

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月22日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790401

研究課題名（和文）胃癌における癌幹細胞の非対称性分裂時に生じる胃型・腸型形質発現の変化

研究課題名（英文）Analysis of gastric and intestinal phenotype of gastric cancer in asymmetrical cell division

研究代表者

大上 直秀（OUE NAOHIDE）

広島大学・医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号：60346484

研究成果の概要（和文）：本研究では胃癌を材料に癌幹細胞マーカーの同定と胃型・腸型粘液形質の変化を解析した。GeneChip 解析から癌幹細胞が存在する side-population 細胞では転写因子 KLF-5 と Ets-2、細胞表面分子インテグリン a2 が発現していることが明らかとなった。KLF-5 と Ets-2 を siRNA でノックダウンすると side-population 細胞が減少した。インテグリン a2 は基底膜に垂直方向に分裂する細胞の一部に染色された。これらの分子は癌幹細胞のマーカーになる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we analyzed cancer stem cell marker and transition of gastric or intestinal phenotype in gastric cancer. GeneChip analysis revealed that KLF-2 and Ets-2, which are transcriptional factor, were over-expressed in side-population cells. We also found that integrin a2 is over-expressed in side-population cells. Fraction of side-population cell was reduced by knockdown of KLF-5 and Ets-2. Integrin a2 was expressed in cells showing perpendicular division. These molecules are potential marker for cancer stem cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：分子病理、腫瘍、胃癌、形質発現

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景として、申請者は遺伝子発現の異常を網羅的にとらえることを目的とし、胃癌組織を材料に Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) 法で解析し、多くの癌特異的遺伝子を同定してきた。さらにこれらの分子の血清腫瘍マーカー、免疫染色のマーカーとしての有用性を報告した。分泌分子 Reg IV は腸型の粘液形質を発現している胃癌（腸型胃癌）で発現しており、ステージ I の胃癌を検出できる血清腫瘍マーカーであることを示した。また、分泌分子 olfactomedin 4 は胃型の粘液形質を有する胃

癌（胃型胃癌）で高発現していた。ELISA 法で血清濃度を測定した結果、olfactomedin 4 はステージ I の胃癌を検出できる血清腫瘍マーカーであり、Reg IV と組み合わせれば、50%以上の胃癌を検出できる高感受性マーカーであった。胃癌細胞株を材料に、CAST 法で膜蛋白質を解析した結果、デスモソームの構成分子である desmocollin 2 が胃癌で特に高発現しており、腸型形質の胃癌で発現していた。このような研究を通じ、胃癌において特徴的に高発現している分子の多くは、胃型・腸型形質に関連しており、胃癌の病態解明、診断・治療戦略を構築するためには、胃型・

腸型に分けて解析することが重要であるという結論に至った。

一方、癌の発生、進展過程において、癌幹細胞の重要性が指摘されている。癌幹細胞は ABC トランスポーターに代表される薬剤耐性遺伝子を発現していること、自己複製能を持つこと等の特徴が明らかにされている。従ってこの癌幹細胞は治療抵抗性であり、臨床的には腫瘍が消失しても、癌幹細胞が生存している限り再発してくると想定されている。消化管癌を含むさまざまな癌についての解析から、癌幹細胞のマーカーを発現している症例は予後不良であることが明らかになりつつあるが、癌の発生、進展過程における癌幹細胞の関与については全く検討されていない。胃癌は組織ヘテロジェナイティーが強い癌であり、1つの腫瘍組織中に高分化腺癌と低分化腺癌、胃型形質と腸型形質の胃癌がしばしば混在している。従って、胃癌においては癌幹細胞から娘細胞に分裂していく過程で、何らかの特徴的な異常が存在する可能性が高く、癌幹細胞から胃型・腸型形質が発現するメカニズムを明らかにすることは、胃癌の病態解明に必要不可欠である。さらに胃型・腸型胃癌の幹細胞の特徴が明らかになれば、治療戦略の構築に貢献できる。

癌組織のヘテロジェナイティーのメカニズムとして、癌幹細胞が娘細胞に分裂する際、非対称性に分裂することが考えられている。癌幹細胞由来のゲノム DNA は癌幹細胞に配分され、新成されたゲノム DNA は娘細胞へと配分される。癌幹細胞マーカーも癌幹細胞にのみ配分され、娘細胞には配分されない。このような非対称性分裂により、癌幹細胞は幹細胞として存在し続けることができ、様々な娘細胞が発生し、ヘテロジェナイティーがおこると想定されている。このような現象は造血細胞や肺癌の細胞株のみで検討されており、組織レベルでの解析、胃癌における解析の報告は、国内外を通じ見られない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、胃癌における癌幹細胞の非対称性分裂時の胃型・腸型形質発現の変化を明らかにすることを目的とした。これまでの研究では、癌幹細胞の特徴に関する解析が主体であり、癌幹細胞がどのように分裂していくのかはほとんど解析されていない。癌幹細胞のマーカーは数種類報告されているが、正常のマウス腸の幹細胞のマーカーとして、**Lgr5** が注目されている。マウス **Lgr5** 陽性細胞は小腸ではパネート細胞とパネート細胞の間の細胞に発現している。ヒト小腸のマイクロアレイ解析から、本細胞では **olfactomedin 4** が発現していることが報告されており、唯一の正常のヒト腸の幹細胞のマーカーとして注目されている。申請者は

SAGE データの解析から、胃癌に特異性の高い遺伝子として **olfactomedin 4** を同定しており、世界に先駆けて免疫染色可能なマウスモノクローナル抗体を樹立している。

3. 研究の方法

胃癌細胞株 TMK-1、MKN-45、HSC-57 を材料にセルソーターを用いて幹細胞が存在すると考えられている side-population (SP) 細胞を分離し、GeneChip で網羅的に遺伝子発現を解析する。SP 細胞と非 SP 細胞の遺伝子発現プロファイルを比較し、SP 細胞で特徴的に発現している遺伝子を同定する。同定したマーカーを用いて、胃癌細胞株から癌幹細胞を免疫染色で同定し、非対称性分裂の解析を行う。尚、これまでの検討で胃癌細胞株である TMK-1、MKN-45 は胃型の粘液形質、HSC-57 は腸型の粘液形質を発現していることを確認している。

非対称性分裂の解析方法としては、まず、培養液に BrdU を添加し、2 から 3 週間培養する。その後、BrdU の免疫染色を行い、ほぼ全ての細胞が BrdU に標識されることを確認する。確認できなかった場合は培養時間をさらにのばし、ほぼ全ての細胞が BrdU に標識されることを確認する。次に BrdU のない培養液で細胞を培養し、細胞を固定後、BrdU と胃型・腸型マーカーに対する抗体で蛍光二重免疫染色を行う。anaphase を顕微鏡下で探し、片方の細胞のみに BrdU で標識される細胞を非対称性分裂とする。BrdU で標識されている細胞を親細胞、標識されていない細胞を娘細胞とし、親細胞、娘細胞における胃型・腸型マーカーの陽性率を算出する。anaphase を顕微鏡下で探し、両方の細胞で BrdU が標識される細胞を対称性分裂とする。対称性分裂も合わせて検討し、胃型・腸型マーカーの陽性率を算出後、非対称性分裂における胃型・腸型マーカーの陽性率と比較する。癌幹細胞マーカーについても同様に解析し、非対称性分裂、対称性分裂における陽性率を比較する。

4. 研究成果

胃癌細胞株 TMK-1、MKN-45、HSC-57 を材料にセルソーターを用いて SP 細胞、非 SP 細胞に分離し、GeneChip 解析を行った。その結果、胃型形質を有する細胞株である TMK-1、MKN-45 では、SP 細胞においてヒストン蛋白質等のクロマチン関連遺伝子の発現が変化していた。腸型形質を有する細胞株である HSC-57 では、KLF-5 と Ets-2 の発現が SP 細胞で上昇していた。KLF-5 と Ets-2 はいずれも転写因子であり、幹細胞の分化に関わっている可能性が高い。これらの抗体を購入し、胃癌細胞株を材料に Western blot を施行したところ、HSC-57 以外の細胞株においても発現が認められた。HSC-57 において KLF-1 と

Ets-2 の発現を siRNA でノックダウンし、再度 SP 細胞と非 SP 細胞にセルソーターを用いて分離した結果、SP 細胞の割合が減少しており、KLF-1 と Ets-2 はいずれも SP 細胞の維持、あるいは分化を抑制するものと推定された。尚、KLF-1 と Ets-2 については胃癌組織を材料に免疫染色を試みているが、現時点で免疫染色可能な抗体はない。

非対称性分裂の解析のため、外科的に切除された組織を材料に tubulin の免疫染色を施行し、anaphase の解析を行った。本研究は胃癌組織を対象としているが、解析のしやすさからまずは食道扁平上皮癌を材料に免疫染色を施行した。anaphase 中の細胞を解析し、分裂する方向と基底膜との角度を検討した。その結果、基底膜の近傍に位置する細胞では基底膜に対し垂直に分裂する細胞と、水平方向に分裂する細胞が見られたが、表層部分では基底膜に対し水平方向に分裂する細胞が高頻度に認められた。食道扁平上皮癌では腫瘍胞巣辺縁の細胞中に癌幹細胞が存在することが想定されており、腫瘍胞巣辺縁に存在し、垂直方向に分裂する細胞は癌幹細胞が非対象性分裂したものと想定される。現在胃癌組織を対象に同様の解析を進めているが、ほぼ同様の結果を得ている。GeneChip 解析では HSC-57 の SP 細胞において KLF-1 と Ets-2 が高発現していたが、細胞表面分子であるインテグリン a2 の高発現も見出している。インテグリン a2 は基底膜に対する接着分子であり胃癌組織を材料に免疫染色を施行した結果、基底膜に対して垂直方向に分裂する細胞の一部にインテグリン a2 が染色された。このインテグリン a2 陽性細胞が癌幹細胞である可能性が高く、胃癌組織を材料にインテグリン a2 陽性細胞を分離する方法を開発中である。

胃癌細胞を材料に培養液に BrdU を添加し、非対象性分裂を解析している。研究は継続中であるが、BrdU 添加により細胞が壊死する場合が多く、適切な濃度の調節を解析中である。BrdU の蛍光免疫染色を行い観察すると、頻度は低いながらも非対称性分裂が観察されたため、胃型・腸型形質のマーカーの免疫染色を施行している。

総じて本研究では、胃型・腸型胃癌細胞において、SP 細胞で特徴的に発現している遺伝子を同定した。これらの一部は転写因子、細胞表面蛋白質であり、今後はこれらをマーカーとして胃癌細胞を分離し解析を行う。特にインテグリン a2 は基底膜に対する接着分子であり、幹細胞のマーカーになる可能性が高く、抗体を用いてインテグリン a2 陽性細胞を分離するシステムを構築中である。

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 18 件)

1. Akagi I, Okayama H, Schetter AJ, Robles AI, Kohno T, Bowman ED, Kazandjian D, Welsh JA, Que N, Saito M, Miyashita M, Uchida E, Takizawa T, Takenoshita S, Skaug V, Mollerup S, Haugen A, Yokota J, Harris CC: Combination of protein coding and non-coding gene expression as a robust prognostic classifier in stage I lung adenocarcinoma. *Cancer Res*, in press. 査読有
2. Mori R, Yoshida K, Tanahashi T, Yawata K, Kato J, Okumura N, Tsutani Y, Okada M, Que N, Yasui W: Decreased FANCI caused by 5FU contributes to the increased sensitivity to oxaliplatin in gastric cancer cells. *Gastric Cancer*, in press. 査読有
3. Sentani K, Sakamoto N, Shimamoto F, Anami K, Que N, Yasui W: Expression of olfactomedin 4 and claudin-18 in serrated neoplasia of the colorectum: a characteristic pattern is associated with sessile serrated lesion. *Histopathology*. 62:1018-27, 2013. 査読有
4. Shinmei S, Sakamoto N, Goto K, Sentani K, Anami K, Hayashi T, Teishima J, Matsubara A, Que N, Kitadai Y, Yasui W: MicroRNA-155 is a predictive marker for survival in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Int J Urol*, 20:468-77, 2013. 査読有
5. Hayashi T, Sentani K, Que N, Ohara S, Teishima J, Anami K, Sakamoto N, Matsubara A, Yasui W: The Search for Secreted Proteins in Prostate Cancer by the Escherichia coli Ampicillin Secretion Trap: Expression of NBL1 Is Highly Restricted to the Prostate and Is Related to Cancer Progression. *Pathobiology*, 80:60-9, 2013. 査読有
6. Okayama H, Saito M, Que N, Weiss JM, Stauffer J, Takenoshita S, Wiltrott RH, Hussain SP, Harris CC: NOS2 enhances KRAS-induced lung carcinogenesis, inflammation and microRNA-21 expression. *Int J Cancer*, 132:9-18, 2013. 査読有
7. Naito Y, Que N, Hinoi T, Sakamoto N, Sentani K, Ohdan H, Yanagihara K, Sasaki H, Yasui W: Reg IV Is a Direct Target of Intestinal Transcriptional Factor CDX2 in Gastric Cancer. *PLoS One*, 7:e47545, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0047545, 査読有
8. Anami K, Sentani K, Sakamoto N, Uraoka

N, Que N, Yasui W: Infantile adenomyoma subclinically excreted into the patient's diaper. *Pathol Int*, 62:532-7, 2012. 査読有

9. Sakamoto N, Que N, Sentani K, Anami K, Uraoka N, Naito Y, Oo HZ, Hinoi T, Ohdan H, Yanagihara K, Aoyagi K, Sasaki H, Yasui W: Liver-intestine cadherin induction by epidermal growth factor receptor is associated with intestinal differentiation of gastric cancer. *Cancer Sci*, 103:1744-50, 2012. 査読有

10. Sentani K, Que N, Naito Y, Sakamoto N, Anami K, Oo HZ, Uraoka N, Aoyagi K, Sasaki H, Yasui W: Upregulation of HOXA10 in gastric cancer with the intestinal mucin phenotype: Reduction during tumor progression and favorable prognosis. *Carcinogenesis*, 33:1081-8, 2012. 査読有

11. Gersemann M, Becker S, Nuding S, Antoni L, Ott G, Fritz P, Que N, Yasui W, Wehkamp J, Stange EF: Olfactomedin-4 is a glycoprotein secreted into mucus in active IBD. *J Crohns Colitis*, 6:425-34, 2012. 査読有

12. Que N, Noguchi T, Anami K, Kitano S, Sakamoto N, Sentani K, Uraoka N, Aoyagi K, Yoshida T, Sasaki H, Yasui W: Cytokeratin 7 is a predictive marker for survival and effect of adjuvant chemotherapy in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*, 19:1902-10, 2012. 査読有

13. Takami H, Sentani K, Matsuda M, Que N, Sakamoto N, Yasui W: Cytokeratin expression profiling in gastric carcinoma: clinicopathologic significance and comparison with tumor-associated molecules. *Pathobiology*, 79:154-161, 2012. 査読有

14. Wakamatsu Y, Sakamoto N, Oo HZ, Naito Y, Uraoka N, Anami K, Sentani K, Que N, Yasui W: Expression of cancer stem cell markers ALDH1, CD44 and CD133 in primary tumor and lymph node metastasis of gastric cancer. *Pathol Int*, 62:112-119, 2012. 査読有

15. Hayashi T, Sentani K, Que N, Anami K, Sakamoto N, Ohara S, Teishima J, Noguchi T, Nakayama H, Taniyama K, Matsubara A, Yasui W: Desmocollin 2 is a new immunohistochemical marker indicative of squamous differentiation in urothelial carcinoma. *Histopathology*, 59: 710-21, 2011. 査読有

16. Yasui W, Sentani K, Sakamoto N, Anami K, Naito Y, Que N: Molecular pathology of

gastric cancer: Research and practice. *Pathol Res Pract*, 207:608-12, 2011. 査読有

17. Hayashi T, Que N, Sakamoto N, Anami K, Oo HZ, Sentani K, Ohara S, Teishima J, Matsubara A, Yasui W: Identification of transmembrane protein in prostate cancer by the Escherichia coli ampicillin secretion trap: expression of CDON is involved in tumor cell growth and invasion. *Pathobiology*, 78:277-84, 2011. 査読有

18. Que N, Noguchi T, Anami K, Sentani K, Sakamoto N, Uraoka N, Wakamatsu Y, Sasaki H and Yasui W: Serum concentration and expression of Reg IV in patients with esophageal cancer: age-related elevation of serum Reg IV concentration. *Oncol Lett* 2(2): 235-239, 2011. 査読有

〔学会発表〕(計5件)

1. 大上直秀: 食道扁平上皮癌におけるサイトケラチン7の免疫染色は術後補助化学療法の効果予測マーカー、予後予測マーカーとして有用である。第23回日本消化器癌発生学会, ワークショップ4, 11月15日, 徳島, 2012

2. Que N, Sakamoto N, Naito Y, Sentani K, Harris CC and Yasui W: Alteration of microRNA expression in gastrointestinal cancer. The 22nd Hiroshima Cancer Seminar and the 4th Japanese Association for RNA interference Joint International Symposium "MicroRNAs in cancer", Hiroshima (Japan), August 30, 2012.

3. 大上直秀: SAGE法、CAST法から明らかになった胃型・腸型胃癌の生物学的・臨床的特徴。第5回消化器 Research Seminar, 特別講演, 6月19日, 広島, 2012.

4. 大上直秀: 消化器癌発生・進展と微小環境: SEC11Aの胃癌における高発現と TGF- α /EGF分泌促進作用。第22回日本消化器癌発生学会, ワークショップ1, 11月25-26日, 佐賀, 2011.

5. 大上直秀: 病理セッション「胃癌におけるHER2評価法と当研究室における経験」。第2回HER2胃癌診断セミナー, 講演, 9月8日, 広島, 2011.

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計1件）

名称：新規癌検出方法、癌検出器具、および
癌検出キット
発明者：安井弥、大上直秀
権利者：国立大学法人広島大学
種類：特許権
番号：特許第5055543号
取得年月日：平成24年8月10日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/byoril/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大上 直秀 (OUE NAOHIDE)
広島大学・医歯薬保健学研究院（医）・
准教授
研究者番号：60346484

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：