

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09182

研究課題名(和文) 膵癌幹細胞に高発現する炎症性サイトカイン受容体を標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel treatment targeting pancreatic cancer stem cells highly expressing receptors for inflammatory cytokines

研究代表者

小菅 敏幸 (Kosuga, Toshiyuki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：00457946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト食道扁平上皮癌細胞株(TE4、TE8)からの癌幹細胞の分離・培養に成功した。TE4、TE8(非癌幹細胞)を炎症性サイトカインTNF- α で刺激したところ、細胞増殖抑制、アポトーシス亢進、ALDH1発現低下を認めた。一方、TE4、TE8癌幹細胞を直接にTNF- α で刺激したところ、sphere形成能低下、アポトーシス誘導、ALDH1発現低下を認めた。Migration assayにおいては、TNF- α 刺激にて非癌幹細胞では細胞遊走能が抑制されたが、癌幹細胞では遊走能が促進された。以上より、「TNF- α 刺激により食道扁平上皮癌幹細胞の癌幹細胞性は減弱するが、遊走能は促進される」ことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、化学療法への耐性獲得や治療後再発には癌幹細胞という少数の細胞集団が関与することが報告されており、癌幹細胞を標的とした新規治療の開発が望まれている。一方、炎症性サイトカインが癌細胞の生物学的活性に影響を与えることも明らかになってきたが、これまでに炎症性サイトカイン刺激による癌幹細胞の反応性について詳細に検討した研究報告は存在しない。本研究は、「TNF- α 刺激により食道扁平上皮癌幹細胞の癌幹細胞性が減弱するが、遊走能は促進される」という全く新たな知見を明らかにしたという点で、学術的・社会的に意義があると思われる。

研究成果の概要(英文)：We established cancer stem cells (CSCs) of two human ESCC cell lines (TE4 and TE8). The stimulation with TNF- α inhibited cell proliferations, promoted early apoptosis, and attenuated the ALDH1 expression of TE4 and TE8 cells (non-CSCs). Meanwhile, the stimulation with TNF- α inhibited the sphere formation, promoted early apoptosis, and attenuated the ALDH1 expression of CSCs of TE4 and TE8. Interestingly, the stimulation with TNF- α inhibited cell migration of TE8 cells (non-CSCs) but promoted cell migration of CSCs of TE8. These findings suggests that the stimulation with TNF- α suppresses the cancer stemness but promotes cell migration of CSCs of ESCC cells.

研究分野：消化器外科学

キーワード：癌幹細胞 炎症性サイトカイン TNF-

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、化学療法への耐性獲得や治療後再発には癌幹細胞という少数の細胞集団が関与することが報告されており、癌幹細胞を標的とした新規治療の開発が望まれている。一方、炎症性サイトカインが癌細胞の生物学的活性に影響を与えることも明らかになってきたが、これまでに炎症性サイトカイン刺激による癌幹細胞の反応性について詳細に検討した研究報告は存在しない。

2. 研究の目的

本研究では、“癌幹細胞では炎症性サイトカイン受容体が高発現しており、抗サイトカイン療法への治療感受性が高い”という実験仮説の検証を行う。

3. 研究の方法

(1) ヒト癌細胞株からの癌幹細胞の分離と細胞株樹立

ヒト食道扁平上皮癌細胞株 (TE4、TE8) から癌幹細胞株の分離と細胞株樹立を試みる。TE4、TE8 細胞から ALDEFLUOR 試薬とセルソーターを用いて ALDH1 活性の高い細胞を分離し培養する。Sphere 形成能を有する細胞のみを分離して研究に用いる。

(2) 癌細胞の炎症性サイトカインに対する反応性の解析

TE4、TE8 細胞を炎症性サイトカインで刺激した際の、増殖能、アポトーシス、ALDH1 発現の変化の解析を行う。

(3) 癌幹細胞の炎症性サイトカインに対する反応性の解析

TE4、TE8 癌幹細胞を炎症性サイトカインで刺激した際の、sphere 形成能、アポトーシス、ALDH1 発現の変化の解析を行う。

(4) 癌細胞・癌幹細胞に炎症性サイトカイン刺激を加えた際の遺伝子プロファイル変化の解析

TE8 細胞、TE8 癌幹細胞に炎症性サイトカイン刺激を加えた際の遺伝子発現プロファイル変化をマイクロアレイ法により網羅的に解析する。

4. 研究成果

TE4、TE8 細胞株からの癌幹細胞の分離・培養に成功した (図 1)。



図 1 樹立した TE4、TE8 癌幹細胞

まず初めに、TE4、TE8 細胞 (非癌幹細胞) を炎症性サイトカイン (IL-6、IL-1b、TNF-) で刺激したところ、細胞増殖促進や癌幹細胞性増強といった変化は認められず、当初の実験仮説とは異なる結果であった。むしろ、TNF- 刺激では一貫して細胞増殖が抑制され、アポトーシスが亢進するという結果であった (図 2)。

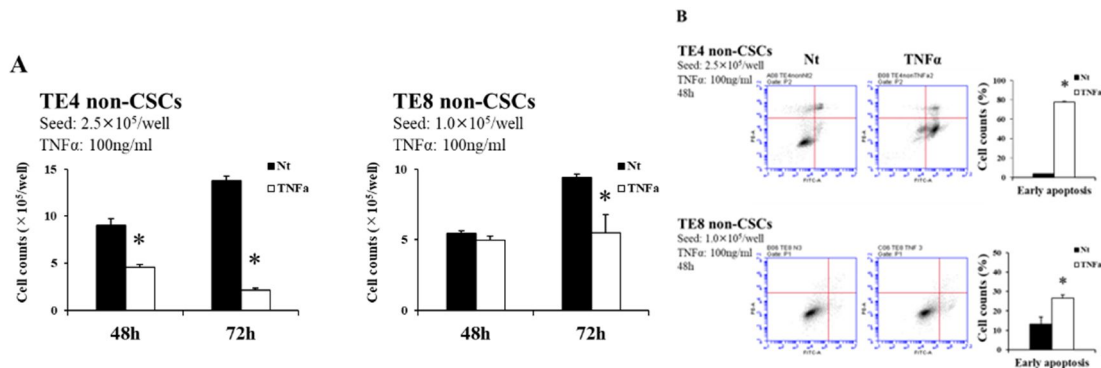


図 2 : TE4、TE8 (非癌幹細胞) の TNF- 刺激に対する反応性 (A : 増殖、B : アポトーシス)

一方、世界で初めての試みと思われるが、TE4、TE8 癌幹細胞を直接に炎症性サイトカイン (IL-6、IL-1b、TNF-) で刺激したところ、IL-6、IL-1b 刺激では sphere 形成能に著変を認めなかったが、TNF- 刺激では明らかな sphere 形成能の低下とアポトーシスの亢進を認めた (図 3)。

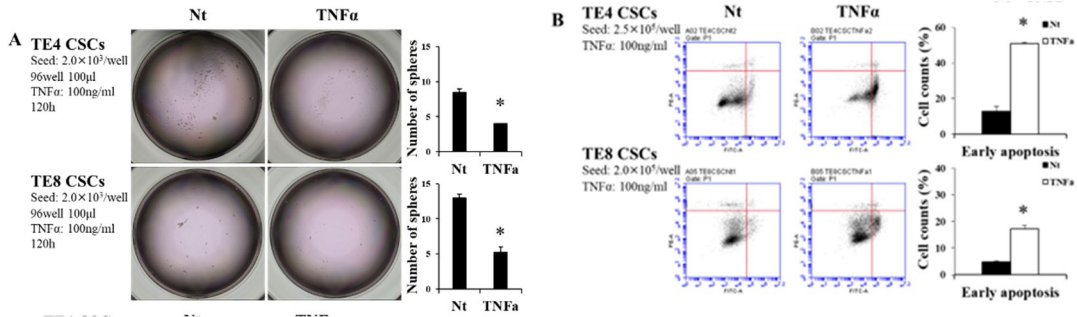


図3：TE4、TE8 癌幹細胞の TNF- 刺激に対する反応性（A：sphere 形成能、B：アポトーシス）

TE4、TE8 細胞および癌幹細胞を TNF- で刺激したところ、いずれにおいても ALDH1 発現の減弱を認めたが、その程度は癌幹細胞において顕著であった（図4）。

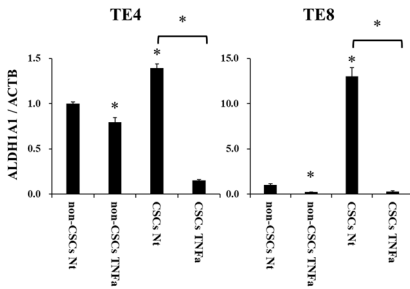


図4：TE4、TE8 細胞および癌幹細胞における TNF- 刺激による ALDH1 発現レベルの変化

TE8 細胞および癌幹細胞に TNF- 刺激を加えた際の遺伝子発現プロファイル変化を解析したところ、TE8 細胞では 10197 遺伝子に、TE8 癌幹細胞では 17675 遺伝子に ± 1.5 倍以上の mRNA 発現変化を認めた。このうち非癌幹細胞と癌幹細胞で増減が逆方向に変化した 1929 遺伝子に着目して pathway 解析を行ったところ、Inhibition of Matrix Metalloproteases (MMP) pathway が上位にランキングされた。Validation 解析においても、TNF- 刺激により非癌幹細胞では MMP7、10、12、13mRNA 発現が減弱する一方、癌幹細胞では同 mRNA 発現の増強を認めた（図5）。

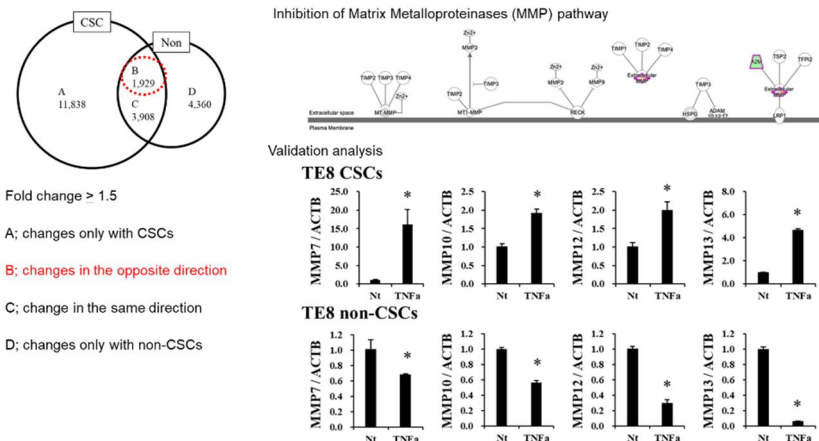
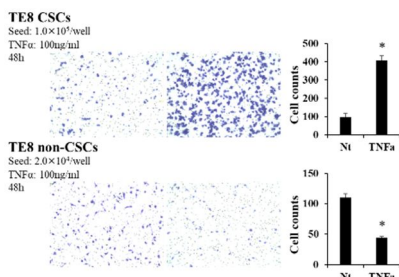


図5：非癌幹細胞と癌幹細胞で逆方向に変化した Inhibition of MMP pathway

さらに、Migration assay においては、TNF- 刺激により非癌幹細胞では細胞遊走能が抑制される一方、癌幹細胞では遊走が促進された（図6）。



以上の結果から、「TNF- 刺激により食道扁平上皮癌幹細胞の sphere 形成や癌幹細胞性は減弱するが、遊走能は促進される」ことを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計32件（うち査読付論文 32件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Shiozaki Atsushi, Katsurahara Keita, Kudou Michihiro, Shimizu Hiroki, Kosuga Toshiyuki, Ito Hiroshi, Arita Tomohiro, Konishi Hirotaka, Komatsu Shuhei, Kubota Takeshi, Fujiwara Hitoshi, Okamoto Kazuma, Otsuji Eigo	4. 巻 28
2. 論文標題 Amlodipine and Verapamil, Voltage-Gated Ca ²⁺ Channel Inhibitors, Suppressed the Growth of Gastric Cancer Stem Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 5400 ~ 5411
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-021-09645-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shiozaki Atsushi, Konishi Tomoki, Kosuga Toshiyuki, Kudou Michihiro, Kurashima Kento, Inoue Hiroyuki, Shoda Katsutoshi, Arita Tomohiro, Konishi Hirotaka, Morimura Ryo, Komatsu Shuhei, Ikoma Hisashi, Toma Atsushi, Kubota Takeshi, Fujiwara Hitoshi, Okamoto Kazuma, Otsuji Eigo	4. 巻 59
2. 論文標題 Roles of voltage-gated potassium channels in the maintenance of pancreatic cancer stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2021.5256	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Konishi Tomoki, Kosuga Toshiyuki, Inoue Hiroyuki, Konishi Hirotaka, Shiozaki Atsushi, Kubota Takeshi, Okamoto Kazuma, Fujiwara Hitoshi, Otsuji Eigo	4. 巻 26
2. 論文標題 Significance of Preoperative Prognostic Nutritional Index in the Perioperative Management of Gastric Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Gastrointestinal Surgery	6. 最初と最後の頁 558 ~ 569
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11605-021-05168-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Inoue Hiroyuki, Kosuga Toshiyuki, Kubota Takeshi, Konishi Hirotaka, Shiozaki Atsushi, Okamoto Kazuma, Fujiwara Hitoshi, Otsuji Eigo	4. 巻 19
2. 論文標題 Significance of a preoperative systemic immune-inflammation index as a predictor of postoperative survival outcomes in gastric cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 World Journal of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12957-021-02286-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shiozaki A, Kudou M, Fujiwara H, Konishi H, Shimizu H, Arita T, Kosuga T, Yamamoto Y, Morimura R, Ikoma H, Kuriu Y, Kubota T, Okamoto K, Otsuji E.	4. 巻 99
2. 論文標題 Clinical safety and efficacy of neoadjuvant combination chemotherapy of tranilast in advanced esophageal squamous cell carcinoma: Phase I/II study (TNAC).	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e23633
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.00000000000023633	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 KOSUGA TOSHIYUKI, KONISHI TOMOKI, KUBOTA TAKESHI, SHODA KATSUTOSHI, KONISHI HIROTAKA, SHIOZAKI ATSUSHI, OKAMOTO KAZUMA, FUJIWARA HITOSHI, KUDOU MICHIIHIRO, ARITA TOMOHIRO, MORIMURA RYO, MURAYAMA YASUTOSHI, KURIU YOSHIAKI, IKOMA HISASHI, NAKANISHI MASAYOSHI, OTSUJI EIGO	4. 巻 39
2. 論文標題 Value of Prognostic Nutritional Index as a Predictor of Lymph Node Metastasis in Gastric Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 6843 ~ 6849
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.13901	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kosuga Toshiyuki, Konishi Tomoki, Kubota Takeshi, Shoda Katsutoshi, Konishi Hirotaka, Shiozaki Atsushi, Okamoto Kazuma, Fujiwara Hitoshi, Kudou Michihiro, Arita Tomohiro, Morimura Ryo, Murayama Yasutoshi, Kuriu Yoshiaki, Ikoma Hisashi, Nakanishi Masayoshi, Otsuji Eigo	4. 巻 19
2. 論文標題 Clinical significance of neutrophil-to-lymphocyte ratio as a predictor of lymph node metastasis in gastric cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 1187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-019-6404-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計123件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 9件)

1. 発表者名 満田 雅人, 小菅 敏幸, 塩崎 敦, 清水 浩紀, 久保 秀正, 木内 純, 大橋 拓馬, 有田 智洋, 山本 有裕, 小西 博貴, 森村 玲, 栗生 宜明, 生駒 久視, 窪田 健, 藤原 斉, 岡本 和真, 大辻 英吾
2. 発表標題 TNF- 刺激が食道癌幹細胞の癌幹細胞性と機能に与える影響
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤 俊治, 塩崎 敦, 工藤 道弘, 清水 浩紀, 小菅 敏幸, 竹本 健一, 有田 智洋, 山本 有祐, 小西 博貴, 森村 玲, 栗生 宜明, 生駒 久視, 窪田 健, 藤原 斉, 岡本 和真, 大辻 英吾
2. 発表標題 大腸癌幹細胞における低浸透圧ショック耐性に関して
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塩崎 敦, 葛原 啓太, 小菅 敏幸, 工藤 道弘, 清水 浩紀, 大橋 拓馬, 有田 智洋, 山本 有祐, 小西 博貴, 森村 玲, 栗生 宜明, 生駒 久視, 窪田 健, 藤原 斉, 岡本 和真, 大辻 英吾
2. 発表標題 電位依存性カルシウムチャネル阻害剤による胃癌幹細胞抑制効果
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塩崎 敦, 小西 智規, 小菅 敏幸, 工藤 道弘, 清水 浩紀, 有田 智洋, 山本 有祐, 小西 博貴, 森村 玲, 栗生 宜明, 生駒 久視, 窪田 健, 藤原 斉, 岡本 和真, 大辻 英吾
2. 発表標題 膵癌幹細胞における電位依存性カリウムチャネルの発現機能解析
3. 学会等名 第59回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 倉島 研人, 塩崎 敦, 清水 浩紀, 工藤 道弘, 小菅 敏幸, 生駒 久視, 窪田 健, 藤原 斉, 岡本 和真, 大辻 英吾
2. 発表標題 ALDH1A1陽性肝癌幹細胞に対するイオンチャネルブロッカーの治療薬としての可能性について
3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小西智規、塩崎敦、小菅敏幸、工藤道弘、庄田勝俊、有田智洋、小西博貴、森村玲、村山康利、栗生宜明、生駒久視、窪田健、中西正芳、藤原斉、岡本和真、大辻英吾.
2. 発表標題 4-aminopyridinは膵癌幹細胞増殖抑制に關与する
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 深見知之、工藤道弘、松本順久、塩崎敦、小菅敏幸、庄田勝俊、有田智洋、小西博貴、森村玲、村山康利、栗生宜明、生駒久視、窪田健、中西正芳、藤原斉、岡本和真、大辻英吾.
2. 発表標題 食道癌幹細胞におけるイオン輸送体の発現と意義
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 深見知之、塩崎敦、松本順久、工藤道弘、小菅敏幸、清水浩紀、木内純、大橋拓馬、有田智洋、小西博貴、栗生宜明、生駒久視、窪田健、藤原斉、岡本和真、大辻英吾
2. 発表標題 食道癌幹細胞のイオン輸送体に着目した新規治療標的の特定
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小菅敏幸、塩崎敦、満田雅人、工藤道弘、清水浩紀、有田智洋、小西博貴、小松周平、窪田健、岡本和真、藤原斉、大辻英吾
2. 発表標題 TNF- 刺激は食道扁平上皮癌における癌幹細胞性を抑制する
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 塩崎敦、小西智規、小菅敏幸、工藤道弘、清水浩紀、有田智洋、山本有祐、小西博貴、森村玲、栗生宜明、生駒久視、窪田健、藤原斉、岡本和真、大辻英吾.
2. 発表標題 膵癌幹細胞に対する電位依存性カリウムチャンネル阻害薬：4-アミノピリジンの抑制効果
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 塩崎敦、葛原啓太、小菅敏幸、工藤道弘、清水浩紀、有田智洋、山本有祐、小西博貴、森村玲、栗生宜明、生駒久視、窪田健、藤原斉、岡本和真、大辻英吾
2. 発表標題 電位依存性Ca ²⁺ チャンネル阻害剤(アムロジピン, ベラパミル)による胃癌幹細胞抑制効果
3. 学会等名 第58回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 塩崎敦、葛原啓太、工藤道弘、清水浩紀、有田智洋、小菅敏幸、森村玲、小西博貴、栗生宜明、生駒久視、窪田健、藤原斉、岡本和真、大辻英吾
2. 発表標題 胃癌幹細胞特異的に発現するイオンチャンネルの同定と新規標的治療への応用
3. 学会等名 JDDW2020 (第18回日本消化器外科学会大会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤俊治、塩崎敦、葛原啓太、工藤道弘、小菅敏幸、小西博貴、窪田健、藤原斉、岡本和真、大辻英吾
2. 発表標題 CD44陽性胃癌幹細胞のイオン輸送体阻害剤による抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小西智規、塩崎敦、小菅敏幸、工藤道弘、庄田勝俊、有田智洋、小西博貴、森村玲、村山康利、栗生宜明、生駒久視、窪田健、中西正芳、藤原斉、岡本和真、大辻英吾。
2. 発表標題 膵癌幹細胞における4-aminopyridineの抗腫瘍効果について
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 葛原啓太、塩崎敦、工藤道弘、庄田勝俊、有田智洋、小菅敏幸、小西博貴、森村玲、村山康利、窪田健、中西正芳、藤原斉、大辻英吾。
2. 発表標題 CD44陽性胃癌幹細胞に対する電位依存性Caチャンネルブロッカーの抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小西智規、塩崎敦、小菅敏幸、工藤道弘、庄田勝俊、有田智洋、小西博貴、森村玲、村山康利、窪田健、中西正芳、藤原斉、大辻英吾。
2. 発表標題 膵癌幹細胞における4-aminopyridineの抗腫瘍効果について
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小菅敏幸、塩崎敦、満田雅人、工藤道弘、小西智規、葛原啓太、庄田勝俊、有田智洋、小西博貴、小松周平、窪田健、藤原斉、大辻英吾。
2. 発表標題 炎症性サイトカイン刺激が食道癌幹細胞のsphere形成能に与える影響について
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 工藤道弘、塩崎敦、小西智規、葛原啓太、松本順久、小菅敏幸、森村玲、村山康利、栗生宜明、生駒久視、窪田健、中西正芳、藤原育、岡本和真、大辻英吾。
2. 発表標題 消化器癌における癌幹細胞高発現イオン輸送体を標的とした新規治療法の開発
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大辻 英吾 (Otsuji Eigo) (20244600)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------