

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591531

研究課題名（和文） ヒト胃・大腸癌幹細胞の分離同定と治療標的分子の特定

研究課題名（英文） Isolation and characterization of stomach and colon cancer stem cells in human

研究代表者：

鄭 允文 (ZHENG YUN-WEN)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：80404995

研究成果の概要（和文）：癌幹細胞の存在は、癌治療において非常に重要なものと考えられる。本研究では、大腸癌幹細胞マーカーである細胞表面抗原 CD133 に CD44 を加え、フローサイトメトリーによってより高純度な分離を目指し、癌幹細胞の存在が示唆された細胞群の特性解析を実施した。また、分画された細胞に対し正常な腸管幹細胞マーカーである LGR5 の発現を指標とした 167 症例の予後解析の結果から、CD133、CD44、LGR5 の発現は予後予測因子として重要であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Previous reports have demonstrated that CD133⁺CD44⁺ cells might be putative colorectal cancer stem cells (CSCs). Intestinal stem cell marker is already identified as LGR5 in mice and human. However the correlation of CSCs and normal stem cell are unclear. LGR5 may play a crucial role in the carcinogenesis and tumorigenesis. In this study, we investigated the relation of LGR5 and CSC marker, CD133 and CD44. In vivo subcutaneous transplantation showed that as few as 100 CD133⁺CD44⁺ cells from primary tumor tissue had tumorigenicity in NOD/SCID mice. In xenograft tumor, LGR5, CD133 and CD44 were over-expressed compared with primary cancer and adjacent normal mucosa. In 167 clinical specimens, LGR5, CD44 or CD133 was expressed strongly compared with normal mucosa ($p < 0.0001$). However, with any single marker was not enough to predict the prognosis. Instead, combined with CD44 or CD133, the group of LGR5 over-expression showed significantly low survival rate ($p < 0.022$). We conclude that LGR5⁺, CD133⁺ or CD44⁺ cells expressed the characters of cancer stem cells in xenograft tumors as well as in primary colorectal cancers. Importantly, LGR5 is a potentially critical factor determining prognosis in clinics.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：消化器癌、幹細胞、フローサイトメトリー、腫瘍形成能、移植、予後予測因子

1. 研究開始当初の背景

消化器癌は年間罹患者数が 25 万人を超える主要な悪性疾患の一つである。進行症例、再発症例などの治療成績は依然として限定的といわざるを得ず、これらの癌に対する新しい視点からの革新的な治療法の開発が急務である。

現状を打開する突破口の一つとして、当研究室が世界のトップを走る固形臓器における幹細胞研究からさらに発展し、正常組織と同様、癌組織においても“癌幹細胞 (cancer stem cell)” を頂点とする階層的な細胞社会 (幹細胞システム) が存在する可能性を示してきた (Chiba T, Zheng YW et al. *Hepatology* 2007, 133(3):937-950, Chiba T, Zheng YW et al. *Gastroenterology* 2007, 133(3):937-950)。このような“癌幹細胞”は、放射線・化学療法に耐性を示し、再発・転移の起点となっていると考えられる。本研究は、“癌幹細胞”を対象とした新規抗癌療法の開発を目標として、罹患率の高い胃癌や大腸癌における“癌幹細胞”を臨床検体より分離・同定し、その細胞生物学的な特性解析、ならびに特異的発現を示す分子群の同定を試みることにより、治療標的分子を抽出し、切除不能症例等、進行癌に対する革新的治療薬の開発の基盤を確立する。

2. 研究の目的

本研究では、精度の高い細胞分離法である FACS (fluorescence activated cell sorting) を駆使して、ヒト消化器癌 (主として大腸癌) 組織中に存在する癌幹細胞 (cancer stem cell) を分離・同定し、その特性解析を行うことにより、分化増殖の制御機構、及び自己複製機構を解明する。さらに、癌の再発・転移に密接に関与していると考えられる癌幹細胞に対する特異的な治療標的分子の特定を試みる。

3. 研究の方法

大腸癌の臨床検体 (原発巣および肝転移巣) は本学医学研究科消化器病態外科学、付属市民総合医療センター、並びに神奈川がん臨床研究・情報機構、それぞれの機関における倫理審査委員会の承認後に提供されたものを用いた。その臨床検体の一部を酵素処理により単一細胞にした。単一細胞化した一部の細胞はそのまま NOD/SCID (non - obese

diabetic severe combined immunodeficiency) マウスに皮下注射し、Xenograft を作製した。多くの細胞は各種蛍光標識モノクローナル抗体でラベリングし、フローサイトメトリーを用いた細胞の画分を行い、各画分細胞の移植から腫瘍形成アッセイ、組織学的解析、遺伝子発現解析を行った。

1 回の sorting 後に形成された腫瘍を first xenograft、この腫瘍を再度単細胞化した後に、フローサイトメトリーで分離、移植してできた腫瘍を second xenograft と、繰り返し移植を行っていった。

4. 研究成果

(1) 正常組織幹細胞と癌幹細胞の類似性に着目し、正常大腸上皮における幹細胞マーカーを探索した。癌幹細胞マーカーとして報告された CD133、CD44 を正常粘膜、腫瘍、Xenograft で染色した。正常粘膜では CD133 は陰窩底部を中心に transit amplifying cell に向かってブロードに、CD44 が陰窩底部に CD133 よりも限局して観察された。肝転移巣においても発現が維持されていたことから、腫瘍再構築に関わっており、癌幹細胞である可能性が考えられた。xenograft においても、CD133、CD44 は染色され発現が維持されていることが確認され、肝転移同様、腫瘍再構築にこれらの発現細胞が関わっている可能性が示唆された。

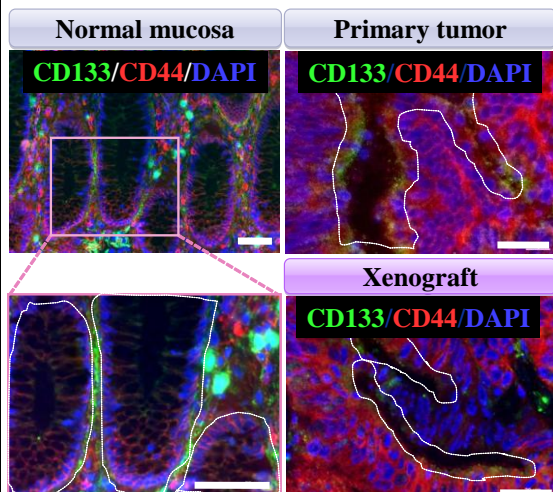


図 1 正常粘膜、腫瘍、Xenograft の免疫染色

(2) 次に、フローサイトメトリーにより CD133、CD44 で分画化した各細胞画分の腫瘍

形成能を評価した所、CD133 および、CD44 の陽性細胞において腫瘍が形成された。CD133⁺CD44⁺細胞においては僅か100細胞の移植で腫瘍が形成され、高い腫瘍形成能が示された。したがって、同表現型の細胞画分に大腸癌幹細胞が多く含まれることが示唆された。

Cell No	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶
Total cells		2/5	13/19	16/22	6/8
Non blood cells	0/3		1/3	1/3	
CD133 ⁺	0/2	3/13	1/3		
CD133 ⁻	0/1	0/1	3/16	2/3	
CD44 ⁺	1/3	5/13	0/3		
CD44 ⁻	0/4	1/5	2/13	0/2	
CD133 ⁺ CD44 ⁺	1/4	4/8	1/2		
CD133 ⁺ CD44 ⁻	0/6	0/4	0/2		
CD133 ⁻ CD44 ⁺	0/2	0/9	2/6		
CD133 ⁻ CD44 ⁻	0/2	1/5	1/5	0/1	

(Total n=54, CD133 n=16, CD44 n=13, CD133CD44 n=24; Tumor formation check time=20 weeks.)

図2 腫瘍形成アッセイ

(3) また、NOD/SCID マウス皮下で作製した Xenograft におけるフローサイトメトリーにおいて解析した結果、Xenograft では原発巣と比較して、優位に CD133⁺CD44⁺細胞の割合が増加しており、発生過程や発癌過程等の急速な組織構築の際には癌幹細胞による増幅が起こると考えられていることから、CD133⁺CD44⁺細胞が腫瘍再構築の際にも重要な役割を示している可能性が示唆された。

(4) 分画化した細胞に対して正常な腸管幹細胞マーカーである LGR5 の発現解析を行った結果、症例毎に LGR5 の発現がばらついたものの、臨床検体 167 例における予後解析においては、各 CD133、CD44、LGR5 単独の発現では予後相関を認めないか、予後相関が低いものに対し、CD133、CD44、LGR5 の発現がとも高い症例において優位に予後不良であるという結果となった。これらの事から、CD133⁺CD44⁺細胞は癌幹細胞の可能性が高く、CD133、CD44、LGR5 の発現は予後予測因子として重要であると考えられた。

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 15 件)

- Ishikawa M, Sekine K, Okamura A, Zheng YW, Ueno Y, Koike N, Tanaka J, Taniguchi H: Reconstitution of hepatic tissue architectures from fetal liver cells obtained from a three-dimensional culture with a rotating wall vessel bioreactor. *J Biosci Bioeng* (in press).
- Li B, Zheng YW, Sano Y, Taniguchi H: Evidence for mesenchymal-epithelial transition associated with mouse hepatic stem cell differentiation. *PLoS ONE* 6(2): e17092, 2011.
- Suzuki A, Sekiya S, Gunshima E, Fujii S, Taniguchi H: EGF signaling activates proliferation and blocks apoptosis of mouse and human intestinal stem/progenitor cells in long-term monolayer cell culture. *Lab Invest* 90(10):1425-36, 2010.
- Aoki R, Chiba T, Miyagi S, Negishi M, Konuma T, Taniguchi H, Ogawa M, Yokosuka O, Iwama A, The polycomb group gene product Ezh2 regulates proliferation and differentiation of murine hepatic stem/progenitor cells. *J of Hepatology* 52:854-63, 2010.
- Tatsuishi Y, Hirota M, Kishi T, Adachi M, Fukui T, Mitsudo K, Aoki S, Matsui Y, Omura S, Taniguchi H, Tohna I: Human salivary gland stem/progenitor cells remain dormant even after irradiation. *International Journal of Molecular Medicine* 24(3):361-6, 2009.
- 谷口英樹: 消化器官における幹細胞研究はどのようにしてはじまったのか? *分子消化器病 先端医学社* 6(3):107-113, 2009.
- 宮田秀俊, 鄭允文, 谷口英樹: 大腸幹細胞とニッチ 再生医療 8(2):37-44, 2009.
- 鄭允文, 李 斌, 谷口英樹: 肝幹細胞の分離・移植手技 *再生医療* 8(1):89-94, 2009.
- Suzuki A, Sekiya S, Onishi M, Oshima N, Kiyonari H, Nakauchi H, Taniguchi H: Flow cytometric isolation and clonal identification of self-renewing bipotent hepatic progenitor cells in adult mouse liver. *Hepatology* 48(6): 1964-78, 2008.
- Chiba T, Miyagi S, Saraya A, Aoki R, Seki A, Morita Y, Yonemitsu Y, Yokosuka O, Taniguchi H, Nakauchi H, Iwama A: The polycomb gene product BMI1 contributes to the maintenance of tumor-initiating side population cells in hepatocellular carcinoma.

- Cancer Research* 68(19):7742-9, 2008.
11. Suzuki A, Sekiya S, Büscher D, Izpisua Belmonte JC, Taniguchi H: Tbx3 controls the fate of hepatic progenitor cells in liver development by suppressing p19ARF expression. *Development* 135(9): 1589-1595, 2008.
 12. 宮田秀俊, 鄭允文, 谷口英樹: 固形癌における癌幹細胞の分離・同定 *Organ Biology* 15(4):357-367, 2008.
 13. 谷口英樹: 消化器癌における癌幹細胞研究の動向 *最新医学* 63(12)97-104, 2008.
 14. 谷口英樹: 癌幹細胞 (cancer stem cell) 研究の動向 *BIO EX-press* 新緑号 10-14, 2008.
 15. 谷口英樹: 消化器領域における組織幹細胞の特性 *実験医学* 26(5)204-205, 2008.

[学会発表] (計 33 件)

1. 谷口英樹: 前癌細胞 (pre-cancerous cell) の増殖制御に基づく肝発癌抑制療法の開発 第 9 4 回医工学フォーラム招待講演 Mar. 25. 2011 京都.
2. Yu HW: Acyclic retinoid inhibits hepatic stem/progenitor cell proliferation and induces cell apoptosis in vitro 第 10 回日本再生医療学会総会 Mar. 1-2, 2011 東京.
3. 土田倫範: 非環式レチノイドの肝幹/前駆細胞を介した肝発癌抑制作用の検討 第 10 回日本再生医療学会総会 Mar. 1-2, 2011 東京.
4. 谷口英樹: 再生医療の臨床応用はどこまで進んでいるのか? 横浜市港南区医師会創立 4 0 周年記念学術講演会 特別講演 Feb. 26. 2011 横浜.
5. Li B: Mesenchymal epithelial transition is accompanied with mouse hepatic stem cells differentiation 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 ポスター Dec. 7-10. 2010 神戸
6. 生天目明子: 化学放射線療法を実施したヒト膵癌組織における膵癌幹細胞マーカーの発現解析 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 ポスター Dec. 7-10. 2010 神戸
7. 秋本和憲: 細胞極性制御因子 aPKC λ による上皮前駆細胞の増殖制御とその破綻 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 ワークショップ Dec. 7-10. 2010 神戸
8. Zheng YW: Self-renewal versus differentiation in vitro of human hepatic stem cells, BIT's 3rd Annual world Congress of Regenerative Medicine & Stem Cells 2010, Dec. 5-7, Shanghai, China.
9. 谷口英樹: 幹細胞から癌を読み解く— 癌幹細胞という概念— 日本婦人科腫瘍学会第 4 9 回学術講演会 教育講演 Dec. 4-5. 2010 佐賀
10. Zheng YW: Clonal identification and differentiation of human hepatic stem cells. 8th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June 16-19, 2010 in San Francisco, USA.
11. Li B: Mesenchymal epithelial transition in the differentiation process of mouse hepatic stem cells. 8th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June 16-19, 2010 in San Francisco, USA.
12. 谷口英樹: 幹細胞から癌を読み解く — 癌幹細胞という概念— 第 6 9 回日本癌学会学術集会 癌入門コース 1 講演 September 22-24, 2010 大阪
13. 谷口英樹: 幹細胞研究の形成外科領域への応用 第 1 9 回日本形成外科学会基礎学術集会 特別講演 Sep. 16-17, 2010 横浜
14. 河俣真由美: ヒト大腸癌における CD133⁺CD44⁺CD45⁻CD235a⁻細胞の腫瘍形成能と局在分析 第 65 回日本消化器外科学会総会 July 5, 2010. 山口
15. 谷口英樹: 消化器領域における癌幹細胞研究の動向 第 1 1 回九州がん懇話会特別講演 Apr. 17, 2010 福岡
16. 嶋尾大樹: 非環式レチノイドによる肝発癌抑制作用の検討 第 9 回日本再生医療学会総会 Mar. 18-19, 2010 広島.
17. 谷口英樹: 消化管における幹細胞研究の現状と展望 第 22 回日本小腸移植研究会 ランチョンセミナー Mar. 5, 2010 東京.
18. 滝口和也: Effects of acyclic retinoid on hepatic progenitor cell in vitro 第 32 回日本分子生物学会年会 Dec. 9-12, 2009 横浜.
19. 中澤賢一: ヒト大腸癌における CD133⁺CD44⁺細胞の腫瘍形態能と局在解析 口頭 第 68 回日本癌学会学術集会 Oct, 1-3, 2009 横浜.
20. 加川友己: 個体ベースモデルを用いた腸管陰囊における細胞増殖分化のシミュレーション (Cell proliferation and differentiation in the intestinal crypt using an individual-based model) 第 19 回日本数理生物学会年会 Sep. 9-11, 2009 東京.

21. Li B: The prospective identification and differentiation of human hepatic stem cells. The 7th Stem Cell Research Symposium May 15-16, 2009 Tokyo.
22. Zheng YW: Human hepatic stem cell: the prospective isolation and characterization. The Okayama 2009 Joint Conference of The 10th International Cell Transplant Congress and The 36th Annual Meeting of The Japan Society for Organ Preservation and Medical Biology (JSOPMB) Apr. 20-21, 2009 Okayama.
23. 加川友己: 腸管上皮における細胞増殖・分化過程の数理モデリング 日本物理学会第64回年次大会 Mar, 27-30, 2009 東京.
24. 李斌: BMI1 過剰発現によるヒト肝幹細胞から肝細胞への分化 第8回日本再生医療学会総会 Mar. 5-6, 2009 東京.
25. 鄭允文: フローサイトメトリーを用いたヒト肝幹細胞の分離・同定 第8回日本再生医療学会総会 Mar. 5-6, 2009 東京.
26. 宮田秀俊: ヒト大腸癌における癌幹細胞の分離同定及び特性解析 第8回日本再生医療学会総会 Mar. 5-6, 2009 東京.
27. Li B: INDUCING FUNCTIONAL HEPATOCYTES FROM HUMAN HEPATIC STEM CELLS WITH A NOVEL CULTURE SYSTEM. The 2nd International Workshop Co-Sponsored by Yokohama City University(YCU) & Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), United States Food and Drug Administration (FDA) Mar. 4, 2009 Yokohama.
28. Zheng YW: The current topics on cancer stem cells in solid cancer. Frontier of Cancer Therapy. The 1st Joint Seminar of YCU-Texas University MD Anderson Cancer Center. Feb 15, 2009, Yokohama, Japan.
29. 谷口英樹: ヒト組織幹細胞クローンの産業利用へ向けて 第8回ヒューマンサイエンス研究資源バンクセミナー 招待講演 Jan. 27, 2009 大阪.
30. 堀田徳子: 結腸陰窩における細胞増殖分化の時空間ダイナミクス 第5回「生物数学の理論とその応用」 Jan, 13-16, 2009 京都.
31. 谷口英樹: 創薬プロセスの加速化に向けたヒト幹細胞の利用 第59回日本電気泳動学会総会 シンポジウム Nov. 15-16, 2008 横浜.
32. 谷口英樹: 固形臓器における幹細胞研究の新展開 かわさきサイエンス&テクノロジーフォーラム 2008 先端医療

セッション 招待講演
Nov. 12-13, 2008 川崎.

33. 谷口英樹: 大腸癌における癌幹細胞(cancer stem cell)研究の動向 昭和大学横浜市北部病院消化器センターと都築区内科医会との連携勉強会 特別講演 Oct. 27, 2008 横浜.

[図書] (計 3件)

1. 谷口英樹, 大島祐二, 喜多 清: iPS細胞の糖尿病治療への応用—現状と課題— iPS細胞の産業的応用技術 シーエムシー出版 2009: 202-210
2. 谷口英樹: 肝臓 炎症・再生医学事典 朝倉書店 2009: 470-472
3. 谷口英樹: 創薬プロセスの加速化に向けたヒト幹細胞の産業利用 幹細胞の分化誘導と応用—ES細胞・iPS細胞・体性幹細胞研究最前線— NTS 2009: 379-389

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鄭 允文 (ZHENG YUN-WEN)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号: 80404995

(2) 研究分担者

谷口 英樹 (TANIGUCHI HIDEKI)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号: 70292555

上野 康晴 (UENO YASU HARU)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号: 60375235

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

小澤 真由美 (KOZAWA MAYUMI)
横浜市立大学・大学院医学研究科・消化器病態外科学・大学院生

宮田 秀俊 (MIYATA HIDETOSHI)
横浜市立大学・大学院医学研究科・臓器再生医学・大学院生

中澤 賢一 (NAKAZAWA KENICHI)
横浜市立大学・大学院医学研究科・臓器再生医学・大学院生

近藤 諒久 (KONDO AKIHISA)
横浜市立大学・大学院医学研究科・臓器再生医学・大学院生

大田 貢由 (OTA MITSUYOSHI)
横浜市立大学・附属病院・准教授

辰巳 健志 (TATSUMI KENJI)
横浜市立大学・医学部・助教

市川 靖史 (ICHIKAWA YASUSHI)
横浜市立大学・医学研究科・准教授

遠藤 格 (ENDO ITARU)
横浜市立大学・医学研究科・教授

大島 貴 (OSHIMA TAKASHI)
横浜市立大学・市民総合医療センター・准教授

藤井正一 (FUJII SHOICHI)
横浜市立大学・市民総合医療センター・准教授

(4) 研究協力機構

神奈川がん臨床研究・情報機構