

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590809

研究課題名(和文)

消化器癌における癌幹細胞の同定、分離および生物学的特性の解析

研究課題名(英文)

Analysis of biological characteristic features in cancer stem cell in digestive organs

研究代表者

樋口 肇 (HIGUCHI HAJIME)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20306682

研究成果の概要(和文)：

消化器癌細胞株あるいは臨床検体由来の細胞を用い、癌幹細胞分画を分離し、腫瘍形成能、コロニー形成能、薬剤耐性、転移形成能、浸潤能において、高い能力を有することを明らかにした。とくに、膵癌幹細胞の転移、浸潤、EMTは、間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell, MSC)との共培養により強く誘導されることを見出した。癌根治のため、あるいは癌進展抑制のための治療戦略として、癌幹細胞あるいは間葉系細胞を標的とした治療の重要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

Cancer related materials, i.e., cell lines, endoscopic biopsy specimen, or, surgically resected specimen, were analyzed for; i) expression of cancer stem cell markers, ii) tumor formation, iii) colony forming activity, iv) drug-resistance, and v) potentials for local invasion and metastasis. Our results suggest that side population (SP) cells isolated from pancreatic cancer have some cancer stem cell-like properties; i) high tumorigenic/colony forming activity, ii) resistance to some chemotherapeutic drugs as well as apoptosis-inducing molecules such as TRAIL, iii) high metastatic potential, and iv) enhanced capability to undergo epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and invasion. In hepatocellular carcinoma, CD133-positive side population cells were highly tumorigenic and chemotherapy-resistant. These cancer stem cell-like features were enhanced by co-culturing with bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and/or MSC-derived myofibroblast-like cells, suggesting MSCs provide microenvironment so-called cancer stem cell niche to maintain stem cell phenotype in cancer derived SP cells. These results suggest that SP cells would be a therapeutic target, especially to prevent cancer stem cell invasion and metastasis. Mesenchymal cell-derived microenvironment would be another therapeutic target to regulate cancer stem cell maintenance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：消化器癌、化学療法、癌幹細胞

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：癌幹細胞、epithelial-to-mesenchymal transition、apoptosis、mesenchymal stem cell

1. 研究開始当初の背景

癌幹細胞は、高い腫瘍形成能と増殖のポテンシャルを有する一方、非幹細胞へと分化する能力を持ち、癌の進展に寄与する。非幹細胞は、一定の増殖能を持つもののそのポテンシャルは有限で、幹細胞を持たない細胞集団は腫瘍を形成することが出来ないとされている。また、癌幹細胞は多くの抗癌剤に対して抵抗性であり、腫瘍の再発や転移に関与すると想定されている。しかしながら、癌幹細胞の生物学的特性に関してはいまだ解明すべき問題が多く、とくに、転移・再発における癌幹細胞の役割や抗癌剤抵抗性の分子学的機序に関しては、不明な点が多い。

2. 研究の目的

本申請研究の目的は、消化器癌における癌幹細胞を同定、分離培養し、その生物学的特性を解析することである。癌幹細胞におけるアポトーシス抵抗性、腫瘍形成能、転移・浸潤能を解析し、治療標的細胞としての癌幹細胞の意義を明らかにする。癌幹細胞のアポトーシス抵抗性機構ならびに癌幹細胞の維持機構を解析し、将来的に癌幹細胞を標的とした分子標的治療を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

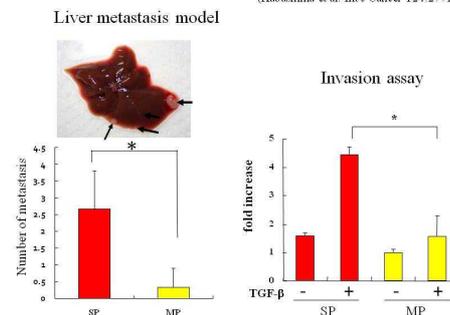
ヒト消化器癌細胞株(胃癌、大腸癌、膵癌、肝細胞癌)ならびに、臨床検体由来の培養細胞(胃癌、大腸癌、膵癌)を用い、癌幹細胞の分離培養を試みた。癌幹細胞の同定・分離法は、side population (SP)法、表面マーカー(CD133, CD44, CD24, など)を主として用いた。癌幹細胞分画が得られた場合は、FACSにて分離し、腫瘍形成能、コロニー/sphere形成能、転移能(脾臓局注による

肝転移モデル)、浸潤能(matrigelによるinvasion assay)、EMT(主としてTGF- β 添加によるE-cadherin, snail, slug, vimentinなどの変化)、薬剤によるアポトーシス感受性、を評価した。また、SP細胞をヒト骨髄由来間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell, MSC)と共培養し、癌幹細胞マーカー(主としてCD133)の発現レベル、EMT、ならびに腫瘍形成能を検討した。

4. 研究成果

膵癌細胞においては、side population (SP)細胞が非SP細胞と比較して、腫瘍形成能及びコロニー形成能が高いこと、抗癌剤(5-fluorouracil, cisplatin)あるいはアポトーシス誘導分子(tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand, TRAIL)に対する抵抗性が高いこと、in vivo転移モデルにおける転移能及びin vitro invasion assayにおける浸潤能が高いこと(図1)、転移浸潤の過程において重要なプロセスであるEMT誘導刺激(TGF- β)に対する反応性が高いことを明らかにし、報告した。

Fig.1 SP cells have more metastatic/invasive property than MP cells (Kabashima et al. Int J Cancer 124:2771, 2009)



肝癌細胞においては、既存の癌幹細胞マーカーであるCD133陽性細胞の分画中にSP細胞と非SP細胞が存在することを見出し、CD133陽性細胞群の中でもSP細胞の

みが高いコロニー形成能や腫瘍形成能をもつ癌幹細胞分画であることを明らかにした(2010年, American Association for Cancer Research, AACR, annual meetingにて発表)。

上記の他に、幹細胞分離・同定法として幹細胞特異的シグナルに着目し、幹細胞さらに、胃癌、膵癌において、stem cell geneであるNanogのpromoter依存性にGFPを発現するレポーター遺伝子導入細胞を作製、膵癌においてはNotchシグナル依存性に改変型GFP(dVenus)を発現するレポーター遺伝子を導入した細胞を作製し、NanogあるいはNotchを発現する細胞分画は高いsphere形成能を有することを見出した(2009年, AACR annual meetingにて発表)。さらに、大腸癌細胞、膵癌細胞を用い、抗癌剤(5-FU, gemcitabineなど)の短時間投与による細胞選択を行い、薬剤性アポトーシス抵抗性の分画を採取したところ、これらの細胞にはOct 4, Nanogなどの幹細胞特異的遺伝子が高発現しており、高いsphere形成能をもつことを見出した(2010年, AACR annual meetingにて発表)。

膵癌SP細胞の転移、浸潤、EMTは、間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell, MSC)との共培養により強く誘導され、さらにNOD-SCIDマウスへの共移植実験では、MSCと膵癌細胞を共移植した際に著しく強い腫瘍形成能が観察されうる事を見出した(2010年, AACR annual meetingにて発表)。さらにその後の解析により、MSCとの共培養によって膵癌SP細胞中のCD133陽性細胞が増加することが明らかになり、MSCにより癌幹細胞維持のための細胞外微小環境(cancer stem cell niche)が形成されていることが示唆された(未発表)。現在MSC由来の諸因子によるEMT誘導の機序を解析している。

癌幹細胞は腫瘍を構成する癌細胞のうちのごく一部の細胞群であり、自己複製

能および分化能を有し、アポトーシス抵抗性を有するため腫瘍の再発に大きな役割を果たす。本研究の結果により、遠隔転移や局所浸潤においても癌幹細胞が重要な役割を果たすことが示唆された。また、癌幹細胞の転移、浸潤、EMTには、間葉系細胞由来の因子が重要であることが示された。癌根治のため、あるいは癌進展抑制のための治療戦略として、癌幹細胞あるいは間葉系細胞を標的とした治療の重要性が示唆された。

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 2件)

Satoshi Kurita, Hajime Higuchi, Yoshimasa Saito, Nobuhiro Nakamoto, Hiromasa Takaishi, Shinichiro Tada, Hidetsugu Saito, Gregory J. Gores, Toshifumi Hibi. Cancer Sci 101:1431-1439, 2010 査読有

Ayano Kabashima, Hajime Higuchi, Hiromasa Takaishi, Yumi Matsuzaki, Sadafumi Suzuki, Motoko Izumiya, Hideko Iizuka, Gen Sakai, Shigenari Hozawa, Toshifumi Azuma, Toshifumi Hibi. Side population of pancreatic cancer cells predominates in TGF-beta mediated epithelial to mesenchymal transition and invasion. Int J Cancer 124:2771-2779, 2009 査読有

[学会発表](計 4件)

Masayuki Adachi, Hajime Higuchi, Ayano Kabashima, Shinsuke Funakoshi, Shoko Nakamura, Hiromasa Takaishi, Toshifumi Hibi. Wnt signaling contributes to the maintenance of cancer stem cell-like populations in Huh7 hepatocellular carcinoma cell line: Role of hepatic stellate cells. AACR meeting abstract 2010, 203 April 17-21, 2010, Washington

Motoko Izumiya, Hajime Higuchi, Ayano Kabashima, Toru Igarashi, Shoko

Nakamura, Shinsuke Funakoshi, Masayuki Adachi, Hiromasa Takaishi, Toshifumi Hibi. Cancer stem cell like properties of 5-fluorouracil resistant Panc AACR meeting abstract 2010, 335 101st American Association for Cancer Research, April 17-21, 2010, Washington

Ayano Kabashima, Hajime Higuchi, Yumi Matsuzaki, Shinsuke Funakoshi, Masayuki Adachi, Motoko Izumiya, Gen Sakai, Toru Igarashi, Shoko Nakamura, Hiromasa Takaishi, Toshifumi Hibi. Mesenchymal stem cells induce epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in metastatic SP cells in pancreatic cancer. AACR meeting abstract 2010, 387 101st American Association for Cancer Research, April 17-21, 2010, Washington

Gen Sakai, Hajime Higuchi, Hiromasa Takaishi, Motoko Izumiya, Masaya Adachi, Ayano Kabashima, Shouko Nakamura, and Toshifumi Hibi. Isolation and identification of Notch signal positive cells in pancreatic cancer cell line. AACR meeting abstract 2009, 193 100th American Association for Cancer Research. April 18-22, 2009 Denver

〔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

樋口 肇 (HIGUCHI HAJIME)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：20306682

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし