

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：24601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670177

研究課題名(和文) 癌幹細胞のゆらぎを生体内で観察する

研究課題名(英文) In vivo observation of stemness acquisition in differentiated cancer cells

研究代表者

國安 弘基 (Kuniyasu, Hiroki)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：00253055

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：がん幹細胞における幹細胞性のゆらぎを検討した。CTマウス大腸癌細胞を単細胞培養し幹細胞マーカーであるCD133/nucleostemin発現を検討すると、低増殖性がん幹細胞 - 高増殖性がん幹細胞が3.5%、高増殖性がん幹細胞 - 分化がん細胞が5.6%に見られたが、一方、分化がん細胞 - 高増殖性がん幹細胞が1.7%に、高増殖性がん幹細胞 - 低増殖性がん幹細胞が1%に見られた。KT-5マウスグリオーマ細胞を用いたin vivoの系でも幹細胞マーカーのALP活性は16%で消失し逆に1%で発現した。このように、幹細胞性の消失・分化という一方向性ではない、より上位の幹細胞ヒエラルキーへの逆分化が認められた。

研究成果の概要(英文)：Dedifferentiation or acquisition of stemness was examined in mouse cancer cells. Expression of CD133 and nucleostemin in CT26 cells showed that differentiations of dormant cancer stem (DCS) to proliferating cancer stem (PCS) and PCS to differentiated cancer cells (DCC) were found in 3.5% and 5.6%, respectively. In contrast, dedifferentiations of DCC to PCS and PCS to DCS were found in 1.7% and 1%, respectively. In in vivo observation of KT-5 cells in mouse brain showed stem-related ALP activity was disappeared in 16%, whereas appeared in 1%. These findings suggest that the dedifferentiation or acquisition of stemness might be a common phenomenon in cancer. The biological meaning and clinical importance should be examined in further studies.

研究分野：人体病理

キーワード：がん幹細胞 幹細胞分化

### 1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞は、がんの自立性の根源と考えられ、その発生・進展、転移・再発、治療抵抗性に深く関与することが広く認識されている。がん幹細胞は、分化がん細胞とヒエラルキーを形成するのみならず、がん幹細胞内にも、冬眠性がん幹細胞、増殖性がん幹細胞のヒエラルキーを有する。この、冬眠性がん幹細胞→冬眠性がん幹細胞→増殖性がん幹細胞→分化がん幹細胞という図式のほかに、冬眠性がん幹細胞→増殖性がん幹細胞→分化がん細胞という両方向性の変化の存在が疑われているが、その確証は未だ得られていない。

### 2. 研究の目的

われわれは、絶食のがん細胞に及ぼす影響を検討する中で、がん幹細胞が数時間という早い時間経過で増減を示すことを見出した。これは、がん幹細胞の「ゆらぎ」と考えられる幹細胞性の変動を捉えたものと考えられ、がん細胞における、幹細胞→分化細胞の両方向性の形質変化が示唆される興味深い現象である。この現象をより詳細に、なおかつ、より生体に近いレベルで検討するため、2光子励起蛍光顕微鏡による生体内イメージングを援用し、腫瘍内のがん幹細胞の消長をリアルタイムで連続的に観察し、幹細胞→幹細胞あるいは、幹細胞→分化細胞の動的変化を明らかにすることを目的とする。

大腸癌マウス皮下腫瘍モデルを用い、24時間絶食の癌に及ぼす影響について検討する過程で、左図のように摂食再開後6時間でCD133陽性がん幹細胞の頻度が約2倍に増大することを見出した。CD133陽性がん幹細胞は絶食中の実験群においては対照群と同等であることから、摂食再開をトリガーとしてCD133陽性がん幹細胞が増加したことが考えられる。われわれはすでに実験に用いた癌細胞株において、低増殖性がん幹細胞はCD133陽性・nucleostemin陽性、高増殖性がん幹細胞はCD133陰性・nucleostemin陽性であることを確認しており、絶食→摂食のトリガーにより低増殖性がん幹細胞が数時間の内に倍増したことが考えられる。しかもBrdU標識細胞は摂食開始後に増加しておらず、これは低増殖性がん幹細胞の増殖よりも高増殖性がん幹細胞あるいは分化がん細胞からの低増殖性がん幹細胞への逆分化を示唆するとも考えられる。本研究から得られた結果は、とくに「逆分化」の可能性など、がん幹細胞標的化治療に重要な知見をもたらすと考えられる。

### 3. 研究の方法

マウス大腸癌細胞株に、蛍光標識CD133遺伝子および蛍光標識NS遺伝子をゲノムに組換え導入し、同系のマウスに移植し腫瘍を

作成したうえで、生体への影響を最小限に留め、組織深部を含む長時間の生体内蛍光観察が可能な多光子励起顕微鏡を用い、がん幹細胞の動態を観察する。この細胞株では、CD133+/NS+低増殖性がん幹細胞、CD133-/NS+高増殖性がん幹細胞、CD133-/NS-分化がん細胞を弁別し認識することが可能でありことを確認しており、3者の相互変化をin situに経時的に観察可能である。これらの観察により、がん幹細胞のヒエラルキーの可塑性についてそのカイネティックスの数量モデル作成を含め詳細な検討をすることが可能である。

研究は大きく前段・後段に分けられ、前段ではがん細胞の幹細胞性のゆらぎについて培養系で検討を行い、後段では生体観察を行う。このため初年度には、がん幹細胞の分離培養と幹細胞変化を幹細胞マーカーの発現検討により行う。また、蛍光による幹細胞関連遺伝子発現を観察可能な細胞を準備し、幹同系のマウスに移植し皮下腫瘍を作成、多光子励起蛍光顕微鏡により生体観察を行う。また、なお、がん細胞株に蛍光標識幹細胞関連遺伝子を組換え導入したが、安定細胞株樹立に時間がかかり、有用な観察に至らなかった。

### 4. 研究成果

CT26マウス大腸癌細胞を限界希釈法により96-well dishに1細胞/well播き、24時間ごとに、細胞1個を取り出し、1細胞RT-PCR法により幹細胞マーカーであるCD133およびnucleosteminの発現を検討した。その結果、96-well dish x3の288well中、48時間後には3well (1.04%)において、CD133陰性→CD133陽性の変化が認められ、nucleosteminの発現も増加していた。また、10well (3.47%)では、CD133陽性/nucleostemin陽性→CD133陰性/nucleostemin陽性の変化が認められた。一方、16well (5.56%)ではCD133(-)/nucleostemin陽性→CD133陰性/nucleostemin陰性の変化が、5well (1.74%)では、CD133陰性/nucleostemin陰性→CD133陰性/nucleostemin陽性の変化が認められた。これらの結果から、低増殖性がん幹細胞(CD133陽性)、高増殖性がん幹細胞(nucleostemin陽性)、分化がん細胞(CD133陰性/nucleostemin陰性)の各ヒエラルキーの間に、上位から下位と言う一方向性ではなく、一定のキネティックスを有すると考えられる相互変化関係が存在することが示唆された。

蛍光による幹細胞性の観察のため、まず、コントロール細胞について検討したところ組織培養条件では十分な蛍光強度を示したが、マウス皮下腫瘍を作製し、通常の蛍光顕微鏡観察を行ったところでは、PKH26化学蛍光標識と比較しても蛍光強度に乏しく幹細胞性キネティックスの検討は困難であった。

このため、新たな系を確立するため、KT-5マウス・アストロサイトーマ細胞株を同系の

CH3/He マウス脳に移植し腫瘍を形成し、幹細胞マーカーであるアルカリ・フォスファターゼの活性を2光子顕微鏡で傾向強度から測定する系を考案した。マウスに対しアルカリ・フォスファターゼの蛍光基質をIC10で経口投与することによりがん幹細胞に生じる蛍光をまず組織培養系で確認すると、細胞のviabilityは24時間程度から低下するが、タイムラプス撮影により単独の細胞で、ALP(+) $\rightarrow$ (-)ALP(-) $\rightarrow$ (+)の変化が確認され、前者は28%/時間、後者は1%/3時間程度観察された。マウスモデルで頭蓋開窓状態で3時間まで2光子顕微鏡観察したがALP(+) $\rightarrow$ (-)ALP(-) $\rightarrow$ (+)の変化は8%/時間、0%/3時間であったため、脳スライスによる*ex vivo*観察を行い16%/時間、1%/3時間程度の変化が見られた。このことから、実際に動物モデルでの観察に実験系の工夫が必要であると分かったとともに、*in vitro*, *ex vivo*の系では幹細胞性キネティックスの解析が可能であると考えられた。

#### 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29件)

- 1) Ohmori H, Kuniyasu H (他3名, 査読有): High motility group box 1 induces cancer aggressiveness and drug resistance. *Ann Clin Pathol* 3: 1042, 2015.
- 2) Luo Y, Kuniyasu H (他6名, 査読有): Alteration of the plasma free amino acids profiles in cancer patients is associated with dysregulated metabolism in skeletal muscle. *Arch Cancer Res* 3:5, 2015.
- 3) Sasaki T, Kuniyasu H (他1名, 査読有): AKT plays a crucial role in gastric cancer. *Oncol Lett* in press, 2015.
- 4) Shimomura H, Kuniyasu H (他9名, 査読有):  $^{18}\text{F}$ -fluoro-2-deoxyglucose-positron emission tomography for the assessment of histopathological response after preoperative chemoradiotherapy in oral squamous cell carcinoma. *Int J Clin Oncol* 20:308-16, 2015
- 5) Fukasawa M, Kuniyasu H (他10名, 査読有): Monoclonal antibodies against extracellular domains of claudin-1 block hepatitis C virus infection in a mouse model. *J Virol* 89:4866-79, 2015.
- 6) Goto K, Kuniyasu K (他2名, 査読有): A protein tyrosine kinase receptor, c-RET signaling pathway contributes to the enteric neurogenesis induced by a 5-HT4 receptor agonist at an anastomosis after transection of the gut in rodents. *J Physiol Sci* in press, 2015.
- 7) Sasahira T, Kuniyasu H (他1名, 査読有): Update of molecular pathobiology in oral cancer: a review. *Int J Clin Oncol* 19:431-436, 2014
- 8) Sasaki T, Kuniyasu H (査読有): Significance of AKT in gastric cancer. *Int J Oncol* 45:2187-92, 2014.
- 9) Sasaki T, Kuniyasu H (他8名, 査読有): AKT activation and telomerase reverse transcriptase expression are concurrently associated with prognosis of gastric cancer. *Pathobiology* 81(1):36-41, 2014.
- 10) Aoki K, Kuniyasu H: (他4名, 査読有): Clinically observed taste disorder-related peripheral mechanism in an anticancer drug, S-1 administered rats. *Int J Clin Oncol* 19:549-556, 2014.
- 11) Luo Y, Kuniyasu H: (他10名, 査読有): Cancer usurps skeletal muscle as an energy repository. *Cancer Res* 74:330-340, 2014.
- 12) Sasahira T, Kuniyasu H (他6名, 査読有): Prox1 and FOXC2 act as regulators of lymphangiogenesis and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *PLoS ONE* 9(3):e92534, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0092534.
- 13) Kuwada M, Kuniyasu H (他8名, 査読有): Novel missense mutation in the FH gene in familial renal cell cancer patients lacking cutaneous leiomyomas. *BMC Res Notes* 7:203, 2014.
- 14) Zhou L, Kuniyasu H (他8名, 査読有): Role of two types of angiotensin II receptors in colorectal carcinoma progression. *Pathobiology* 81:169-175, 2014.
- 15) Shinmei S, Kuniyasu H (他8名, 査読有): Identification of PRL1 as a Novel Diagnostic and Therapeutic Target for Castration Resistant Prostate Cancer by the Escherichia Coli Ampicillin Secretion Trap (CAST) Method. *Urol Oncol* 32:769-78, 2014.
- 16) Sasaki T, Kuniyasu H (他9名, 査読有): Serum CD10 is associated with liver metastasis in colorectal cancer. *J Surg Res* 192: 390-394, 2014.
- 17) Sasahira T, Kuniyasu H (他7名, 査読有): Transport and Golgi organisation protein 1 is a novel tumour progressive factor in oral squamous

cell carcinoma. *Eur J Cancer* 50: 2142-2151, 2014.

18) Sasahira T, Kuniyasu H(他 5 名, 査読有): HuD promotes progression of oral squamous cell carcinoma. *Pathobiology* 81:206-214, 2014.

19) Li X, Kuniyasu H(他 11 名, 査読有): Development of an anti-claudin-3 and -4 bispecific monoclonal antibody for cancer diagnosis and therapy. *J Pharmacol Exp Ther* 351:206-13, 2014.

20) Sasaki T, Kuniyasu H(他 8 名, 査読有): AKT activation and telomerase reverse transcriptase expression are concurrently associated with prognosis of gastric cancer. *Pathobiology* 81:36-41, 2014

21) Kuniyasu H(査読有): Multiple roles of angiotensin in colorectal cancer. *World J Clin Oncol* 3:150-4, 2013.

22) Sasaki T, Kuniyasu H(他 1 名, 査読有): The role of epidermal growth factor receptor in cancer metastasis and microenvironment. *Biomed Res Int, Cellular Microenvironment in Human Pathologies*, 2013: 546318, 10.1155/2013/546318, 2013.

23) Sasahira T, Kuniyasu H(他 5 名, 査読有): Trks are novel oncogenes involved in the induction of neovascularization, tumor progression, and nodal metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Clin Exp Metasta* 30:165-176, 2013.

24) Luo Y, Kuniyasu H(他 7 名, 査読有): High mobility group box 1 released from necrotic cells enhances regrowth and metastasis of cancer cells that have survived chemotherapy. *Eur J Cancer* 49:741-751, 2013.

25) Sasahira T, Kuniyasu H(他 8 名, 査読有): Tropomyosin receptor kinases B and C are tumor progressive and metastatic marker in colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 44:1098-1106, 2013.

26) Goto K, Kuniyasu H(他 7 名, 査読有): In vivo imaging of enteric neurogenesis in the deep tissue of mouse small intestine. *PLoS One* 8: e54814, 2013.

27) Kurihara M, Kuniyasu H(他 6 名, 査読有): Protumoral roles of melanoma inhibitory activity 2 in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 108:1460-9, 2013.

28) Chihara Y, Kuniyasu H(他 8 名, 査読有): Diagnostic markers of urothelial cancer based on

DNA methylation analysis. *BMC Cancer* 13:275, 2013.

29) Sasaki T, Kuniyasu H(他 8 名, 査読有): Increased phosphorylation of AKT in high-risk gastric mucosa. *Anticancer Res* 33:3295-300, 2013.

〔学会発表〕(計 12 件)

1) Shimomoto T, Kuniyasu H(他 5 名): Association between advanced glycation end products (AGE) and the receptor for AGE in colon carcinogenesis of azoxymethane-injected Fischer 344 rats fed with a high-linoleic acid and high-glucose diet. Society of Toxicology's 53rd Annual Meeting and ToxExpo, Phoenix, USA, 2014.3.23-27

2) Luo Y, Kuniyasu H(他 3 名): Cancer usurps skeletal muscle as an energy repository. 104th Annual Meeting of American Association for Cancer Research, San Diego, USA, 2014.4.5-9

3) Kimura Y, Kuniyasu H(他 7 名): Development and anti-tumor activities of claudin-4-specific monoclonal antibodies. *Experimental Biology* 2014, San Diego, USA, 2014.4.26-30

4) Takaki M, Kuniyasu H: A 5-HT receptor agonist promoted generation of newborn enteric neurons from neural stem cells in the deep tissue of mouse small intestine underwent transection and anastomosis. DDW-AGA 2014, Chicago, USA, 2014.5.3-6

5) Taniguchi Y, Kuniyasu H(他 6 名): Capsulation process of Fe powder particles by indent-extrusion of a multilayered blank for hyperthermia cancer care. 9th International Conference on Micromanufacturing, Singapore, 2014.3.25-28.

6) Kuwada M, Kuniyasu H(他 2 名): Claudin-4 is a putative therapeutic target of bladder cancer. Japan-Korea Cancer Research Meeting 2014, Kashihara, 2014.5.31

7) Luo Y, Kuniyasu H(他 4 名): Effect of intermittent calorie restriction on cancer stem cells. 103rd Annual Meeting of American Association for Cancer Research, Washington DC, USA 2013.4.6-10

8) Luo Y, Kuniyasu H(他 6 名): HMGB1 released from necrotic cells enhances regrowth and metastasis of cancer cells that have survived chemotherapy. Merinoff World Congress 2013:HMGB1, New York, USA, 2013.10.9-13

9) Kodama K, Kuniyasu H(他 8 名): Fabrication process and magnetocaloric property of aluminum based beads dispersed ferromagnetic particles for magnetic hyperthermia cancer care. 4th TSME International Conference on Mechanical Engineering, Pattaya, Chonburi, 2013.10.16-18

10) Iida M, Kuniyasu H(他 7 名): Development of claudin-4-specific monoclonal antibodies and their anti-tumor activities. 24th Antibody Engineering & Therapeutics, Huntington Beach, CA, USA, 2013.12.8-12

11) Luo Y, Kuniyasu H(他 6 名): HMGB1 released from necrotic cells enhances regrowth and metastasis of cancer cells that have survived chemotherapy. The 18th Japan-Korea Cancer Research Workshop, Gifu, 2013.11.29-12.1

12) Luo Y, Kuniyasu H(他 8 名): AKT activation and telomerase reverse transcriptase expression are concurrently associated with prognosis of gastric cancer. 4th JCA-AACR Special Joint Conference - The Latest Advances in Gastric Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics - , Urayasu, 2013.12.16-18

〔図書〕(計 7 件)

1) Sasaki T, Kuniyasu H: Non-functioning neuroendocrine tumor of the pancreas- clinical implication. In: Current Research in Cancer 9, pp1-8, Research Media, Kerala, India, 2015.

2) Kuniyasu H, (他 3 名): Impact of trans fatty acids on colorectal cancer. In: Current Research in Cancer 9, pp32-39, Research Media, Kerala, India, 2015.

3) Sasahira T, Kuniyasu H: Molecular biology of oral cancer. In: Oral Cancer - Diagnosis and Therapy, pp63-81, Springer Japan, Tokyo, 2015.

4) Sasaki T, Kuniyasu H(他 1 名): Significance of AKT in gastric cancer. In: Current Research in Cancer 8, pp7-18, Research Media, Kerala, India, 2014.

5) Kuniyasu H(他 4 名): Significance and the cause of alteration of the plasma free amino acids profiles in cancer. In: Current Research in Cancer 8, pp19-27, Research Media, Kerala, India, 2014

6) Kuniyasu H(他 3 名): HMGB1 alters the immunity and metabolism of cancer-burden patients. In: Current Research in Cancer 7, pp23-34, Research Media, Kerala, India, 2013.

7) Sasaki T, Kuniyasu H(他 1 名): Significance of

EGFR and the targeting in gastroenterological cancers. In: Current Research in Cancer 7, pp35-44, Research Media, Kerala, India, 2013.

〔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:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.naramed-u.ac.jp/~molepath/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

國安弘基 (KUNIYASU HIROKI)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号: 00253055

(2) 研究分担者

北台靖彦 (KITADAI YASUHIKO)

広島大学・医歯薬学大学院・准教授

研究者番号: 10304437

千原良友 (CHIHARA YOSHITOMO)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号: 40405395

藤本圭男 (FUJIMOTO YOSHIO)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号: 90192731

(3) 連携研究者

高木 都 (TAKAKI MIYAKO)

奈良県立医科大学・医学部・特任教授

研究者番号: 00033358