

日本消化器癌発生学会 理事長直轄プロジェクト
特別推進研究「Sphere Biology」の研究発表会について

去る平成 25 年 11 月 9 日（土）に九州大学 コラボレーション I 会議室にて日本消化器癌発生学会 理事長直轄プロジェクト 特別推進研究「Sphere Biology」の研究発表会が行われました。

前原喜彦理事長ご臨席のなか、米満吉和先生（九州大学薬学部 革新的バイオ医薬創成学）にはコメンテーターとして参加いただき、6 名の委員から「Sphere Biology」に関する最新のご発表をいただきました。金沢大学の消化器・乳腺・移植再生外科、太田哲生教授にもご参加賜り、活発なディスカッションが行われました。発表の後、当日は理事長直轄プロジェクト委員への委嘱状の授与が行われました。

各委員の先生がたの発表内容を提示しておりますので、学会会員の皆様には研究の参考にして頂ければと思います。（文責：学会幹事 調 憲）

（発表内容）

1. 杉町圭史、三森功士（九州大学病院別府病院 外科）

「EMT 誘導遺伝子 Plastin 3 (PLS3) による癌幹細胞性と臨床的意義について」

【はじめに】上皮間葉移行(EMT)を来したがん細胞は「がん幹細胞性」を有し、転移巣形成において重要な役割を担う。本研究の目的は、大腸癌の転移関連遺伝子の発現異常の臨床的意義とその EMT 誘導と「がん幹細胞性」獲得における役割について明らかにすることである。【研究内容】(1) 我々は大腸癌における全ゲノムコピー数変異と発現遺伝子プロファイルとの統合的解析により EMT を誘導する遺伝子 Plastin3(PLS3)を同定した(Cancer Res, 2013)。(2) PLS3 導入 LoVo 細胞は EMT の細胞形態・遺伝子形質を示し、TGF- β を介した EMT を誘導した(Ann Surg Oncol, in press)。PLS3-LoVo は浸潤・運動能が向上していた。PLS-LoVo は SP 細胞および G0 細胞の割合が増加しており抗癌剤(5-FU)耐性能を獲得していた。(3) 大腸癌症例の腫瘍組織、末梢血において PLS3 が異常発現している群は有意に予後が悪かった。(4) マウス大腸癌肝転移モデルにおいて PLS3 過剰発現細胞は CD44 陽性率が高く、有意に肝転移形成能が亢進していた。【考察】大腸癌において PLS3 は EMT を誘導し部分的に「がん幹細胞性」を獲得させることが示された。また PLS3 は大腸癌原発巣における異常発現に加えて血中(anoikis)にも認められ、血液中の発現が予後と相関した。PLS3 の発現異常は EMT、がん幹細胞性の獲得により大腸癌の転移形成に重要な役割を果たすと考えられた。

2. 村上健太郎、松原久裕（千葉大学 先端応用外科）

「食道扁平上皮癌細胞株を用いた幹細胞分画同定の試み」

（背景）食道扁平上皮癌は悪性度が高く、消化器癌の中でも予後不良な癌腫の一つである。

近年、消化器癌において癌幹細胞の存在およびその治療抵抗性が注目されている。癌幹細胞はしばしば治療抵抗性を示すため再発の主たる誘因となると考えられ、癌幹細胞を除去することにより再発のない治癒が期待できる可能性がある。しかし、現在、食道扁平上皮癌の幹細胞に関する報告は散見されるのみである。（目的）食道扁平上皮癌幹細胞に焦点を絞った治療戦略を立案する前段階として、本研究では食道扁平上皮癌細胞株T. TnとTEシリーズを用い、癌幹細胞分画を同定、その特性を解明する。（結果）sphere formation assayを施行したところ、食道扁平上皮癌細胞株T. Tn, TE1, TE2がsphereを形成した。このsphereを分解し非接着条件で培養したところ再度sphereを形成し自己複製能が確認された。さらにMTT assayを用いてsphereを構成する細胞の抗癌剤感受性を検討したところCDDPに抵抗性を示した。以上の結果からsphere内に幹細胞特性を有する細胞が含まれると考えられ、上述の細胞株を用いて、他癌で幹細胞マーカーとされるCD24, 44, 133, EpCAMの解析を行った。sphere構成細胞における陽性細胞の比率は、全細胞における比率と比べ、ほぼ同程度か低率であった。そこで肝癌のマーカーとして報告があるCD90について同様に検討したところ、T. Tn 9. 7%, TE1 16. 4%, TE2 18. 1%とsphere構成細胞における陽性細胞の比率が上昇しており、有用である可能性が示唆された。（まとめ）食道扁平上皮癌細胞株T. Tn, TE1, TE2がsphereを形成し、本実験系に有用であると考えられた。今後、引き続き癌幹細胞マーカーを解析し、食道扁平上皮癌幹細胞分画を同定していく予定である。

3. 宮下知治、太田哲生（金沢大学 消化器・乳腺・移植再生外科）

「膵癌組織内における血管外血小板凝集と癌細胞の転移・形質転換」

消化器癌の転移は高率に認められ、予後を規定する重要な因子である。その転移を制御することは予後の改善に寄与するだけでなく **Quality of Life** の向上にもかかせない。近年、癌細胞の転移・浸潤に関連して上皮間葉転換（epithelial-mesenchymal transition:EMT）が注目されているが、EMTは抗癌剤抵抗性癌細胞となるため、EMTを制御することが新しいがん治療戦略に繋がると考えられる。TGF- β やPDGFはEMTを誘導する重要な因子であるが、これらの因子を放出する細胞が血小板であることに注目している。そこで今回膵癌切除組織を用いて血管外血小板の凝集を免疫組織学的に検討した。結果は腫瘍のEMT部で血小板の凝集が認められ、同様にSnailも高率に発現していた。これらのことから血小板は腫瘍細胞を被覆（cloak形成）し、EMT様の変化や脈管浸潤を誘導し、浸潤・転移に有利な環境を形成している可能性が示唆された。

4. 大上直秀、安井 弥（広島大学大学院医歯薬保健学研究院分子病理学研究室）

「胃癌における形質発現とその意義」

当研究室ではSAGE法・CAST法を用いて新規胃癌関連遺伝子を同定し、その役割を解析している。一方、胃癌は粘液形質の観点から胃型・腸型形質に分類され、それぞれににおいて特徴的な遺伝子・遺伝子発現異常が報告されている。本研究では胃型・腸型形質胃

癌における、SAGE 法・CAST 法から同定した胃癌関連遺伝子の意義を解析した。胃癌組織を材料に Reg IV の免疫染色を施行したところ、Reg IV は腸型形質の胃癌に発現しており、発現ベクターを用いた解析から Reg IV は DPD の発現を誘導し 5-FU 誘導性のアポトーシスを抑制することが明らかとなった。olfactomedin 4 は腸幹細胞マーカーであり胃癌組織を材料に免疫染色を行った結果、胃型形質の胃癌において発現しており、olfactomedin 4 陽性例は有意に予後良好であった。CAST 法から同定した膜貫通蛋白質 DSC2 は腸型形質の胃癌において陽性であり CDX2 により発現が誘導された。以上、SAGE 法、CAST 法は新規胃癌関連遺伝子の同定に有用であり、これらの遺伝子の解析は胃癌の病態解明、治療開発に重要と考えられた。

5. 八代正和、平川弘聖 (大阪市立大学医学研究科 腫瘍外科学)

「スキルス胃癌幹細胞と微小環境」

スキルス胃癌は、癌細胞のびまん性増殖進展と周囲微小環境における線維芽細胞増生を特徴とする。消化器癌において、線維芽細胞は単なる支持組織としての役割だけでなく癌細胞の増殖進展に関与することが示唆されている。胃癌においても線維芽細胞が癌細胞の増殖や浸潤に関与していることが明らかになってきた。我々の教室は、独自にスキルス胃癌細胞株 6 株と胃線維芽細胞株を保有しており、これらは、共同研究として分与可能な細胞株である。我々は、これらの細胞株を用いてスキルス胃癌幹細胞の特性を検討した所、以下の結果を得た。すなわち、①スキルス胃癌には癌幹細胞が存在し、腫瘍形成や腹膜転移に関与していた。②UGT1A1を高発現することでirinotecan耐性に関与し、c-Met阻害剤はこの耐性抑制薬として有効であった。③癌微小環境に存在する筋線維芽細胞はTGF β シグナルを介して癌幹細胞性を維持していた。以上のことから、我々の保有するスキルス胃癌細胞株および線維芽細胞株は、共同研究に有用な細胞株と考えられる。

6. 沖 英次¹⁾、笠木勇太¹⁾、原田 結²⁾、諸富洋介¹⁾、安藤幸滋¹⁾、日吉幸晴¹⁾、伊藤修平¹⁾、佐伯浩司¹⁾、森田 勝¹⁾、池田哲夫¹⁾、米満吉和²⁾、前原喜彦¹⁾

(九州大学大学院 消化器・総合外科¹⁾、革新的バイオ医薬創成学²⁾)

「腹膜播種形成における Sphere の役割」

腹膜播種は消化器癌の最も進行した病態の一つで、既存の治療に抵抗性を示し、予後不良である。この播種形成のメカニズムは明らかでない。肝転移など一部の転移は、造血幹細胞 (hematopoietic stem cell; HSC) ニッチェを標的に形成されるという報告がある。我々は、腹膜も造血幹細胞・前駆細胞を保持し、その未分化性を維持するために必要な CAR(CXCL12-abundant reticular)細胞が存在することを発見した。マウス大腸癌細胞株 CT26 は CXCR4 を発現し、腹膜の CAR 細胞に引き寄せられるようにして播種結節を形成する。この播種は腹腔内に細胞注入後に速やかに生じ、CXCR4 阻害剤である AMD3100 を投与すると、その形成が完全に阻害された。また、細胞の sphere 形成にて CXCR4 発現が上昇する

ことが明らかとなった。腹膜播種の形成はすなわち、細胞の sphere 形成による CXCR4 発現上昇にて促進されていることが推察された。Coll type-IV、pFN などが癌細胞の sphere 形成を促進することも明らかとなった。腹膜播種治療には、この Sphere 形成を制御することが重要なポイントとなる。

