

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591579

研究課題名(和文) GISTにおけるがん幹細胞の同定と機能解析；グリベック耐性克服を目指して

研究課題名(英文) Identification and characterization of cancer stem cells in gastrointestinal stromal tumors for overcome Glivec-resistance

研究代表者

才川 義朗 (SAIKAWA YOSHIRO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：00225682

研究成果の概要(和文)：

がん幹細胞マーカーである CD133 の発現と機能について GIST 臨床検体、病理標本、初代培養及び xenograft Lines を対象に解析を行った。結果として、CD133 陽性細胞は、高い腫瘍形成能、グリベック抵抗性を有していた。免疫組織染色法による病理学的検証では、GIST に対する特異性を示す傾向が示唆された。以上の結果より、GIST における CD133 陽性細胞は、がん幹細胞活性を有することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：

Some evidences have suggested that CD133/Prominin1 is a marker for a subset of cancer stem like cells in solid tumors. Our study for the first time provided evidence that CD133 positive cancer stem cells display capability on tumorigenesis and resistance to glivec. CD133 is expressed in the minority of GISTs, suggesting a novel, additional standard marker for identifying cancer stem cells (CSCs). Future studies should focus on the role of CD133 in the pathogenesis of GIST and subsequently on its potential to act as a molecular target for adjuvant therapy with new molecular antitumor agents.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：癌幹細胞

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：GIST、癌幹細胞、CD133、グリベック

1. 研究開始当初の背景

GIST の分子生物学的特徴は、KIT(c-kit 遺伝子産物)や CD34 を発現し純粋な平滑筋

(肉)腫や神経鞘腫とは表現型が異なり、約 90% の GIST では c-kit 遺伝子変異が認められ、従来の化学療法や放射線療法に抵抗性が高

く、特に転移のみられる場合や手術施行が不可能な症例は、治療困難ながんの典型といわれている。これまで、本質的な寛解を得るための唯一有効な治療は外科手術とされてきたが、KIT や PDGFR を阻害するチロシンキナーゼ阻害剤が開発され、臨床応用されている。一方、乳癌、脳腫瘍などの様々な固形癌において、少数のがん幹細胞を基点とした階層性の存在が示唆されはじめている。このがん幹細胞は薬剤耐性能が高く、癌組織へ分化するとともに活発に増殖し腫瘍形成することが相次いで報告されている。しかしながら、GIST におけるがん幹細胞の存在を証明した報告はこれまでにない。その一因として、組織幹細胞研究は比較的歴史が浅く、幹細胞を特異的に認識するマーカー・遺伝子群の同定が進展していないことがあげられる。

2. 研究の目的

GIST（消化管間質腫瘍；gastrointestinal stromal tumor）とは、食道・胃・小腸・大腸などの消化管の壁にできる腫瘍で「粘膜下腫瘍」を構成する腫瘍の一種である。GIST の腫瘍細胞は、消化管壁の下にある筋肉層から発生したものである。GIST のほとんどの発生原因は c-kit 遺伝子の機能獲得型突然変異である。c-kit 遺伝子の機能獲得型突然変異は、その後も GIST の増殖能に深く関与している。GIST に c-kit 遺伝子変異を認めない場合、イマチニブの奏効率は低い。GIST に c-kit 遺伝子変異を認めず、KIT 蛋白質の活性化を認めることがあり、このような場合 PDGF-R のキナーゼ領域に変異を認めることがあり、この変異に対してはイマチニブの阻害効果は低

く、臨床効果は現時点では期待しにくい。

このような背景のもと、本研究では前項で述べた DNA 結合色素および各種モノクローナル抗体により GIST がん幹細胞を分離する方法を確立する。また、GIST がん幹細胞を分離することができれば、直接ターゲットにした prospective な機能解析が可能となり、イマチニブ耐性機構の解明やがん細胞の本質を理解するための有用な研究の材料となるであろう。

このように、GIST がん幹細胞の存在を検証し、GIST の発生や進展におけるがん幹細胞の本態を明確にすることは、発癌機構の理解や胃粘膜下由来の各種疾患の本態解明ならびに新治療法の開発に貢献し得るだけでなく、幹細胞を用いた再生医学の技術基盤の確立につながると予測される。また、薬剤抵抗性を持つ幹細胞の残存が GIST をはじめとする固形癌の化学療法後再発の一要因との考えから、がん幹細胞の同定ならびにがん幹細胞を標的とした治療法の開発に期待が寄せられており、この点で本研究の持つ意義は非常に大きいといえる。

3. 研究の方法

本研究では、GIST がん幹細胞の分離・同定後、その機能解析および発現遺伝子群・蛋白群のプロファイリングを行い、GIST の発生や進展におけるがん幹細胞の役割を明らかにし、最終的にはがん幹細胞をターゲットとした新たな分子標的による癌治療の確立を目指す。その方法として、本課題では研究期間内に次の3点について重点的に検討する。(1) GIST 患者の切除標本から採取した癌

組織及び樹立した GIST 細胞株を用いて、既知のがん幹細胞マーカーや Hoechst 染色にもとづく Side Population (SP) 法を応用して、prospective になん幹細胞の分離を試みる。

(2) 分離した細胞について、それぞれ単一もしくは少数で GIST の造腫瘍性能を有するかどうかを免疫不全マウス(NOD/SCID/ γ cnul immunodeficient)への移植等により検討する。

(3) がん幹細胞を *in vitro* で維持・分化誘導するための培養系を確立し、遺伝子群および蛋白質群のプロファイリングと機能解析を行う。最終的に、がん幹細胞の分化や増殖に関与する遺伝子群を同定し、腫瘍形成抑制に働く因子をつきとめ、GIST の発生を抑制する 1 次予防および再発防止に寄与する薬剤あるいは低分子化合物等を探索する。

4. 研究成果

CD133 は神経系腫瘍、前立腺癌、大腸癌等において Tumor-initiating cells のマーカーとして注目される。われわれは、GIST における CD133 の発現と機能について臨床検体、GIST 由来初代培養 2 細胞株及び 3 つの xenograft Lines を対象に解析を行った。(Fig1, 2)

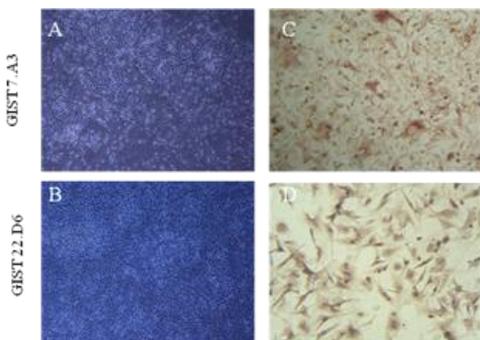


Fig.1 GIST臨床検体より樹立したGIST細胞株 (A: GIST7.A3, B: GIST22.D6) の評価
A)B)樹立した細胞の形態像。C), D)抗ヒトKIT抗体を用いたDAB染色による組織像。
(Magnification $\times 200-400$)

初代培養細胞の腫瘍形成能の評価を SCID マウスへの皮下移植により評価した結果、

GIST7 及び 22 で腫瘍形成を確認することができた。また、病理解析では、紡錘状の組織像を有し、免疫組織染色では KIT が陽性であった。

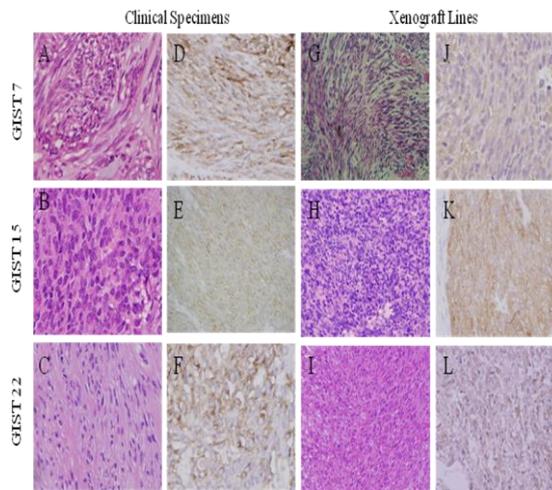


Fig.2 GIST臨床検体及びGIST Xenograft linesにおける免疫染色法によるKIT発現解析。A-C, G-Iは、HE染色による組織像。D-F及びJ-Lは、抗ヒトKIT抗体を用いたDAB染色による組織像。
(Magnification $\times 200-400$)

フローサイトメーターによる CD133 の発現解析では KIT 発現細胞と Marge する CD133 陽性細胞が同定された。また、CD133 高発現細胞の NOG マウスでの造腫瘍性は、CD133 発現と正の相関を示した (Fig.3)。

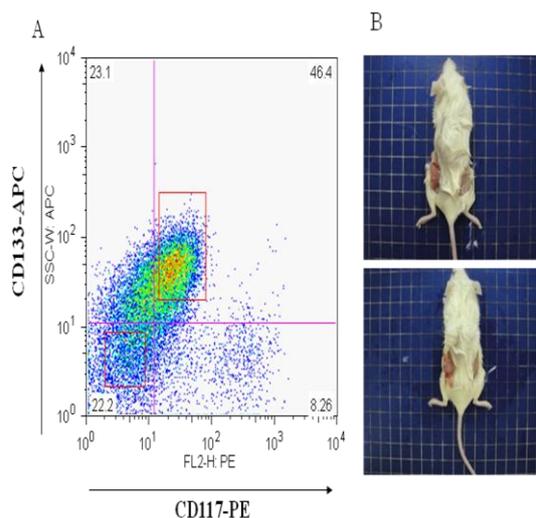


Fig.3 フローサイトメーターによるCD133/KIT発現解析および造腫瘍能の評価

Imatinib に対する薬剤感受性試験では、CD133 陰性細胞に比べ、CD133 陽性細胞で有意に耐性能を示した。GIST 細胞の一部は CD133 を発現し、腫瘍形成能、薬剤耐性などに関わる可能性を示した。

病理学的検証を免疫組織染色法により評価をおこなった。症例背景は、症例数;62 例、性別;男性 33 例/女性 29 例、年齢;26-86 歳、Size;1.5-23cm、Delle+/-;12 例/38 例、KIT 陽性率;95.2%、CD34 陽性率;98.4%、Mitotic rate(/50HPF);0-5 (43 例)/6-10 (9 例)/11- (7 例)、Risk;Low (29 例)/Intermediate (20 例)/high (11 例)である。判定結果として、CD133 陽性率は 80.6% (50/62) であり、GIST に対する特異性が示された (Fig.4)。

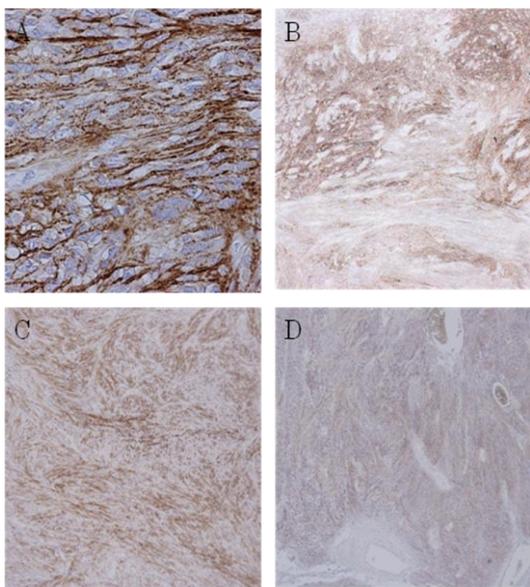


Fig.4 免疫染色法を用いた臨床検体におけるCD133発現評価

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0件)

[学会発表] (計0件)

[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

才川 義朗 (SAIKAWA YOSHIRO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号: 00225682

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし