

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2011

課題番号：22501005

研究課題名（和文） ヒト胃がん幹細胞の同定とその性質

研究課題名（英文） Identification and characterization of human gastric cancer stem cells

研究代表者

深町 博史（FUKAMACHI HIROSHI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：70134450

1. 研究成果の概要（和文）：我々はこれまでに、ヌードマウス皮下移植ヒト胃がん組織系を用いて、ヒト胃がん幹細胞のマーカーを同定した。またヒト原発胃がん組織を用いて解析し、ヒト胃がん幹細胞を同定した。更に我々は、ヒト胃がん幹細胞の無血清培養系を確立した。この培養系で、胃がん幹細胞は幹細胞に特徴的な“sphere”を形成して増殖し、増殖した細胞はマーカーを発現し、強い造腫瘍性を保持していた。現在この系を用いて、胃がん幹細胞の造腫瘍性の制御機構を調べている。

研究成果の概要（英文）：We established xenograft lines where human gastric tumor tissues maintain their differentiation and tumorigenesis. Using these lines, we identified a marker which was specifically expressed by gastric cancer stem cells. We also confirmed that the marker was expressed by cancer stem cells which were obtained from newly-dissected gastric cancers. Moreover, we established serum-free culture system where gastric cancer stem cells proliferate to form spheres, structures specific to stem cells. These sphere-forming cells expressed the antigen and were highly tumorigenic. We are now examining the mechanism how their tumorigenicity is controlled.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：がん細胞の特性・幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 従来のがん化学療法剤は、がんが均質な細胞集団であるとの仮定の下に、がん細

胞の細胞死を指標として開発されてきた。しかし、このようにして開発されてきたがん治

療薬では、がんを根治できないのが現状である。この現状を打破するためには、がんは均質な細胞集団であるという仮定を見直す必要がある。

(2) 最近、がんを構成する細胞の中で、造腫瘍性の高い細胞はごく一部であり、それらは、自己複製能と多分化能という、幹細胞で共通して見られる特徴を持つことが明らかになってきた。これらの細胞はがん幹細胞と呼ばれ、白血病と固形がんの多くで、がん幹細胞が見いだされている。がん幹細胞を同定し、それをターゲットとする治療法を開発すれば、がんの根治が可能となると考えられる。

(3) 胃がんは日本人のがん死亡原因の第2位（2006年部位別がん死亡数統計）で、その根治は緊急の課題であるが、胃がん幹細胞はまだ同定されていない。がん幹細胞の性質は試験管内培養すると急速に失われるので、これまで一般的には、原発がんから得られた細胞を生体内移植し、細胞が原発がんと同様な腫瘍を形成する能力があることを指標として、がん幹細胞が同定されてきた。しかし日本で行われている胃がん幹細胞の研究の多くは、胃がん細胞株を用いてなされている。長期間試験管内で継代された胃がん細胞株は、がん幹細胞とは性質が異なるので、胃がん幹細胞のモデルとしては不适当である。胃がん幹細胞の研究には、原発胃がんを使用する必要がある。

(4) そこで本研究では、原発胃がんの細胞を用いて、胃がん幹細胞を同定する。この研究を進めることによって初めて、胃がんの根治を可能とする新しい治療法が開発できると考えている。

(5) 我々はこれまでに、以下の点を明らかにしてきた。

① ヒト胃がん株細胞と原発胃がんの

細胞とは、発現する細胞表面抗原が異なるので、株細胞は胃がん幹細胞の同定には使えない。

② ヒト胃がん幹細胞の同定のために、ヌードマウス移植ヒト胃がん組織系を樹立した。我々が樹立したヒト胃がん組織系の細胞は継代数が少ない ( $p < 5$ ) ときには常に、原発胃がんと類似した特徴を持つ腫瘍を形成し、細胞表面抗原のパターンも維持されている。この系を用いて胃がん幹細胞を同定する。

## 2. 研究の目的

以上のような知見に基づいて、本研究は、ヒト胃がん幹細胞を同定し、その造腫瘍性の制御機構を明らかにすることを目的とする。予備的な実験で、NOD-SCIDマウスへ移植して胃がん幹細胞を調べたところ、FACSで分画した一部の細胞が強い造腫瘍性を保持していること、その細胞はCD44陰性であることが明らかになった。今後、造腫瘍性の高い細胞が特異的に発現する抗原を明らかにして、ヒト胃がん幹細胞を同定する。更に、この細胞の培養系を樹立して、その性質を解析する。これらの研究により、胃がん幹細胞をターゲットとする治療法の開発を進める。

## 3. 研究の方法

(1) ヌードマウス皮下移植ヒト胃がん組織系を用いて、FACSにより分画した細胞を免疫不全マウスへ移植してその造腫瘍性を調べることにより、ヒト胃がん幹細胞のマーカーを同定する。多様な胃がん組織系を樹立し、さまざまなヒト胃がん幹細胞を比較検討することにより、ヒト胃がん幹細胞に共通のマーカーを同定する。

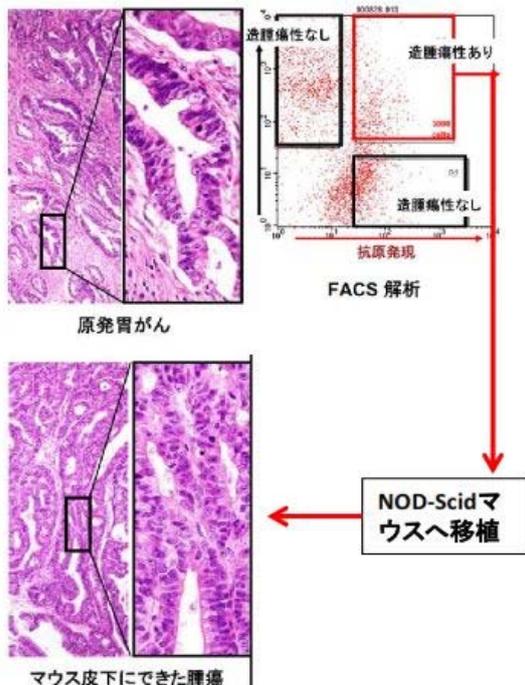
(2) ヒト原発胃がんを用いて、上記のマーカーが胃がん幹細胞で特異的に発現していることを確認する。

(3) ヒト胃癌幹細胞が、造腫瘍性を保持したまま増殖するような試験管内培養系を確立する。

(4) その培養系を用いて、胃癌幹細胞が造腫瘍性を保持する条件を明らかにし、造腫瘍性の制御機構を明らかにする。胃癌幹細胞をターゲットとする新しい治療法の開発を最終目標とする。

#### 4. 研究成果

(1) 胃癌幹細胞のマーカーを、新たに同定した。まず、ヌードマウス皮下移植胃癌組織系を用いて、胃癌幹細胞同定のためのマーカーを検索した。その結果、CD133 や CD44 はマーカーとしては不適であることが示された。そこで、これら以外のマーカーを検索し、新しいマーカーを同定した。原発胃癌組織を用いて調べた結果、このマーカーを発現する細胞は強い造腫瘍性を持つが、マーカーを発現しない細胞は造腫瘍性を持たないことが明らかになり、このマーカーが有用であることが示された。

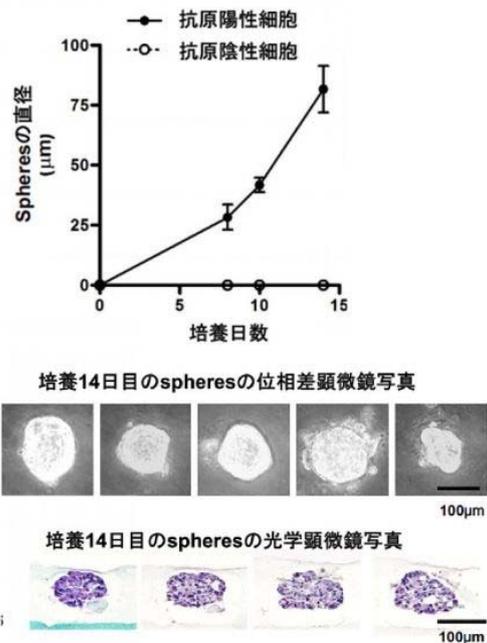


またマーカー発現細胞は常に、原発胃癌に

類似した腫瘍（高分化胃癌からの細胞は高分化型腫瘍を、低分化胃癌からの細胞は低分化型腫瘍を）を形成し、形成された腫瘍内には種々の分化した細胞が見られた。以上の結果は、このマーカーを発現する細胞の中に、胃癌幹細胞が存在することを示している。

(2) 胃癌幹細胞を試験管内で増殖させて、“sphere”を形成させることに成功した。

このマーカーを発現する細胞は、がん細胞の数%程度であり、詳細な解析のためには、この細胞を、試験管内で増殖させる必要がある。一般的に、がん幹細胞を無血清培養すると、細胞は造腫瘍性を保持したまま球状塊（sphere）を形成して増殖し、血清添加培養条件下では、造腫瘍性を失い、基質に接着して敷石状に増殖することが、大腸がんなどで報告されており、sphere 形成はがん幹細胞の特徴の一つと考えられている (Nature Rev. Cancer, 8, 755-768, 2008)。我々は、原発胃癌から得られた細胞が、無血清培養条件下で sphere を形成して増殖することを見いだした。



ヌードマウス皮下移植胃癌組織系から得

られる胃がん幹細胞の一部は、継代しても増殖性を保持し、sphere を形成した。このような sphere 形成は、マーカー発現細胞でのみ見られ、非発現細胞では見られなかった。またこれらの sphere 形成細胞は高い造腫瘍性を保持していた。以上の結果は、胃がん幹細胞は無血清培養条件下で sphere を形成して増殖することを示している。今後、この培養系を用いて、胃がん幹細胞の性質を詳細に解析する予定である。これにより、胃がん幹細胞の造腫瘍性の制御機構を明らかにして、この細胞をターゲットとする治療方法の開発を進めたいと考えている。

#### 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 5 件)

- ① Fukamachi, H., Shimada, S., Ito, K., Ito, Y., and Yuasa Y. (2011) CD133 is a marker of gland-forming cells in gastric tumors and Sox17 is involved in its regulation. *Cancer Sci.*, 102, 1313-1321. 査読有り
- ② Mimata, A., Fukamachi, H., Eishi, Y., and Yuasa, Y. (2011) Loss of E-cadherin in mouse gastric epithelial cells induces signet ring-like cells, possible precursor lesion of diffuse gastric cancer. *Cancer Sci.*, 102, 942-950. 査読有り
- ③ Ito, K., Chuang, L. S. H., Ito, T., Chang, T. L., Fukamachi, H., Salto-Tellez, M., and Ito, Y. (2011) Loss of Runx3 is a key event in inducing precancerous state of the stomach. *Gastroenterology*, 140, 1536-1546. 査読有り
- ④ Chang, T. L., Ito, K., Ko, T. K., Liu, Q., Salto-Tellez, M., Yeoh, K. G., Fukamachi, H., and Ito, Y. (2010) Claudin-1 has tumor suppressive activity and is a direct target of RUNX3 in gastric epithelial cells. *Gastroenterology*, 138, 255-265. 査読有り
- ⑤ Wada, R., Akiyama, Y., Hashimoto, Y., Fukamachi, H., and Yuasa, Y. (2010) miR-212 is down-regulated and suppresses methyl-CpG-binding protein MeCP2 in human gastric cancer. *Int. J. Cancer*, 127, 1106-1114. 査読有り

[学会発表] (計 17 件)

- ① Fukamachi, H. Identification and characterization of human gastric tumor-initiating cells. Seoul Pathology Forum (Seoul National University Hospital, Seoul, Korea, December 16, 2011).
- ② Fukamachi, H. Epigenetic changes in gastric cancer stem cells. NSFC A3 Foresight Program 2011 Workshop- Epigenetic Signatures in Gastric Carcinogenesis (Xi'an, China, October 9, 2011).
- ③ Fukamachi, H., Shimada, S., Yuasa, Y. Identification and characterization of human gastric tumor-initiating cells. 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋、(2011 年 10 月 4 日)。
- ④ Ito, Y., Ito, K., Fukamachi, H. Runx3 protects gastric epithelial cells against EMT and Lgr5-expressing tumorigenic subpopulation. 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋、(2011 年 10 月 4 日)。
- ⑤ Shimada, S., Mimata, A., Akiyama, Y., Fukamachi, H., Yuasa Y. Synergistic tumor suppressor activity of E-cadherin and p53 in a conditional mouse model for diffuse-type gastric cancer. 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋、(2011 年 10 月 3 日)。
- ⑥ Fukamachi, H., Seol, H., Shimada, S., Jang, S., Yuasa, Y. (2011) Identification of tumor-initiating cells in human gastric cancers. IGCC 2011- 9<sup>th</sup> International Gastric Cancer Congress (Coex Center, Seoul, Korea, April 22, 2011).
- ⑦ Shimada, S., Mimata, A., Mogushi, K., Akiyama, Y., Fukamachi, H., Jonkers, J., Tanaka, H., Eishi, Y., Yuasa, Y. Mouse model of diffuse-type gastric cancer by conditional inactivation of E-cadherin and p53. IGCC 2011- 9<sup>th</sup> International Gastric Cancer Congress (Coex Center, Seoul, Korea, April 21, 2011).
- ⑧ Fukamachi, H., Seol, H. S., Shimada, S., Jang, S. J., Yuasa, Y. Identification of tumor-initiating cells in human gastric cancers. 10<sup>th</sup> Japan-Korea Joint Symposium on Cancer and Ageing Research (Japanese Foundation for Cancer Research, Tokyo, Japan, Feb. 14, 2011).
- ⑨ Shimada, S., Mimata, A., Mogushi, K., Akiyama, Y., Fukamachi, H., Tanaka, H., Eishi, Y., Yuasa, Y. Synergistic tumor suppressor activity of E-cadherin and p53 in a conditional mouse model for diffuse-type gastric cancer. 10<sup>th</sup> Japan-Korea Joint Symposium on Cancer and Ageing Research (Japanese

- Foundation for Cancer Research, Tokyo, Japan, Feb. 14, 2011).
- ⑩ Fukamachi, H., Shimada, S., Seol, H. S., Jang, S. J., Yuasa, Y. Identification of tumor-initiating cells in human gastric cancers. NSFC A3 Foresight Program 2010 Seminar: Epigenetic Signatures in Gastric Carcinogenesis, Beijing, China (2010年10月18日)。
- ⑪ Shimada, S. Mimata, A., Akiyama, Y., Fukamachi, H., Eishi, Y., Yuasa, Y. Synergistic tumor suppressor activity of E-cadherin and p53 in a conditional mouse model for metastatic diffuse-type gastric cancer. NSFC A3 Foresight Program 2010 Seminar: Epigenetic Signatures in Gastric Carcinogenesis, Beijing, China (2010年10月18日)。
- ⑫ Mimata, A., Fukamachi, H., Eishi, Y., Yuasa, Y. Loss of E-cadherin in parietal cells affects gastric epithelial cell polarity, growth and differentiation, resulting in a pre-malignant condition in mice. NSFC A3 Foresight Program 2010 Seminar: Epigenetic Signatures in Gastric Carcinogenesis, Beijing, China (2010年10月18日)。
- ⑬ Shimada, S., Mimata, A., Akiyama, Y., Fukamachi, H., Yuasa Y. Invasive diffuse gastric cancers develop in E-cadherin/p53 conditional double knockout mice. 第69回日本癌学会学術総会、大阪、(2010年9月22日)。
- ⑭ Ito, K., Fukamachi, H., Ito, Y. RUNX3 (R122C) does not attenuate oncogenic Wnt in gastric epithelial cells. 第69回日本癌学会学術総会、大阪、(2010年9月22日)。
- ⑮ Mimata, A., Fukamachi, H., Yuasa, Y. Precancerous changes are induced in *E-cadherin* KO mouse stomachs. 第69回日本癌学会学術総会、大阪、(2010年9月23日)。
- ⑯ Fukamachi, H., Shimada, S., Yuasa, Y. Identification of tumor-initiating cells in human gastric cancers. 第69回日本癌学会学術総会、大阪、(2010年9月23日)。
- ⑰ Fukamachi, H., Shimada, S., Seol, H. S., Funasaka, C., Jang, S. J., Yuasa, Y. Identification of tumor-initiating cells in human gastric cancers. The 5th Asian Epigenomics Meeting & A3 Symposium 2010, Jeju, Korea (2010年6月21日)。

[図書] (計3件)

- ① 深町博史、阿形清和、浅川満彦、安部由美子、安藤元一、石原勝敏、一石昭彦、伊野良夫、井上弘一、井上裕介、今井一

- 郎、岩崎俊晴、上田 均、大串隆之、大島範子、大西純一、加藤泰建、金子康子、河内美樹、熊澤慶伯、桑野博行、小池文人、鯉淵典之、小柴共一、小林哲也、坂井貴文、佐藤利幸、白山義久、末光隆志、菅原 敬、須永伊知郎、相馬早苗、平良真規、竹内 隆、武田洋幸、多田正純、舘 鄰、舘野正樹、田中 修、田中秀逸、田中 実、土屋公幸、戸田年総、戸田任重、二階堂昌孝、野本茂樹、乗越浩司、橋口康之、畠山 晋、林 進、平野弘道、前島正義、町田武生、溝口 元、宮本武典、森田哲夫、八杉貞雄、弥益 恭、吉田 学、吉村建二郎(2010) 生物の事典 (共著)、朝倉書店。(560 ページ) 石原勝敏・末光隆志 (総編集)
- ② 深町博史 (2010) 生物学辞典 (共著)、東京化学同人。(1634 ページ)、石川統、黒岩常祥、塩見正衛、松本忠夫、守隆夫、八杉貞雄、山本正幸 (編集)
- ③ 深町博史 (2011) 細胞と細胞間情報伝達機構、発生の仕組み。ヒトの分子遺伝学 (第4版; T. Strachan and A. Read 著、村松正實、小南 凌監修)、pp103-182、メディカル・サイエンス・インターナショナル。

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/grad/monc/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

深町 博史 (FUKAMACHI HIROSHI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号 : 70134450

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :