

平成22年3月31日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790303
 研究課題名（和文）抗癌剤を用いた腸癌の治療における c-KIT 陽性癌細胞の役割
 研究課題名（英文）The role of c-KIT positive cancer cells in a drug resistance of the intestinal tumors
 研究代表者
 北村 剛規（KITAMURA TAKANORI）
 京都大学・医学研究科・助教
 研究者番号：10378622

研究成果の概要（和文）：

Apc/Smad4 複合変異マウスは、著しい浸潤を伴う腸癌を発症する。本研究により、このマウスの腸癌では浸潤先端部の癌細胞が未分化細胞に特徴的な c-KIT を強く発現していること、抗癌剤（5-fluorouracil）の投与により退縮した腫瘍においても浸潤先端部の c-KIT 陽性細胞は殆ど消失しないことが明らかとなり、これらの細胞が抗癌剤に対して抵抗性を持つ可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Apc/Smad4 compound mutant mice develop intestinal adenocarcinomas with marked tumor invasion. We demonstrated here that cancer cells at the invasion fronts expressed a progenitor cell marker c-KIT. Although 5-fluorouracil treatments retracted the invasive adenocarcinomas, the c-KIT positive cancer cells did not disappear from the tumors in contrast to the c-KIT negative cells. These results suggest that the c-KIT positive cells are resistant to 5-fluorouracil treatments.

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	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：腫瘍・マウスモデル・大腸癌、c-KIT、抗癌剤

1. 研究開始当初の背景

大腸癌の発生は年々増加しており、浸潤・転移を伴う進行癌に対する有効な治療薬が必要とされている。一般的に進行癌の治療には増殖細胞を標的とした抗癌剤

（5-fluorouracil など）が用いられるが、これらの薬剤で浸潤・転移を制御するのは困難であること、抗癌剤耐性細胞の顕在化により癌が再発することから高い治療効果を得るには至っていない。癌細胞が薬剤耐性を獲得

する機構は未だ明らかではないが、癌にも組織幹細胞や造血幹細胞のような癌幹細胞が存在し、これらが薬剤耐性に関与している可能性が示唆されている。正常な組織幹細胞は増殖の盛んな前駆細胞を供給する一方で、自身は必要が生じたとき以外には増殖しないこと、薬剤を排出するABCトランスポーターを高発現していることからこれら幹細胞はDNA合成阻害剤への抵抗性を持つと考えられている。これらの知見を基に、癌幹細胞は化学療法における癌の再発に関与しており、これらを標的にした治療によって既存の抗癌剤の効果を高めることが出来ると考えられている。

2. 研究の目的

がん抑制遺伝子のひとつであるApc遺伝子が欠損したApcノックアウトマウスは腸管に多数の良性腫瘍を形成する。一方、Apc遺伝子に加えて多くの大腸癌で不活性化しているSmad4遺伝子にも変異を持つApc/Smad4複合変異マウスは、腸管に著しい浸潤を伴う腺癌を発症する。申請者はこれまでにApc/Smad4複合変異マウスの腺癌では癌細胞における増殖マーカー(Ki67)の発現が浸潤先端部に向かって著しく低下していることを見出し、このマウスの腺癌には増殖静止状態にある癌細胞が存在すると考えられた。これまでに、大腸癌や脳腫瘍の中には血液幹細胞のマーカーであるCD133を発現する癌細胞が存在すること、これらCD133陽性細胞は免疫不全マウスに移植すると効率よく腫瘍を形成しうることが報告されており、癌幹細胞の存在を検討する上で血液幹細胞マーカーの発現が一つの指標となりうると考えられた。そこで本研究では、前述の増殖静止状態にある癌細胞が血液幹細胞のマーカーを発現しているか否かを明らかにすると共に、それらの癌細胞が抗癌剤抵抗性に関与する可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) Apcノックアウトマウスおよび、Apc/Smad4複合変異マウスの腸腫瘍組織を採取し、凍結切片を作成した後、血液幹細胞のマーカーとして知られるCD34, CD133, c-KITの発現を免疫染色およびRT-PCRで解析した。c-KITに関しては、そのリガンド(SCF: stem cell factor)の発現についても同様に解析した。

(2) Apc/Smad4複合変異マウスに抗癌剤として用いられている5-fluoro-uracilを投与した後、退縮した腫瘍組織を採取しc-KITの発現を免疫染色で解析した。

4. 研究成果

(1) Apc/Smad4複合変異マウスの腺癌にお

ける血液幹細胞マーカーの発現を免疫染色で検出したところ、腫瘍上皮細胞がCD133およびc-KITを発現していることを見出した。CD34は主に浸潤先端部に集簇する間質細胞に発現し、癌細胞自信には発現が認められなかった。一方、Apcノックアウトマウスの良性腫瘍では、腫瘍上皮細胞はCD133を発現しているもののc-KITの発現は認められなかった(図1)。興味深いことに、CD133の発現は腫瘍全域の癌細胞で見られたのに対してc-KITの発現は浸潤先端部にむかって強くなり、腫瘍上部(管腔側)にはほとんど発現が認められなかった。

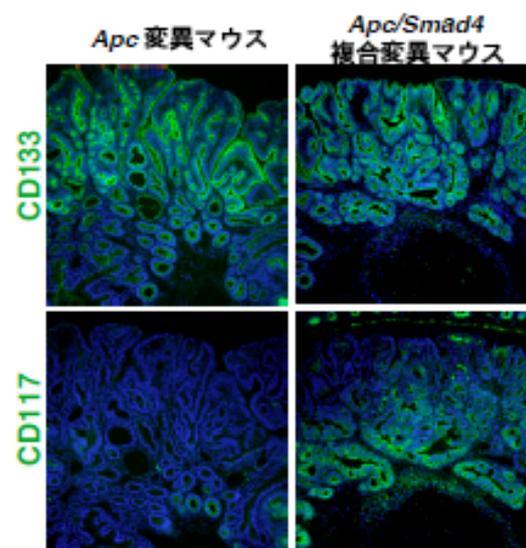


図1) ApcノックアウトマウスおよびApc/Smad4複合変異マウスの腫瘍におけるCD133 CD117(c-KIT)の発現

また、Apc/Smad4複合変異マウスの腺癌を用いて増殖マーカーであるKi67の発現様式とc-KITの発現と比較したところ、これらは逆相関にあることが分かった。すなわち、c-KITをほとんど発現していない管腔側の腫瘍上皮細胞はKi67を高発現していたのに対して、c-KITを高発現している浸潤先端部の腫瘍細胞はほとんど増殖していないことが分かった(図2)。

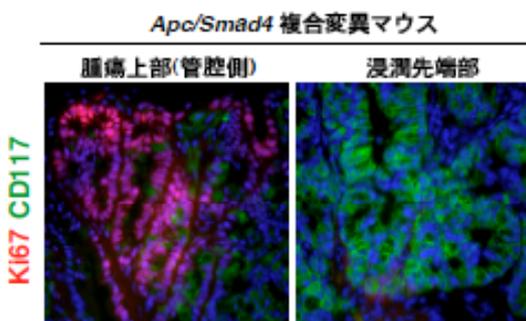


図2) Apc/Smad4複合変異マウスの腫瘍におけるCD117(c-KIT)とKi67の発現

我々は以前、*Apc/Smad4* 複合変異マウスの腺癌を免疫不全マウス (NOG マウス) の皮下に移植すると腫瘍塊を形成することを見いだしている。そこで、これら移植癌を同様に解析してみたところ、*c-KIT* を発現している腺腔と発現していない腺腔が存在すること、*c-KIT* の発現と *Ki67* の発現とが逆相関にあることが分かった (図3)。

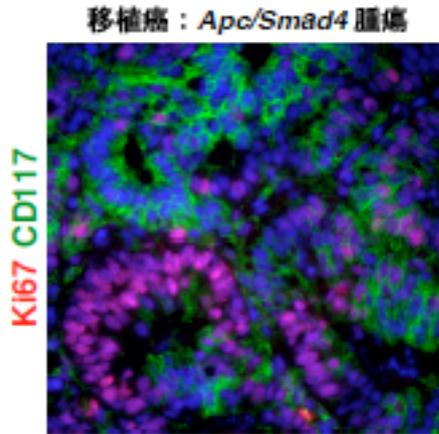


図3) 移植癌における *CD117(c-KIT)* と *Ki67* の発現 (*Apc/Smad4* 複合変異マウスの腫瘍を免疫不全マウスの皮下に移植して出来た腫瘍を採取し、*CD117(c-KIT)* と *Ki67* の発現を検討した。)

我々はつぎに、レーザーマイクロディセクションを用いて *Apc/Smad4* 複合変異マウスの腺癌から採取した腫瘍上皮細胞と間質細胞を用いて *c-KIT* およびそのリガンド *SCF* の mRNA の発現を RT-PCR で検討した。*c-KIT* mRNA は主に癌細胞に、*SCF* mRNA は癌細胞と間質細胞の両者に発現することが分かった (図4)。しかしながら、*SCF* に対する免疫染色を行ったところ、その発現は主に間質細胞に認められ、腫瘍細胞自身には発現していないことが分かった (図5)。

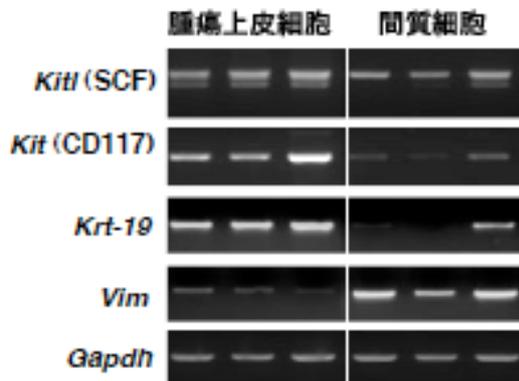


図4) *Apc/Smad4* 複合変異マウスの腫瘍における *SCF* および *CD117(c-KIT)* mRNA の発現

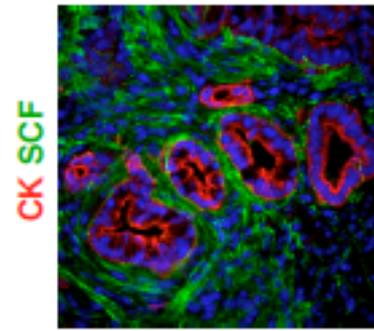


図5) *Apc/Smad4* 複合変異マウスの腫瘍における *SCF* の発現 (CK: サイトケラチンは腫瘍上皮細胞のマーカーとして使用している。図は浸潤先端部を示す。)

大腸癌では *GIST* や *AML* で見られる様な *c-KIT* 遺伝子の活性型変異は見つかっておらず、浸潤先端部の癌細胞が発現する *c-KIT* は癌間質細胞の産生する *SCF* によって活性化されていると考えられた。最新の報告によると大腸癌症例の 15% で癌細胞における *c-KIT* の発現が認められること、*c-KIT* と *SCF* を共に発現する症例では生存率が悪く、再発の危険性が高いことが報告されている。

(2) 抗癌剤投与による *c-KIT* 陽性癌細胞数の変動を解析する目的で、9 週齢の *Apc/Smad4* マウスに 5-fluorouracil (40mg/kg) を腹腔内投与した。過去の報告に従った 5 日間連続投与/9 日間休止のサイクルを 3 回繰り返す方法では多くのマウスが死に至るが、サイクルを 1 回にすると一部の腫瘍で退縮像が見られることがわかった。また、退縮の見られた腫瘍において *c-KIT* 陰性癌細胞は顕著に消失していたが、浸潤先端部の *c-KIT* 陽性細胞は殆ど消失していなかった (図6)。

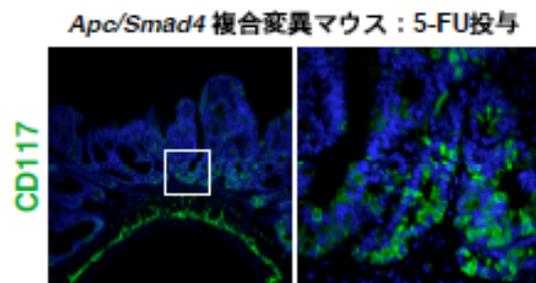


図6) 5-FU 投与後の *Apc/Smad4* 複合変異マウスの腫瘍における *c-KIT* の発現

これらの結果から、*c-KIT* 陽性癌細胞が抗癌剤 (5-fluorouracil) に対して抵抗性を持つ可能性が示唆された。これまでに、*c-KIT* を発現するヒト大腸癌細胞株 *HT29* では *c-KIT* 阻害剤 *imatinib* によりアポトーシスが誘導されることが報告されており、従来 of 抗癌剤に加え *c-KIT* 阻害薬を用いることで腸癌に対

する薬物療法の効果が高められると考えられる。

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 3 件)

①. Kitamura T, Fujishita T, Loetscherb P, Reveszb L, Hashidac H, Kizaka-Kondohd S, Aoki M, Taketo MM.

Inactivation of CCR1 suppresses colon cancer liver metastasis by blocking accumulation of immature myeloid cells in a mouse model.

Proc Natl Acad Sci USA. *In press* (査読有)

②. Du YC, Oshima H, Oguma K, Kitamura T, Itadani H, Fujimura T, Piao YS, Yoshimoto T, Minamoto T, Kotani H, Taketo MM, Oshima M.

Induction and down-regulation of Sox17 and its possible roles during the course of gastrointestinal tumorigenesis.

Gastroenterology. 137(4):1346-57. 2009 (査読有)

③. Arimura S, Matsunaga A, Kitamura T, Aoki K, Aoki M, Taketo MM.

Reduced level of smoothed suppresses intestinal tumorigenesis by down-regulation of Wne signaling.

Gastroenterology. 137(2): 629-38. 2009 (査読有)

④. Kitamura T, Biyajima K, Aoki M, Oshima M, Taketo MM.

Matrix metalloproteinase 7 is required for tumor formation, but dispensable for invasion and fibrosis in SMAD4-deficient intestinal adenocarcinomas.

Lab Invest. 89(1): 98-105. 2009 (査読有)

{

[学会発表] (計2件)

①. 北村剛規、藤下晃章、武藤誠

The role of CCR1-expressing myeloid cells in invasion and metastasis of colon cancer cells

第82回日本生化学会大会シンポジウム
平成21年10月22日 (東京)

②. 北村剛規、藤下晃章、武藤誠

腸癌の浸潤・転移における骨髄由来
CCR1発現細胞の役割

第10回運動器科学研究会

平成21年9月18日 (東京)

[その他]

ホームページ等

<http://www4.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北村 剛規 (KITAMURA TAKANORI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：10378622