

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10088

研究課題名(和文)食道癌幹細胞マーカーを用いた血中癌細胞分離に基づく新規診断・治療標的の探索

研究課題名(英文)Clinical application of candidate stem cell markers for detection of circulating tumor cells in esophageal cancer.

研究代表者

奥村 知之 (Okumura, Tomoyuki)

富山大学・附属病院・講師

研究者番号：10533523

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)：神経成長因子受容体p75NTRをマーカーとして食道癌幹細胞を分離し静止期細胞が含まれることを示し、さらに抗体とDNA選択的染色試薬を組み合わせることでp75NTR陽性静止期癌幹細胞をviableな状態で分離することに成功した。続いて食道癌症例より末梢血液5mlを採取し、EpCAM+/p75NTR+をマーカーとして臨床病理学的悪性度と相関するCTCを検出し、セルソーターを用いて分離した細胞が異形細胞であることを確認した。また、胃癌について癌幹細胞マーカーCD44を用いて臨床病理学的悪性度と相関するCTCを検出し、セルソーターを用いて分離した細胞が異形細胞であることを確認した。

研究成果の概要(英文)：We isolated and characterized quiescent cancer stem cells (CSCs) population in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). We isolated p75NTR-positive cells in the G0-G1 phase but not in the S-G2-M phase showed strong expression of stem cell-related genes; high colony formation ability; high tumorigenicity in a mouse xenograft model; and strong chemoresistance, suggesting that p75NTR-positive/G0-1 cells represent quiescent CSCs in ESCC. For diagnostic application, our two-color flow cytometric investigation using peripheral blood samples of ESCC patients revealed that p75NTR-positive, but not p75NTR-negative circulating tumor stem cell counts, correlated with clinically diagnosed distant metastasis and pathological venous invasion in ESCC tumors. Further investigation targeting CSCs which are specifically characterized by multiple markers may provide us with novel therapeutic and diagnostic strategies for patients with ESCC.

研究分野：消化器外科学

キーワード：cancer stem cells esophageal cancer circulating tumor cells

1. 研究開始当初の背景

消化器癌においても末梢血液循環癌細胞 (CTC) が検出されるようになり転移再発や治療感受性における診断的意義が検討されているが、その分離に基づく機能解析は進んでいない。申請者らはこれまで報告してきた幹細胞マーカーである p75NTR および CD90 の発現に基づきセルソーターを用いた末梢血液循環食道扁平上皮癌幹細胞 (CTSC) の検出および生細胞の分離採取に成功した。

2. 研究の目的

食道癌幹細胞マーカーを用いた血中癌細胞分離に基づき新規診断・治療標的を探索する。

3. 研究の方法

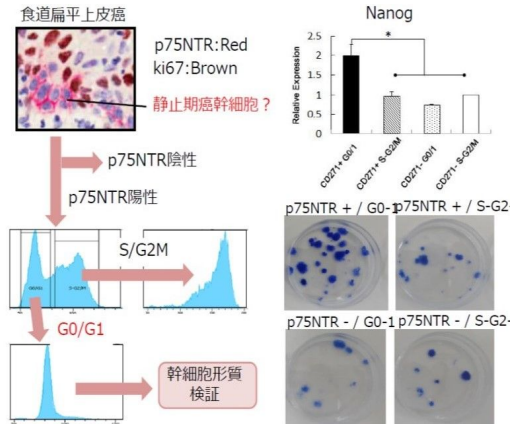
本研究では臨床病理学的因子とより相関する CTSC 検出マーカーセットの同定およびマイクロ流体チップの作成により簡便でより精度の高い CTSC 検出法を確立し、分離採取した細胞を用いて腫瘍幹細胞形質を検証し転移および治療抵抗性に関わる制御分子の機能解析を行うことで、新規治療標的分子の探索および治療効果予測システムの確立を行う。

4. 研究成果

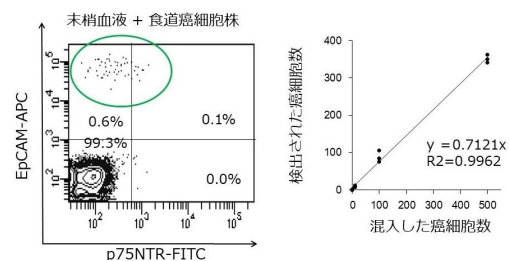
食道癌および胃癌症例を対象に上皮細胞マーカー (EpCAM) と癌幹細胞マーカー (p75NTR および CD44) との組み合わせに基づき、フローサイトメトリーを用いて末梢血液循環癌細胞 (CTC) を検出しその臨床的意義について検討した。

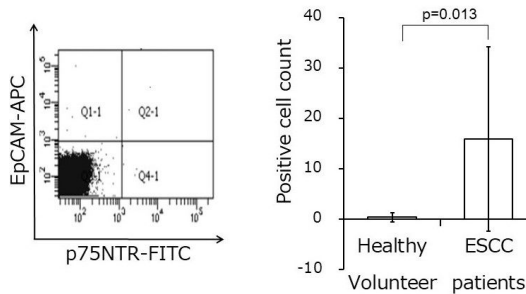
1) P75NTRを用いた食道扁平上皮癌幹細胞の同定: 食道扁平上皮癌培養細胞を用いてp75NTR陽性細胞を分離し、幹細胞関連分子 (Nanog、Bmi1、p63) および上皮間葉転換マーカー分子が高発現していること、高いコロニー形成能、マウス皮下移植腫瘍

形成能、および抗癌剤耐性を示すことを確認した(Int J Oncology 2016)。さらに、p75NTR陽性/静止期細胞がp75NTR陽性細胞の中でもより高い癌幹細胞形質を示すことを見出した(Int J Oncology 2017)。



2) 癌幹細胞マーカーを用いたCTCの検出: 血液混和培養細胞を用いて単核球層分離とゲート設定を行い癌細胞の検出精度を確認したうえで(Methods Mol Biol 2017)、食道癌におけるCTC検出:食道扁平上皮癌切除症例10例の術前、術後および対照として健常人10人より末梢血液10mlを採取し、単核球層を分離しEpCAM/p75NTRの組み合わせを用いてCTCを検出したところ、EpCAM陽性/p75NTR陽性細胞カウントは切除標本における静脈侵襲と有意な相関を示したのに対し、EpCAM陽性/p75NTR陰性細胞カウントはどの臨床病理学的因子との相関も示さなかった。また、セルソーターを用いて分離したEpCAM陽性/p75NTR陽性細胞は細胞診にて異形細胞であることを確認した。(World J Surgical Oncology 2016、Int Surgery 2018)。





3) 胃癌におけるCTC

の検出：胃癌症例26例および対照健康人12例より末梢血液10mlを採取し1)と同様にEpCAM-CD44陽性細胞を検出したところ、EpCAM陽性/CD44陽性細胞カウントは切除標本におけるT因子および静脈侵襲と有意な相関を示した (Oncology Letters 2017)。

以上の結果から、食道癌においてはp75NTR、胃癌においてはCD44がCTCのなかでもより転移と関わる細胞サブセットのマーカーとなる可能性が考えられた。

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 14件)

Okumura T, Yamaguchi T, Hirano K, Watanabe T, Nagata T, Shimada Y, Tsukada K. Circulating tumor cells detected by the expression of cancer stem cell marker CD90 and CD44 in patients with esophageal cancer. International surgery (査読あり) Online First Nov20 2017

Watanabe T, Okumura T, Hirano K, Yamaguchi T, Sekine S, Nagata T, Tsukada K. Circulating tumor cells expressing cancer stem cell marker CD44 as a diagnostic biomarker in patients with gastric cancer. Oncol Lett. (査読あり) 2017 Jan;13(1):281-288.

Kojima H, Okumura T, Yamaguchi T, Miwa T, Shimada Y, Nagata T. Enhanced cancer stem cell properties of a mitotically quiescent subpopulation of p75NTR-positive cells in esophageal squamous cell carcinoma. Int J Oncol. (査読あり) 51: 49-62, 2017

Miwa T, Nagata T, Kojima H, Sekine S, Okumura T. Isoform switch of CD44 induces different chemotactic and tumorigenic ability in gallbladder cancer.

Int J Oncol. (査読あり) 2017; 51: 771-80
Okumura T, Yamaguchi T, Watanabe T, Nagata T, Shimada Y. Clinical Relevance of a Candidate Stem Cell Marker, p75 Neurotrophin Receptor (p75NTR) Expression in Circulating Tumor Cells. Adv Exp Med Biol. (査読あり) 2017;994:247-254.

Okumura T, Yamaguchi T, Watanabe T, Nagata T, Shimada Y. Flow Cytometric Detection of Circulating Tumor Cells Using a Candidate Stem Cell Marker, p75 Neurotrophin Receptor (p75NTR). Methods Mol Biol. (査読あり) 2017;1634:211-217.

Okumura T, Kojima H, Hashimoto I, Watanabe T, Shibuya K, Hojo S, Yoshioka I, Matsui K, Nagata T, Shimada Y, Tsukada K. Loss of Tricho-Rhino-Phalangeal Syndrome-1 (TRPS1) expression as a Biomarker of Poor Prognosis in Patients with Gastric Cancer. Int J Cancer Res Mol Mech. (査読あり) 2016; 2(2). Doi: 10.16966/2381-3318.124.

Okumura T, Kojima H, Miwa T, Sekine S, Hashimoto I, Hojo S, Nagata T, Shimada Y. World J Surg Oncol. (査読あり) 2016 Aug 26; 14(1): 228. doi: 10.1186/s12957-016-0985-3 .

Shimada Y, Okumura T, Takei Y, Watanabe K, Nagata T, Hori T, Tsuchiya S, Tsukada K, Shimizu K. Role of fibroblast growth factor receptors in esophageal squamous cell carcinoma. sophagus (査読あり) 2016, 13:30-41

Yamaguchi T, Okumura T, Hirano K, Watanabe T, Nagata T, Shimada Y, Tsukada K. p75 neurotrophin receptor expression is a characteristic of the mitotically quiescent cancer stem cell population present in esophageal squamous cell carcinoma. Int J Oncol. (査読あり) 2016; 48: 1943-54.

Yamaguchi T, Okumura T, Hirano K, Watanabe T, Nagata T, Shimada Y, Tsukada K. Detection of circulating tumor cells by p75NTR expression in patients with esophageal cancer. World J Surg Oncol. (査読あり) 2016 Feb 20;14(1):40.

Okumura T, Shimada Y, Omura T, Hirano K, Nagata T, Tsukada K. MicroRNA Profiles to Predict Postoperative Prognosis in Patients with Small Cell Carcinoma of the Esophagus. Anticancer Res. (査読あり) 2015, 35(2) 719-27.

Okumura T, Shimada Y, Sakurai T, Hori R, Nagata T, Sakai Y, Tsukada K.

Abnormal cell proliferation in the p75NTR-positive basal cell compartment of the esophageal epithelium during squamous carcinogenesis. *Dis Esophagus*. (査読あり) 2015, 28(7) 634-43.

Hirano K, Okumura T, Shimada Y, Watanabe T, Yamaguchi T, Nagata T, Tsukada K. Establishment and Characterization of Two Novel Human Pancreatic Carcinoma Cell Lines. *Anticancer Res*. (査読あり) 2015, 35(7) 3821-8.

〔学会発表〕(計 14件)

奥村知之、小島博文、荒井美栄、馬場逸人、山崎豪孔、明石堯久、祐川健太、河合俊輔、渡辺 徹、森山亮仁、関根慎一、渋谷和人、橋本伊佐也、北條莊三、吉岡伊作、長田拓哉、廣川慎一郎、嶋田 裕、藤井 努 食道扁平上皮癌における静止期癌幹細胞の同定 第 28 回日本消化器癌発生学会総会 2017 年 11 月 17 日 熊本

奥村知之、小島博文、関根慎一、荒井美栄、馬場逸人、明石堯久、森山亮仁、渋谷和人、橋本伊佐也、北條莊三、吉岡伊作、長田拓哉、廣川慎一郎、藤井 努 食道原発神経内分泌腫瘍における分子生物学的サブクラスの同定 富山 GEP-NET 懇話会 2017 年 9 月 8 日

奥村知之、小島博文、関根慎一、藤井 努、嶋田 裕、小澤壯治、松原久裕、上本伸二、幕内博康、今村正之。「JNETS 食道原発神経内分泌癌(NEC)プロジェクト」進捗報告 第 5 回日本神経内分泌腫瘍研究会学術集会 2017 年 9 月 2 日 仙台

奥村知之、小島博文、山口哲司、三輪武史、渡辺徹、関根慎一、橋本伊佐也、吉岡伊作、嶋田裕、長田拓哉、藤井努 食道扁平上皮癌における静止期癌幹細胞マーカー CD271 を用いた血中循環癌細胞の検出 第 72 回日本消化器外科学会総会 2017 年 7 月 21 日 金沢

小島博文、奥村知之、三輪武史、長田拓哉. p75NTR 発現に基づく食道扁平上皮癌における静止期癌幹細胞の同定. 第 72 回日本消化器外科学会総会; 2017 Jul 20-22; 金沢

奥村知之 食道癌幹細胞を標的とした新規治療開発に向けて フォーラム富山「創薬」第 45 回研究会パネルディスカッション 2017 年 5 月 18 日

奥村知之、福田卓真、三輪武史、渡辺 徹、小島博文、関根慎一、橋本伊佐也、渋谷和人、北條莊三、吉岡伊作、澤田成朗、長田拓哉、嶋田 裕 食道扁平上皮 多発前癌病変における静止期基底細胞の形質変化 第 117 回日本外科学会定期学術集会 2017 年 4 月 27 日 横浜

小島 博文、山口 哲司、奥村 知之、三輪武史、平野 勝久、渡辺 徹、長田 拓哉、塚

田 一博. p75NTR を用いた食道癌患者の末梢血循環癌細胞の検出. 第 71 回日本消化器外科学会総会; 2016 Jul 14-16; 徳島.

奥村知之、小島博文、三輪武史、河合俊輔、平野勝久、渡辺 徹、森山亮仁、関根慎一、橋本伊佐也、渋谷和人、北條莊三、松井恒志、吉岡伊作、長田拓哉、嶋田 裕、塚田一博. 食道原発神経内分泌癌におけるマイクロ RNA 発現プロファイルに基づく切除適応症例の選別. 第 71 回日本消化器外科学会総会; 2016 Jul 14-16; 徳島.

奥村知之、小島博文、三輪武史、河合俊輔、平野勝久、渡辺 徹、森山亮仁、関根慎一、橋本伊佐也、渋谷和人、北條莊三、松井恒志、吉岡伊作、長田拓哉、嶋田 裕、塚田一博. 正常食道扁平上皮における静止期基底層細胞の分離と上皮構造の再構築. 第 116 回日本外科学会定期学術集会; 2016 Apr 14-16; 大阪

小島 博文、奥村 知之、山口 哲司、平野 勝久、渡辺 徹、三輪 武史、長田 拓哉、塚田 一博. 食道癌における静止期癌幹細胞の同定. 第 116 日本外科学会定期学術集会; 2016 Apr 14-16; 大阪.

渡辺 徹、奥村知之、平野勝久、三輪武史、山口哲司、小島博文、関根慎一、長田拓哉、塚田一博. 癌幹細胞マーカーCD44を発現した末梢血循環癌細胞は胃癌患者におけるバイオマーカーとして重要である. 第 74 回日本癌学会学術総会; 2015 Oct 8-11; 名古屋.

奥村 知之、山口 哲司、平野 勝久、渡辺 徹、小島 博文、橋本 伊佐也、渋谷 和人、北條 莊三、吉岡 伊作、松井 恒志、長田 拓哉、嶋田 裕、塚田 一博. 食道扁平上皮癌幹細胞マーカーCD271 を用いた末梢血循環癌細胞の検出. 第 74 回日本癌学会学術総会; 2015 Oct 8-11; 名古屋.

Okumura T, Shimada Y, Watanabe T, Hirano K, Yamaguchi T, Sekine S, Nagata T, Tsukada K. MicroRNA Profiles to Predict Postoperative Prognosis in Patients with Small Cell Carcinoma of the Esophagus. 46th World Congress of Surgery; 2015 Aug 23-27; Bangkok.

〔図書〕(計 1件)

Okumura T, Kojima H, Yamaguchi T, Miwa T, Shimada Y. Clinical application of stem cell biology in esophageal cancer. Chapter 3, Molecular Diagnosis and Targeting for Thoracic and Gastrointestinal Malignancy. Springer Book 2017

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：静止期癌幹細胞の効率的分離方法
発明者：奥村知之
権利者：国立大学法人富山大学
種類：特許
番号：特願 2017-028150
出願年月日：2016-2-17
国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥村 知之 (OKUMURA, Tomoyuki)
富山大学・附属病院・講師
研究者番号：10533523

(2) 研究分担者

嶋田 裕 (SHIMADA, Yutaka)
京都大学・薬学研究科・客員教授
研究者番号：30216072