

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791447

研究課題名(和文)食道癌における癌幹細胞の同定及び機能解析

研究課題名(英文)Identification and function analysis of cancer stem cell in esophageal cancer

研究代表者

福田 和正 (Fukuda, Kazumasa)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：50348786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：食道癌においてfibrinogenは予後不良因子の1つである。Fibrinogenの受容体であるインテグリン 3 (CD61)陽性細胞は、EGF、bFGF含有無血清培地による培養において、sphere様細胞塊の形成により自己複製能が示された。CD61陽性細胞において、走化能が高い傾向が示唆された。一方、食道扁平上皮癌細胞株であるTE10およびTE11を用いて抗癌剤(5FU)への長期曝露による癌幹細胞の純化を行った。miRNA Arrayを行った結果、幹細胞活性に関係するmiRNA (miR-200ファミリーもしくはmiR-let7ファミリー)の発現変動が検出された。

研究成果の概要(英文)：Fibrinogen is one of the prognostic factors in esophageal cancer. In esophageal squamous carcinoma cell lines, integrin beta 3 (CD61/fibrinogen receptor) positive cell line (TE8) showed sphere-formation in serum-free medium containing growth factors (EGF and bFGF). This result suggested that CD61-positive cells have the property of self-renewal of cancer stem cell. Furthermore, the analysis of cell morphology functions, CD61-positive cells indicated the high chemotactic ability. On the other hand, to enrich for cancer stem cells, followed by purification of cancer stem cells by long-term exposure to anti-cancer agents (5FU) in esophageal squamous carcinoma cell lines TE10 and TE11. After six months, both cells have acquired the ability for drug resistance, and the expression variation of miRNAs (miR-200 family or miR-let-7 family) were detected.

研究分野：医歯薬学

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：癌幹細胞 食道癌

1. 研究開始当初の背景

生体幹細胞は、自己複製により未分化性を保ったまま増殖し、多分化能により多岐に渡る細胞を産み出すとされ、各組織構築における細胞源と考えられる。幹細胞の発見は造血幹細胞の発見に始まり、腫瘍細胞の中にも自己複製能、多分化能を有する癌幹細胞なるものが存在するのではないかという概念が提唱された。ヒトの生体はおよそ 60 兆個の細胞で構成されているが、元をたどればこれらの細胞はすべて、たった一つの受精卵が増殖と分化を繰り返して生まれたものである。受精卵が胚盤膜まで成長すると、将来胎盤を形成する細胞と、身体を形成する細胞へと最初の分化が起こる。成人では、造血幹細胞をはじめ神経幹細胞など、種々の組織幹細胞の存在が同定されているが、これらの幹細胞のもつ分化能力は、多様な細胞に分化可能であるものの神経系や造血系など一部の系統に限られているため、多能性(multipotency)と呼ばれている。

癌組織の中に存在する少数細胞集団が分化と自己複製を繰り返しながら癌構成細胞を供給し続けるという癌幹細胞理論を証明する報告がなされ、白血病においてはじめてその実体が示された。骨髄内における造血幹細胞の分子生物学的特徴が解明されており、そのマーカー分子で白血病細胞をみてみたところ、幹細胞マーカーを提示している細胞のみが増殖能力が高いことが示唆されている。更に、固形癌においても癌幹細胞の存在が示されており、乳癌では CD24^{LOW}CD44⁺細胞が、大腸がんでは CD133 陽性細胞が癌幹細胞としての活性が高く免疫不全マウスにおける移植実験から高い腫瘍形成能を有するこ

とが示唆されている。一方、胃癌においては、申請者らが 2009 年に胃癌細胞より癌幹細胞の分離及び同定を行い SP 細胞が癌幹細胞としての特性を有することを発表した (Fukuda et al. International Journal of Oncology 2009)。図 1 は、胃癌臨床検体由来 SP 細胞の造腫瘍能を表した結果である。また、現在、iPS 細胞技術を応用した人工誘導型癌幹細胞モデルの作製にも取り組んでいる。

2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究は食道癌における癌幹細胞の分離及び機能解析を行い、診断や治療薬への臨床応用に展開するための基盤となる研究を行う。具体的に、われわれはヒト食道癌細胞株、臨床検体及 xenograft モデルを用いて次の点についての解析を行う。(1) フローサイトメトリーを用いた細胞表面マーカーの発現パターン及び強度解析、(2) 癌幹細胞の増殖・分化様式の解析、(3) 癌の浸潤、転移に関わる EMT 能の解析、(4) NOG マウスへの移植による造腫瘍能の解析、(5) 抗癌剤、分子標的薬剤の感受性評価とそのメカニズムの解析、(6) メタボローム解析 (機能性プローブ分子の探索)、(7) 癌幹細胞同定分子の発現と背景因子との相関性解析

3. 研究の方法

細胞培養

食道扁平上皮癌細胞株 (TE1, TE4, TE5, TE6, TE8, TE9, TE10, TE11, TE14, TE15) は、80% コンフルエント毎に継代を行い維持した。培養液は、10~20% ウシ胎児血清、1% Penicillin-Streptomycin 含有 DMEM を使用した。培養は、CO₂ インキュベーター (5% CO₂, 37) にて行った。

フローサイトメトリー

食道扁平上皮癌細胞株を各 10^6 cells/ml に調整する。調整した細胞 10^6 個を PBS で wash を行う。各細胞を Blocking 溶液 (Blocking one, nacalai.Ltd.) で室温において 10 分間反応させる。反応終了後、PBS で wash を行う。洗浄後、HBSS 溶液 (2% FBS、1% Penicillin-Streptomycin 含有) $100 \mu\text{L}$ で懸濁調整する。この細胞懸濁液に抗ヒト α インテグリン抗体 (FITC 標識) をそれぞれ $20 \mu\text{L}$ 添加し、20 分間 (4) 反応させる。反応終了後、HBSS で wash を行い HBSS 溶液 $300 \mu\text{L}$ で懸濁、PI 溶液 ($300 \mu\text{g}/\text{mL}$) を $1 \mu\text{L}$ 添加する。調整後、FACS caliber で解析を行った。

ELISA 法

試料 (血清および培養上清) 及び標準液の希釈系列を作製する。ウェルに溶液 (標準液, または検体, 測定試料) を加え, 1.5 時間インキュベーションした。反応終了後, 洗浄を行う。HRP 標識二次抗体と 1 時間反応させた。抗原抗体反応後, 酵素の色原性基質の溶液を加え, 酵素反応を行った。反応停止液を加え酵素反応をとめてから, 色素の呈色を 96 ウェルマイクロプレート用の比色計で測定する。比色定量の結果は, 標準溶液の測定結果から検量線を作成し, 測定試料の吸光度から試料中の抗原量の計算を行った。

Real time PCR 法

各細胞を 5×10^5 個に調整し, RNeasy[®] Micro kit (QIAGEN, Ltd) により total RNA を抽出する。各 Total RNA 溶液を High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Life technologies, Ltd) により cDNA 合成を行う。各 cDNA サンプルを Gene Expression Assay System (Applied biosystems) を用いた Ct 定量 PCR 法により遺伝子レベルを相対的に評価した。

無血清培養法

培養液は, $10\text{ng}/\text{mL}$ bFGF, $10\text{ng}/\text{mL}$ EGF, 1%

Penicillin-Streptomycin 含有 DMEM を使用した。培養は, CO_2 インキュベーター (5% CO_2 , 37) にて行った。

細胞走化生測定法

測定前日より培地を無血清培地に交換する。 1×10^6 細胞の懸濁液を作製する。EZ-TAXIScan 専用チップをチャンバーにセットし, 調整した細胞を各ウェルへ添加した。細胞走化因子として FBS を使用した。測定開始より 6 時間測定を行った。

抗癌剤感受性測定法

各細胞を 96 well cell culture microplate に 10^4 cells/well で播種し 12 時間培養を行った。5FU 曝露開始より 48 時間後、WST 法により IR (inhibition rate) を算出し評価する。

miRNA Array

各細胞から mirVana miRNA Isolation kit により total RNA を抽出した。Megaplex RT Primers & TaqMan microRNA Reverse transcription kit により cDNA を合成し, TaqMan Universal PCR Master Mix 溶液と反応液を調整し Array Card へ添加した。解析機器には ABI ViiA7 を使用した。解析データは, Gene Expression Suite Software v 1.0.2 を使用した。

統計解析法

有意差検定には Independent-samples T test の検定を用い, 計算は統計解析ソフト SPSS 20.0 STATISTICS BASE (IBM) を使用した。有意水準は 5% に設定し, p 値は, 5% 未満を有意差ありとした。

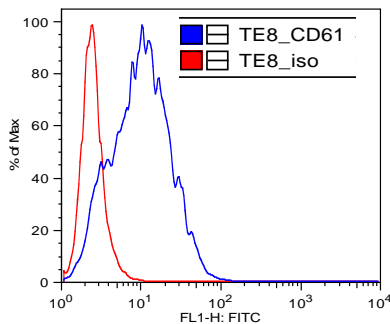
4. 研究成果

1) 血中フィブリノーゲン測定結果と予後

血中フィブリノーゲンが $350\text{mg}/\text{dL}$ 以上の症例では, 予後が不良であることが示唆された。

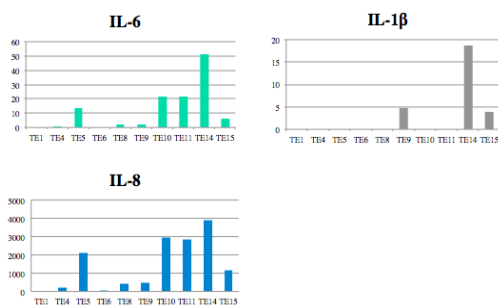
2) インテグリン $\alpha 3$ (CD61) の発現解析

食道癌細胞株を用いて CSC の分離に用いるマーカー分子の候補としてインテグリン 3 (CD61) 発現解析を行った結果, TE8 で最も顕著に発現が検出された。



3) サイトカイン測定結果

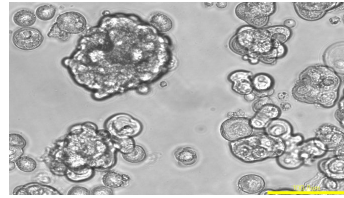
食道癌患者の血液サンプル中における炎症性サイトカインを解析した結果, IL-1, IL-6, IL-8 が高値で検出された。ELISA 法により食道癌細胞株の培養上清中のサイトカインを解析した結果, IL-1 は 1 株のみで検出された。IL-6 は, TE1 および TE6 以外の細胞株において 0.22 ~ 21.3 (pg/mL) の測定値で検出された。IL-8 については, TE1 以外の細胞株で検出され測定値は, 最大で 4.00 (ng/mL) であった。EpCAM およびインテグリン 3 の発現強度と炎症性サイトカインの産生量との相関性は認められなかったが, インテグリン 3 陽性細胞である TE8 において高い値にあることが示された。



4) 自己複製能の評価

癌幹細胞の増殖・分化様式の解析において EGF 及び bFGF を添加した無血清培地により TE8 モデル細胞を培養した結果, sphere 様の細胞塊が形成され, 癌幹細胞の有する自己

複製能が示唆された。



5) 走化生の解析

浸潤, 転移に関わる EMT 能 (Epithelial-to-Mesenchymal Transition) の解析では, 細胞走化性測定装置 (EZ-TAXIScan) を用いて細胞の遊走化能を検証した結果, TE8 における CD61 陽性細胞において, 走化能が高い傾向がしめされた。



6) 抗癌剤ストレスによる癌幹細胞の活性化と miRNA の発現解析

標的分子を指標として癌幹細胞の選別とは別に, 癌幹細胞の薬剤への抵抗性能を利用し, 抗癌剤への長期曝露による癌幹細胞の純化を行った。実験に使用した抗癌剤は, 食道癌化学療法において使用されているフルオロウラシを用いた。食道扁平上皮癌細胞株である TE10 および TE11 において曝露開始より 6 ヶ月後, 薬剤に対する IC₅₀ が 42.7 μg/mL および 21.6 μg/mL を示し, 親株に比べ有意な抵抗性を獲得した。これらの細胞を用いて miRNA Array を行った結果, 幹細胞活性に関する miRNA (miR-200 ファミリーもしくは miR-let7 ファミリー) の発現変動が検出された。

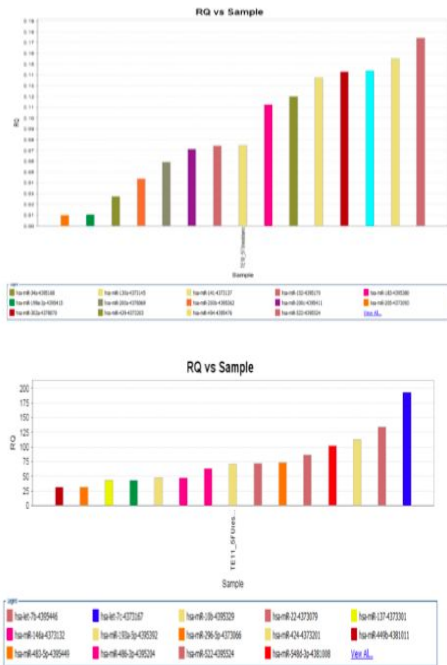
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

福田 和正 (Fukuda Kazumasa)
慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号：50348786



(上図) TE10 における miRNA 発現変動

(下図) TE11 における miRNA 発現変動

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)

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 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：