

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 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659238

研究課題名（和文） 大腸癌微小転移における癌幹細胞の役割

研究課題名（英文） The role of cancer stem cells on micrometastasis of colorectal carcinoma

研究代表者

崎浜 秀康 (SAKIHAMA HIDEYASU)

北海道大学・北海道大学病院・特任助教

研究者番号：50533676

研究成果の概要（和文）：我々は微小転移の形成において、**癌幹細胞仮説** と **Pre-metastatic niche (PMN)** に着目し、大腸癌において「癌幹細胞から分泌される液性因子が、**PMN** を形成し転移を司る」という仮説をたてた。1. 大腸癌株を用いたマウス皮下移植モデルにおいて、CD133陽性細胞は、腫瘍形成能が認められた。2. 肝転移モデルにおいて、Pre-metastatic niche の形成が認められた。3. 大腸癌株培地投与にて、肝内 **PMN** 形成が認められた。4. CD133⁺細胞と CD133⁻細胞に分離培養した馴化培地では、CD133⁺の培地を投与した場合、**PMN** 形成が増強された。5. SDF-1 抗体を用いて、**PMN** 形成が抑制された。以上より 癌幹細胞は **PMN** 形成を促すことで、微小転移を制御している可能性が示唆された。また、SDF-1/CXCR4 axis を阻害することで、転移を軽減できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Recently, two striking concepts, (“premetastatic niche (PMN)” and “cancer stem cell hypothesis”) that have emerged in the cancer science, have prompted to revise therapeutic strategies for cancer. Our study hypothesized that soluble factors secreted from cancer stem cells promote micrometastasis by the formation of pre-metastatic niche in colorectal carcinoma. The results of our experiments are as follows: 1. CD133⁺ colon cancer cell line has tumorigenicity in the subcutaneous tumor model. 2. PMN formation was observed before micrometastasis in the murine liver metastasis model. 3. Conditioned medium of colon cancer cell line generate PMN. 4. Conditioned medium from CD133⁺ colon cancer cell line enhanced the formation of PMN. 5. Blockade of SDF-1/ CXCR4 axis attenuated PMN formation. These results indicate blockade of SDF-1/ CXCR4 axis attenuated cancer micrometastasis by preventing PMN formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	390,000	3,190,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科臨床医学・消化器外科学

キーワード：大腸癌 微小転移 癌幹細胞 Pre-metastatic niche

1. 研究開始当初の背景

(背景) 癌の死因の原因の90%以上は転移が原因であり、これをどのように制御するかが癌治療において最も重要である。我々は転移の初期段階である微小転移の形成において、近年提唱されている癌研究における重要な2つの概念である**癌幹細胞仮説**と**Pre-metastatic niche**に着目した。癌幹細胞仮説とは多様な細胞や細胞外基質よりなる不均一な組織である癌が、癌幹細胞と呼ばれる少数の細胞群により制御される分化階層的な組織であるとする仮説で、多くの癌種で腫瘍の形成、増殖および維持における中心的な役割を果たしていることが報告されている。また、大腸癌ではCD133陽性細胞およびCD44陽性細胞が癌幹細胞の特性を有することが報告されている。しかしながら、癌幹細胞が転移形成に及ぼす影響について、未だその機序は不明である。Pre-metastatic nicheとは、癌細胞の到達より前に、癌細胞により分泌される液性因子により転移標的臓器にVEGFR1陽性造血前駆細胞やCD11b+Gr-1+骨髓球系細胞といった骨髓由来の炎症性間質細胞が集積し癌微小環境が形成され、プロテアーゼ(MMP-9, MMP-2など)やケモカイン(SDF-1, CXCL1など)の産生を介して原発巣から癌細胞を能動的に誘導するという概念である。微小転移の成立すなわち癌細胞が生体防御機構をかいくぐり転移標的臓器に移動し生着することは極めて困難な過程であり、ここでは原発巣、骨髓および転移標的臓器の連鎖的な相互作用による転移促進機序の発動が必須である。Pre-metastatic nicheの形成はこの連鎖反応の開始点であり、これを誘導する液性因子の分泌はそのトリガーである。今回我々は、「**癌幹細胞により分泌される誘導因子がPre-metastatic niche形成を司る**」という仮説をたて、これを証明する。

2. 研究の目的

大腸癌のPre-metastatic niche形成における癌幹細胞の役割を明らかにすること

3. 研究の方法

(1) 癌幹細胞のソーティング

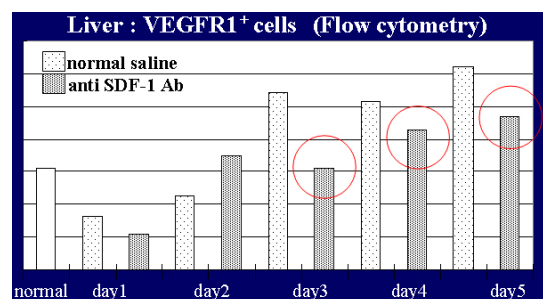
大腸癌幹細胞のマーカーとしてCD133, CD44, CD166などが報告されており、当科ではCD133

を用いた磁気細胞分離を行っている。磁気標識抗体としてはCD133 cell isolation kit(Mytenyi Biotec)を用いており、LS columnを用いたpositive selectionによるCD133陽性分画の採取とLD column(Mytenyi biotec)を用いたdepletionによる陰性分画の採取を並行させた分離系を用いて効率的なソーティングを行っている。

(2) CD133陽性細胞の幹細胞としての特性の解析

CD133陽性分画の特性は用いる細胞株種により異なるため、以下に示す癌幹細胞としての特性をCD133陽性細胞が有するかを解析する。
①**腫瘍形成能**:同数のCD133陽性および陰性細胞の皮下移植を行い、腫瘍形成率と増大速度の比較を行う。
②**腫瘍再現性**:形成された皮下腫瘍が組織学的に細胞株が分離された元の腫瘍を再現しているかを検討する。

(3) **癌細胞由来の液性因子を含む馴化培地作成**:CD133陽性および陰性細胞を分離後、含血清培地中で12時間静置する。次に無血清培地に交換し24時間の培養を行った後、この馴化培地を採取する。馴化培地はフィルター滅菌後-80℃で凍結保存する。



(4) 馴化培地投与による転移標的臓器におけるPre-metastatic nicheの誘導

マウスに作成した馴化培地を300μLずつ9日間連日腹腔内投与する。実験はCD133陽性細胞および陰性細胞由来の馴化培地と通常は無血清培地を投与する3群で行う。馴化培地投与後に肝臓および肺をサンプリングし、免疫染色によりフィブロネクチンの増生やVEGFR1陽性造血前駆細胞の集積を検討する。

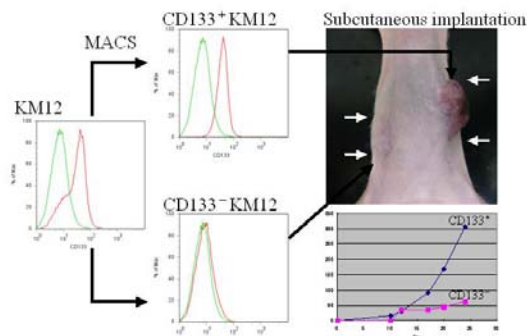
(5) Pre-metastatic nicheの転移促進効果の確認

馴化培地の前投与を行ったヌードマウスに

大腸癌細胞株の門脈注射を行い、CD133 陽性細胞由来の馴化培地投与群と陰性細胞由来群で肝転移の形成率、転移数および肝/脳重量比を比較する。癌細胞株の尾静脈注射を用いた肺転移の実験系でも同様の検討を行う。

(6) SDF-1 抗体による Pre-metastatic niche 誘導阻害による転移抑制

骨髄由来幹細胞の血管への流出流入は主に SDF-1/CXCR4 のケモカイン ケモカインレセプターにて制御されている
Pre-metastatic niche の構成細胞は骨髄由来幹細胞であることより、抗 SDF-1 抗体にて



Pre-metastatic niche 誘導阻害ができると仮説をたてている。本研究では抗 SDF-1 抗体を用いて、Pre-metastatic niche の形成状態及び転移形成の程度を確認する。

4. 研究成果

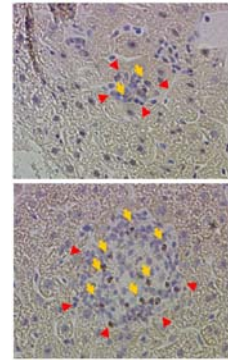
(1) 癌幹細胞のソーティング

(2) CD133 陽性細胞の幹細胞としての特性の解析

大腸癌細胞株 KM12, Colon26 を用いて磁気ビーズを用いて CD133 陽性細胞と CD133 陰性細胞に分離。その後 ノードマウスの皮下に CD133 陽性細胞と陰性細胞をそれぞれ 500 個注入。28 日目には CD133 陽性細胞のみが腫瘍形成が認められた。

(2) マウス肝転移モデルにおける Pre-metastatic niche の確認

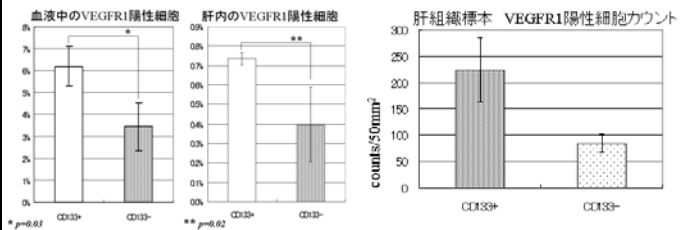
colon26 10^5 cells を脾臓被膜下に接種後 day1, 3, 5 に抗 SDF-1 抗体を投与。Control 群：VEGFR1 陽性細胞は day3 でピークとなった。抗 SDF-1 抗体投与群：増加の程度が緩やか。転移巣に一致して VEGFR1 陽性細胞が観察された。転移の無い部位では VEGFR1 陽性細胞を認めなかった。



(3) Colon26 の液性因子での Pre-metastatic niche 形成確認

無血清培地による colon26 細胞 18 時間培養上清を 5 日間連日 iv し、肝組織中の VEGFR1 陽性細胞を観察。抗 SDF-1 抗体投与群 v.s. コントロール抗体投与群 (day1,3,5) conditioned medium 投与群では VEGFR1 陽性細胞の集簇が観察され、それらは抗 SDF-1 抗体によって抑制された。

(4) 癌幹細胞が pre-metastatic niche の形成に寄与しているか？



CD133+ と CD133- それぞれの conditioned medium をマウス

に 5 日間 iv し、血中・肝組織中に出現する VEGFR1 陽性細胞

の出現頻度を検討。

CD133 陽性細胞由来の conditioned medium 投与群で、血中・肝に VEGFR1 陽性細胞が多く検出された。

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1件）

① 崎浜 秀康、Mechanism of cancer micrometastasis 北海道外科学会雑誌：56(1)2-6, 2011、査読なし

〔学会発表〕（計1件）

①大腸癌の骨髄腫瘍細胞のCD133発現、第68回日本消化器外科学会総会、平成25年7月17日-19日、シーガイアコンベンションセンター（宮崎県）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

崎浜 秀康 (SAKIHAMA HIDEYASU)
北海道大学・北海道大学病院・特任助教
研究者番号：50533676

(2) 研究分担者

尾崎 倫孝 (OZAKI MICHITAKA)
北海道大学・大学院保健科学研究所・教授
研究者番号：80256510

(3) 連携研究者

なし