伝子発現プロファイルを明らかにすることを目指した。またこれらの変化に役割を果たしている細胞内外の因子が、治療のための標的となるかを検討する。

一方、胃癌においては、ヒト臨床検体からの癌幹細胞の分離やその培養法の樹立も未だ不可能であったため、まずこれらを可能とし、その後大腸癌と同様に癌幹細胞の分化過程の分子レベルでの解明を目指した。

これらの結果を基に、消化器癌幹細胞の分化や、非癌幹細胞の幹細胞性獲得、EMT などの過程に関わる基盤となる分子機構を明らかにし、癌幹細胞自体を標的にした治療法や、EMT による浸潤・転移誘導を阻害する治療法の開発を最終的な目的とした。

### 3. 研究の方法

研究方法の概略：

ヒト消化器癌臨床検体由来の単一細胞より、フローサイトメトリーを用いて癌幹細胞分画を集め、マトリゲル上で液性因子添加した培地により培養してオルガノイドを形成する。オルガノイド構成細胞はフローサイトメトリー、免疫組織学検査で解析するとともに、単一細胞 PCR により細胞毎の遺伝子発現プロファイルを測定した。この臨床検体の有する癌幹細胞性、および EMT による表現型の変化を免疫不全マウスへの異種移植モデルなどで確認した。またヒト正常胃組織検体の細胞のオルガノイド培養系を確立し、正常組織幹細胞の性質の解析も行った。

#### (1) ヒト消化器臨床検体からの細胞分離と培養系樹立

九州大学病院で切除された胃癌、大腸癌の手術検体より、切除直後に約 1cm 角の腫瘍組織片を採取した。あるいは切除された胃検体辺縁の正常粘膜部分を採取した。細切後に酵素処理にて単細胞化し、各種抗体で染色後にセルソーターを用いて単細胞の状態で分離した。ソーティングされた癌細胞および正常胃細胞を、癌微小環境由来の液性因子を添加したマトリゲル上の培地で培養した。7-14 日後に得られたオルガノイドを下記の手法で解析する。このオルガノイドは、再び単細胞に分離後に同様の条件で長期間の継代培養が可能であることを確認した。

本計画ではこの方法を基盤として研究を実施したが、症例毎に異なるスフェアの形成効率を高めるため、また特に胃正常組織、胃癌組織からの分離細胞の培養法を樹立するため、培養に用いる液性因子や培養条件の最適化を行った。

本研究計画は九州大学病院臨床試験倫理審査委員会の承認を得ている。ヒト検体の採取には、術前に文書による患者同意取得の上、手術的に採取された消化器組織の一部を使用する。

#### (2) ヒト消化器癌幹細胞の異種移植実験

上記の手法で手術検体より分離されソーティングされた癌細胞の一部は、癌幹細胞性の確認のために免疫不全マウス (NOD/SCID) 皮下に移植した。1x10<sup>2</sup>-5x10<sup>2</sup> 個の移植により多くは 8-12 週後に腫瘍形成が観察された。この異種移植片を採取し、HE 染色、免疫染色による病理組織学検査を行う。また新鮮な異種移植片を単一細胞化し、抗体で染色後ソ

ーティングしたものを、再び免疫不全マウスに移植して腫瘍形成を確認するか、上記 1 の方法で培養を行う。またこれに加えて、臨床検体から上記 1 の手法で培養されたオルガノイド細胞を回収して、同様に免疫不全マウスへの移植実験も実施する。

#### (3) オルガノイドの解析 (免疫組織学的検査、フローサイトメトリー)

マトリゲル上に培地で形成された大腸癌由来のオルガノイドを適切な時期に固定し、EpCAM, CD44, CD133 などの癌幹細胞マーカー分子や E-cadherin, N-cadherin など EMT に関連する分子に対する抗体を用いて多重免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡でこれらの発現部位を観察した。また正常胃組織由来のオルガノイドについては、正常胃粘膜上皮の分化マーカーを染色して同様に解析した。

大腸癌幹細胞集団や、EMT 関連分子を発現する細胞集団のスフェア内の分布状態は測定時期により異なっており、単一癌幹細胞からスフェア形成に至る細胞の増殖、分化の過程も 3 次元画像として解析可能である。

またオルガノイドを単一細胞化して抗体で染色し、フローサイトメトリーにより構成細胞を定量的に測定した。

#### (4) オルガノイド形成細胞の遺伝子発現解析

オルガノイド形成する癌細胞の個別の遺伝子発現プロファイルを解析するために、単一細胞化した癌細胞が発現する表面分子を確認する。その後、それぞれの単一細胞の PCR 反応を Biomark HD™ system (Fluidigm corporation, USA) を用いて実施した。この系では一細胞あたり最大 96 遺伝子の PCR 増幅が可能である。

#### (5) ヒト臨床検体由来癌細胞における EMT の検討

ヒト臨床検体由来の癌細胞の上記培養系において、EMT が生じるかどうかを検討した。EMT 誘導に関連する可溶性因子の存在下に培養を行い、EMT 関連分子の発現をフローサイトメトリー、ウエスタンブロッティング、および定量的 PCR 法により測定した。EMT に伴って亢進する浸潤能については、in vitro の遊走能測定により評価する。既に我々は、臨床検体由来大腸癌細胞に TGF-beta を添加すると、一部の EMT 関連分子の高発現が誘導されることを見いだしたことから、さらに多数の症例において複数の関連分子を指標とした解析を行った。これらの解析結果に基づき、Snail や Twist などの EMT 関連遺伝子を、レンチウイルスベクターを用いて臨床検体由来癌細胞に導入した。遺伝子導入癌細胞の特徴を in vitro で解析すると共に、これらを免疫不全マウス皮下に移植して、腫瘍形成能や浸潤能・転移能の獲得についても

解析した。

#### (6) ヒト胃組織幹細胞の培養系樹立と胃印環細胞癌発癌モデルの作成

ヒト正常胃組織は、主に表層粘液細胞、頸部粘液細胞、主細胞、壁細胞、神経内分泌細胞などの上皮系細胞によって構成される。我々は、胃正常組織より *in vitro* で培養したオルガノイドを用い、オルガノイドの分化能を免疫組織染色で確認した。この解析結果を基に、胃組織由来オルガノイド形成細胞に遺伝子変異を導入することで、発癌過程の再現を試みた。遺伝子変異導入には CRISPR-Cas9 法を利用した。遺伝子変異導入された胃組織由来オルガノイドの形成細胞は、蛍光免疫組織染色、PCR 法による遺伝子発現解析などに用いた。

#### 4. 研究成果

本研究では、ヒト消化器癌幹細胞の分化過程、非癌幹細胞の幹細胞性獲得と EMT の関連などに関わる分子機構の解明により、消化器癌幹細胞自体を標的にした治療法、癌の浸潤、転移を阻害する治療法の開発を目的としている。

(1) ヒト大腸癌幹細胞に関する研究成果：我々は、まずヒト大腸癌臨床検体(手術検体、癌性胸腹水など)にわずかに含まれる癌幹細胞を、フローサイトメトリー等を用いて効率よく分離し、単一癌幹細胞からオルガノイド形成に至る安定した培養系を確立した。EpCAM 高発現 CD44 陽性のヒト大腸癌幹細胞はオルガノイド形成能を有しており、免疫不全マウス移植による腫瘍形成能も観察され、高い幹細胞性を有すると考えられた。

大腸癌幹細胞の分化と EMT を再現する過程において、単一細胞レベルでの遺伝子発現・蛋白発現プロファイルの解析を行った。興味深いことに、EMT 関連分子 TWIST1 の発現に強く相関して、非癌幹細胞が幹細胞性を獲得することが明らかとなった。さらにこの過程に TGF-beta を介するシグナル伝達が深く関与することを明らかにした。大腸癌の臨床検体において、EMT 過程に関連して癌幹細胞性を獲得する現象を証明した本研究は意義深いと考えられる(論文改訂版投稿中)。

(2) ヒト胃組織幹細胞と発癌過程に関する研究成果：

未だその生物学的特徴が知られていないヒト胃癌幹細胞の、生成および増殖過程を分子レベルで解明するために、まず我々はヒト正常胃組織幹細胞の同定を試みた。胃手術検体を用いてヒト正常胃組織幹細胞の候補となる細胞集団を分離し、オルガノイド培養を行った。培養開始後 1 週間程度の培養早期では、胃の分化細胞に特徴的な蛋白の発現を認めず、代わりに SOX2 や Lgr5 など未分化細

胞に特徴的な転写因子、膜蛋白の高発現が見られたことから、より未分化な状態が維持されていると考えられた。

培養液に添加する液性因子や培養条件を最適化し、ヒト胃組織由来オルガノイドは約 2 か月間培養および継代可能となった。さらに壁細胞以外の 4 系統の細胞の特異的な蛋白発現を確認し、これらへの分化を証明できた。以上より、*in vitro* において、ヒト胃組織由来オルガノイドは正常胃組織幹細胞に由来し、正常胃組織の性質を備えたものと考えられた。

胃癌の発癌過程を明らかにするために、この胃組織由来オルガノイドを遺伝子改変実験に使用した。

従来胃癌はびまん型と腸型の 2 つの組織型に大別されてきた。更に、近年の胃癌組織の網羅的解析により、胃癌は 4 つのサブタイプに分類可能であることが報告されている(Cancer Genome Atlas Research Network, Nature 513;202-209, 2014)。これらの知見を紐解くと、びまん型胃癌では、高率に *CDH1* 遺伝子のミスセンス変異やサイレンシングを伴うことが明らかになった。*CDH1* 遺伝子は、細胞間接着分子である E-cadherin をコードし、E-cadherin は上皮系細胞にコピキタスに発現する分子である。

我々はヒト胃組織由来オルガノイドにおいて、CRISPR-Cas9 技術によって *CDH1* 遺伝子のノックアウトを行った。その結果、E-cadherin 陰性の細胞では、PAS 陽性の粘液貯留と核の偏在化を伴う、印環細胞癌に特徴的な形態変化を認めた。更に、*CDH1* ノックアウト細胞では、マトリゲル培養下において、走化性亢進が観察された。しかしこれらの印環細胞は、後に Cleaved caspase 3 を高発現してアポトーシスを生じ、長期培養は不可能であった。以上の結果より、胃組織幹細胞における E-cadherin の発現抑制は、胃印環細胞癌に特徴的な形態変化および臨床的に重要な転移能獲得に関与していることが示唆された。しかし、*CDH1* 単独欠損では癌化には不十分であり、今後癌化に必要な遺伝子異常もしくは特定のニッチの同定が必要と考えられた(論文投稿準備中)。

これらの知見は、胃癌幹細胞の起源、および胃癌幹細胞の発生と癌細胞の増殖に強く関わる分子の同定の基盤となり、今後特にびまん型胃癌の新規治療法開発に繋がるものと期待される。

#### 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)

Takayoshi K, Baba E, et al.  
Weight loss during initial chemotherapy predicts survival in patients with advanced gastric cancer.

Nutr Cancer 69:408-15, 2017. 査読有

Inadomi K, Ariyama H, Baba E et al. Efficacy and safety analysis of oxaliplatin-based chemotherapy for advanced gastric cancer with a prior treatment of cisplatin. Anticancer Res 7: 2663-71, 2017. 査読有

Makiyama A, Ariyama H, Baba E et al. Irinotecan monotherapy as third-line or later treatment in advanced gastric cancer. Gastric Cancer 2017 Aug 10. doi: 10.1007/s10120-017-0759-9. 査読有

Tamura S, Ariyama H, Baba E et al. Colorectal cancer stem cell population consist of heterogeneous cells based on E-cadherin expression with different tumorigenic potential in vivo. Oncol Rep 2018 May 24. doi: 10.3892/or.2018.6464. 査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

Nakano M, Ariyama H, Baba E et al. Plasticity of CD44+ colorectal cancer cell depends on TGF-beta induced EMT. AACR Annual Meeting 2015  
2015年4月20日 Pennsylvania, USA.

Nakano M, Ariyama H, Baba E et al. EMT induces sphere forming ability in primary colorectal cancer. 第13回幹細胞シンポジウム(国際学会)  
2015年05月30日 東京

中野倫孝、馬場英司他.  
悪性腹水中がん細胞のCD44の発現は可塑性をもち、TGF-beta シグナルが関与している.  
第74回日本癌学会学術総会  
2015年10月09日 名古屋

Ito M, Ariyama H, Baba E et al. Transition of macrophage to fibroblast promote cancer progression in malignant ascites environment within gastrointestinal peritoneal carcinomatosis patients. AACR Annual Meeting 2016  
2016年04月16日 New Orleans, USA

Nakano M, Ariyama H, Baba E et al. TGF-beta regulates CD44 expression of cancer cells through epithelial-to-mesenchymal transition in malignant ascites. 第14回日本臨床腫瘍学会学術集会  
2016年07月28日 神戸

有山寛、早河翼、馬場英司他.  
マウス胃組織幹細胞の同定および印環細胞

癌発癌マウスモデルの構築  
第89回日本胃癌学会総会  
2017年3月8日 広島

有山寛、早河翼、馬場英司他.  
胃印環細胞癌における癌幹細胞とニッチ  
第76回日本癌学会学術総会  
2017年9月28日 横浜

中野倫孝、有山寛、馬場英司他.  
Tumor infiltrating lymphocytes in malignant ascites predict prognosis of gastrointestinal cancer  
第76回日本癌学会学術総会  
2017年9月28日 横浜

〔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

<http://www.1nai.med.kyushu-u.ac.jp>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

馬場英司 (BABA, Eishi)  
九州大学・医学研究院・教授  
研究者番号: 00315475

##### (2)研究分担者

有山寛 (ARIYAMA, Hiroshi)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号: 80713437

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号:

##### (4)研究協力者

( )