

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20日現在

機関番号：17701
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791553
 研究課題名（和文） 幹細胞ニッチからの食道扁平上皮癌リンパ節転移機構の解明と治療
 研究課題名（英文） Investigation of the lymph node metastasis mechanism throughout niche around cancer stem cell in esophageal squamous cell carcinoma
 研究代表者
 喜多 芳昭 (KITA YOSHIAKI)
 鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・特任助教
 研究者番号：30570692

研究成果の概要（和文）：

microarray を用いて幹細胞ニッチに関わる遺伝子群を同定した。(1) 細胞周期に関係する1遺伝子に対し、発現・機能解析を行い、腫瘍深達度、リンパ管侵襲、病期、遠隔転移、予後と相関することを見出した。(2) 糖代謝に関連する遺伝子 Glut-1 が含まれており、免疫染色で発現を確認、糖代謝を利用した PET 検査の結果を用い FDG 集積と相関することを見出した。以上、食道表在癌における PET 検査の意義として論文発表を行った。

研究成果の概要（英文）：

We found some genes regarding as niche of cancer stem cell by using oligomicroarray with laser micro dissection method. (1) One of above genes, which concerns cell cycle, was evaluated the expression and function and associated with invasion of tumor, lymphatic invasion, clinical stage, distant metastasis, and prognosis. (2) We extract Glut-1 which is regarding glucose metabolism, and evaluated the expression of the cell membrane of tumor cell. After we consider the result of PET-CT which is the diagnostic modality using glucose uptake into the tumor cell, we investigated that Glut-1 expression has correlate with FDG accumulation. Finally, we submitted this result to Annals of Surgical Oncology and they accepted as follows.

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：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：微小環境、癌幹細胞、マイクロアレイ、細胞実験

1. 研究開始当初の背景

(1) 食道扁平上皮癌は近年手術と化学放射線療法との組み合わせによる集学的治療が確立されつつあるが、いまだ予後不良の消化

器癌である。中でも最も予後に影響を及ぼす因子は、リンパ節転移でこの転移機構を解明することの意義は極めて大きいと考えられる。

(2) 近年、癌細胞だけでなく、宿主側細胞も転移再発に重要な役割を担うとされ、癌転移形成には、転移先において癌細胞が集積しやすい微小環境（ニッチ）を作ることが明らかとなっている。また造血幹細胞の維持と分化・増殖にニッチが重要であることが明らかになっており、癌の転移と相関のある分子はこの幹細胞のニッチに関連する分子と非常に密接な関係があり、癌細胞が幹細胞ニッチを巧妙に利用していると考えられている。さらに、最近腫瘍内に組織幹細胞の性質（強い自己複製能、多分化能、腫瘍形成能）を要する少数の癌細胞、いわゆる癌幹細胞の存在が明らかにされはじめ、その自己複製能、腫瘍形成能はニッチ依存性と考えられている。

2. 研究の目的

食道扁平上皮癌において、「癌細胞」と「癌細胞周囲微小環境（ニッチ）」の両視点から、最も予後に影響を及ぼす因子であるリンパ節転移の機構を解明し、新規リンパ節転移予測バイオマーカーを発見、癌細胞周囲微小環境（ニッチ）を変化・抑制させることでリンパ節転移が抑制されるという仮説を証明し、リンパ節転移・再発抑制薬の創薬、個々の患者に最もふさわしい治療（テーラーメイド治療）の確立をめざす。

3. 研究の方法

(1) Laser micro dissection (LMD)法と Microarray を用いて、根治切除手術施行後、切除標本・郭清リンパ節の病理組織学的検索が行われている食道扁平上皮癌の症例の凍結保存された転移リンパ節を対象としリンパ節転移腫瘍細胞周囲の間質（ニッチ）で高発現する遺伝子群を抽出する。また、バイオインフォマティクスツールである Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いて、分子の生物学的機能、抽出した遺伝子間のネットワーク、その後リンパ節転移癌細胞とニッチ間の Signaling Pathway も同定する。

(2) 抽出した遺伝子群と同定した Signaling Pathway をもとに、特に幹細胞ニッチに関わる分子を抽出、実際の切除標本、特に転移リンパ節を用いて RT-PCR、免疫染色で確認、リンパ節転移との相関を検討する。強い相関が認められた分子をリンパ節転移予測バイオマーカーとして有用かどうか検討を進める。

(3) マウスに食道癌細胞株を移植しリンパ節転移モデルを作成、有力なリンパ節転移ニッチ関連分子 2-3 個の中和抗体（ニッチ抑制中和抗体）や阻害剤を用いてリンパ節転移が抑制できるかどうかを検証する。

4. 研究成果

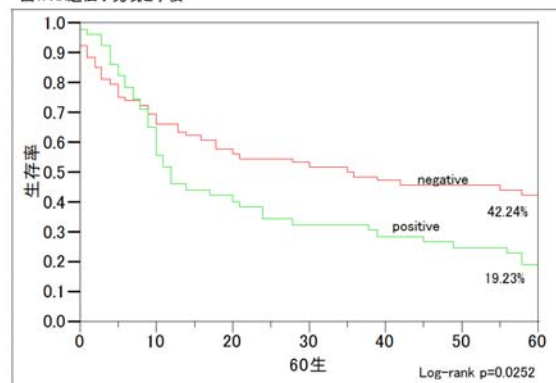
(1) LMD 法と oligomicroarray を用いて、幹細胞ニッチに関わる遺伝子を抽出した。これらの抽出同定した遺伝子群の中には、上皮-間質転換 (EMT) と関連する遺伝子が含まれていた。近年、癌幹細胞(CSC)遺伝子発現解析を行うと、EMT を誘発した際に観察される遺伝子発現形式に酷似しており、さらに上皮系癌細胞において EMT を人為的に誘導すると癌幹細胞様の形質を獲得することが判明し、CSC と EMT は密接な関係があるという結果が報告されている。本研究で抽出同定した遺伝子群の中にも、EMT と関連する遺伝子が含まれており、食道扁平上皮癌においても、CSC と EMT の強い相関関係が示唆された。

(2) 抽出した遺伝子群の中から、細胞周期に関係する XX 遺伝子を同定した。Quantitative PCR 法、tissue microarray を用いた免疫染色方法を用いて手術切除組織の臨床検体による発現解析を行った。結果、Quantitative PCR 法を用いた遺伝子発現解析においては明らかな相関を見出すことはできなかったが、免疫染色により評価において腫瘍細胞核における XX 蛋白の発現が、腫瘍深達度、リン

表1 XXの発現と臨床病理学的因子の相関

Factors	Total	XX expression in nuclei				p
		Negative(n=69)		Positive(n=22)		
		No.	%	No.	%	
gender						
male	109	61	56.0	48	44.0	0.472
female	12	8	66.7	4	33.3	
Tumor Location						
Upper	18	10	55.6	8	44.4	0.957
Middle	57	32	56.1	25	43.9	
Lower	46	27	58.7	19	41.3	
Histology						
Well	51	26	51.0	25	49.0	0.345
Middle	53	31	58.5	22	41.5	
poor	17	12	70.6	5	29.4	
pT						
T1,2	48	33	68.8	15	31.2	0.033
T3,4	73	36	49.3	37	50.7	
pN						
N0	52	33	63.5	19	36.5	0.213
N1	69	36	52.2	33	47.8	
pM						
M0	87	56	64.4	31	35.6	0.009
M1	34	13	38.2	21	61.8	
p-stage						
I,II	58	39	67.2	19	32.8	0.028
III,IV	63	30	47.6	33	52.4	
Lymphatic involvement						
negative	43	31	68.9	14	31.1	0.041
positive	76	38	50	38	50	
Vascular involvement						
negative	92	53	57.6	39	42.4	0.817
positive	29	16	55.2	13	44.8	

図1. XX遺伝子発現と予後



パ管侵襲, 病期, 遠隔転移と相関することを見出し, さらに高発現群が低発現群と比較して予後不良であることを見出した(表1, 図1). さらに, 食道癌細胞株における XX 遺伝子の発現を確認し, 最も発現の高かった細胞株である KYSE140 に対して, siRNA を用いて XX 遺伝子発現抑制を行い遺伝子の機評価を行った. 具体的には MTT assay, invasion assay によって増殖能, 浸潤能の変化を評価し, 若干の増殖能の亢進を認めた.

(3) 抽出した遺伝子群には, 糖代謝に関連する遺伝子 Glut-1 が含まれており, 食道扁平上皮癌切除標本を用いて, Quantitative PCR 法, 免疫染色方法, western blotting で発現を再確認した. 近年, dormant な癌幹細胞が, 抗癌剤や放射線に対して非常に高い抵抗性を有し, 過酸化ストレスによる DNA ダメージを回避する能力が高いことが報告されている. さらに癌幹細胞の代謝経路としては嫌気性糖代謝が亢進していることが報告されている. そこで, 最近普及が目覚ましい, 癌細胞における糖代謝利用した PET 検査の結果を用いることによって, 臨床的方面から解析を行った. 結果, 食道扁平上皮癌, なかでも腫瘍深達度の浅い表在癌において, 癌細胞の細

表2. FDG uptakeと臨床病理学的因子

Factor	Total (n)	Negative (n = 45)	Positive (n = 35)	p
Gender				0.0700
Male	72	43 (59.7 %)	29 (40.3 %)	
Female	8	2 (25.0 %)	6 (75.0 %)	
Tumor location				0.9120
Upper	9	4 (44.4 %)	5 (55.6 %)	
Middle	38	18 (47.4 %)	20 (52.6 %)	
Lower	33	17 (51.5 %)	16 (48.5 %)	
Histology				0.0020
Well	25	21 (84.1 %)	4 (16.0 %)	
Moderate	47	21 (44.7 %)	26 (55.3 %)	
Poor	5	3 (37.5 %)	2 (40.0 %)	
Depth of tumor invasion				<0.0001
M1	10	10 (100.0 %)	0 (0.0 %)	
M2	11	9 (81.8 %)	2 (18.2 %)	
M3	8	7 (87.5 %)	1 (12.5 %)	
SM1	11	9 (81.8 %)	2 (18.2 %)	
SM2	8	4 (50.0 %)	4 (50.0 %)	
SM3	32	6 (18.8 %)	26 (81.2 %)	
Lymph node metastasis				0.0006
N0	64	42 (65.6 %)	22 (34.4 %)	
N1	16	3 (18.8 %)	13 (81.2 %)	
Lymphatic invasion				0.0020
Negative	16	40 (65.6 %)	21 (34.4 %)	
Positive	19	5 (26.3 %)	14 (73.7 %)	
Vascular invasion				0.0002
Negative	56	39 (69.6 %)	17 (30.6 %)	
Positive	24	6 (25.0 %)	18 (75.0 %)	
Glut-1 expression in cell membrane				0.0002
Negative	56	39 (69.6 %)	17 (30.6 %)	
Positive	24	6 (25.0 %)	18 (75.0 %)	

FDG ¹⁸F-fluorodeoxyglucose, Glut-1 glucose transporter 1

表3. 予後解析

Factor	n	5-y survival rate (%)	Univariate (p)	Multivariate HR (95 % CI)	p
FDG uptake					0.329
Negative	45	87.3	0.041	1.50 (0.68-3.32)	
Positive	55	48.3			
Histology					0.002
Well/moderate	72	76.2	0.0001	3.48 (1.57-7.70)	
Poor	8	0			
Depth of tumor invasion					0.06
M1-SM1	40	90.2	0.039	0.97 (0.32-3.13)	
SM2-SM3	40	51.4			
Lymph node metastasis					0.218
Negative	64	76.9	0.046	1.37 (0.77-3.41)	
Positive	16	37.0			
Lymphatic invasion					
Negative	61	73.1	0.379		
Positive	19	50.6			
Vascular invasion					
Negative	56	74.4	0.14		
Positive	24	54.2			
Glut-1 expression in cell membrane					
Negative	56	59.9	0.678		
Positive	24	74.6			

HR hazard ratio, CI confidence interval, FDG ¹⁸F-fluorodeoxyglucose, Glut-1 glucose transporter 1

胞膜における Glut-1 の発現が, FDG の集積と

相関することを見出した. しかし予後因子として抽出することはできなかった (表2, 3).

以上, 食道表在癌における PET 検査の意義として論文発表を行った.

(4) アメリカペンシルベニア州ペンシルベニア大学との共同研究において, 幹細胞の self-renewal に強く関連する Sox2 が上皮前駆細胞の存在する Stat3 と協調して食道扁平上皮癌発癌に関与することを論文発表した.

現在, その他の同定したリンパ節転移および幹細胞ニッチに関連する遺伝子と幹細胞の self-renewal や癌化に関係する遺伝子を含めて検討を継続している. 今回の研究において, 遺伝子の発現と蛋白の発現が必ずしも一致せず, 機能解析まで進まないことがあった. 今後は, それらの原因となるセントラルドグマ以外の non-coding RNA や micro RNA の機能も視野に入れつつ研究を推進していきたいと考えている.

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4件)

(1) Liu K, Jiang M, Lu Y, Chen H, Sun J, Wu S, Ku WY, Nakagawa H, Kita Y, Natsugoe S, Peters JH, Rustgi A, Onaitis MW, Kiernan A, Chen X, Que J. Sox2 cooperates with inflammation-mediated stat3 activation in the malignant transformation of foregut Basal progenitor cells. Cell Stem Cell. 査読有, 12(3):304-15. 2013

(2) Kita Y, Okumura H, Uchikado Y, Sasaki K, Omoto I, Matsumoto M, Setoyama T, Tanoue K, Mori S, Owaki T, Ishigami S, Ueno S, Kajiya Y, Natsugoe S : Clinical significance of 18F-fluorodeoxyglucose position emission tomography in superficial esophageal squamous cell carcinoma. Ann Surg Oncol. 査読有, 20(5):1646-52. 2013.
DOI : 10.1245/s10434-012-2796-2

(3) 喜多芳昭, 松本正隆, 内門泰斗, 奥村浩, 大脇哲洋, 夏越祥次 : 1 期的縫合閉鎖が有効であった食道穿孔の 2 例. 臨床外科, 査読有, 67(5) : 715-719, 2012 . 医学書院 , <http://www.bitway.ne.jp/ejournal/so-net/1407104089.html>

(4) 喜多芳昭, 宮菌太志, 萩原貴彦, 才原哲史, 夏越祥次 : 緩やかな経過をとり術前診断が困難であった絞扼性イレウスの 1 例. 外科,

査読有, 73(1) : 101-104, 2011 南江堂,
<http://ci.nii.ac.jp/naid/40017648714>

〔学会発表〕(計11件)

(1)喜多芳昭, 奥村浩, 内門泰斗, 佐々木健, 田上聖徳, 松本正隆, 平木嘉幸, 大脇哲洋, 石神純也, 夏越祥次: 切除不能局所進行食道癌に対する治療方針と予後の検討. 第66回日本食道(ポスター), 所沢市, 6月22日, 2012

(2)喜多芳昭, 上之園芳一, 有上貴明, 有馬豪男, 萩原貴彦, 原口尚士, 盛真一郎, 北菌正樹, 石神純也, 上野真一, 夏越祥次: 大腸癌 Sentinel Node 理論の臨床応用の可能性. 第112回日本外科学会定期学術総会(サージカルフォーラム), 幕張, 4月12日, 2012

(3)喜多芳昭, 山崎洋一, 北菌正樹, 内門泰斗, 有上貴明, 松本正隆, 奥村浩, 大脇哲洋, 石神純也, 上野真一, 夏越祥次: 腹腔鏡補助下に切除した横行結腸脂肪腫の1例. 第24回日本内視鏡外科学会総会(一般演題), 大阪, 12月9日, 2011.

(4)喜多芳昭, 盛真一郎, 内門泰斗, 有上貴明, 北菌正樹, 石神純也, 上野真一, 夏越祥次. 下部直腸癌に対して術前化学放射線療法を併用し肛門温存手術を行った2例. 第36回大腸肛門病学会九州地方会(一般演題), 福岡市, 11月5日, 2011

(5)喜多芳昭, 松本正隆, 内門泰斗, 奥村浩, 尾本至, 田上聖徳, 瀬戸山徹郎, 大脇哲洋, 石神純也, 上野真一, 夏越祥次: 食道表在癌におけるFDG-PETの有用性. 第9回消化器外科学会大会(JDDW)(ポスター), 福岡市, 10月23日, 2011.

(6)喜多芳昭, 松本正隆, 内門泰斗, 瀬戸山徹郎, 田上聖徳, 大脇哲洋, 奥村浩, 石神純也, 新地洋之, 上野真一, 三森功士, 森正樹, 夏越祥次: Clinical significance of LAMB3 and COL7A1 mRNA in esophageal squamous cell carcinoma. 第70回日本癌学会総会(ポスター), 名古屋市, 10月3日, 2011.

(7)Yoshiaki Kita, Masataka Matsumoto, Hiroshi Okumura, Yasuto Uchikado, Tetsuro Setoyama, Sumiya Ishigami, Tetsuhiro Owaki, Koshi Mimori, Takeo Fukagawa, Masaki Mori, Shoji Natsugoe: Expression of uPAR mRNA in peripheral blood is a favourite marker for metastasis in gastric cancer cases. 8th International Symposium on Minimal Residual Cancer (Oral

presentation), Osaka, 21 September 2011.

(8)喜多芳昭, 貴島孝, 内門泰斗, 北菌正樹, 石神純也, 上野真一, 夏越祥次. 腹腔鏡下に腹壁癒痕ヘルニア根治術を行った2例(一般演題). 第21回九州内視鏡下外科手術研究会, 福岡市, 9月3日, 2011

(9)喜多芳昭, 松本正隆, 内門泰斗, 奥村浩, 尾本至, 田上聖徳, 瀬戸山徹郎, 大脇哲洋, 石神純也, 加治屋より子, 夏越祥次: 食道表在癌におけるFDG-PETの意義. 第66回消化器外科学会総会(企画関連口演), 名古屋市, 7月13日, 2011

(10)喜多芳昭, 松本正隆, 内門泰斗, 奥村浩, 瀬戸山徹郎, 大脇哲洋, 石神純也, 三森功士, 森正樹, 夏越祥次: 食道扁平上皮癌におけるLAMB3とCOL7A1の発現. 第65回食道学会総会(紙面発表)

(11)喜多芳昭, 大脇哲洋, 松本正隆, 内門泰斗, 尾本至, 恵浩一, 奥村浩, 瀬戸山徹郎, 石神純也, 新地洋之, 上野真一, 夏越祥次: 食道疾患における食道洗浄液培養の検討. 第111回日本外科学会定期学術総会(紙面発表)

〔図書〕(計2件)

(1)喜多芳昭, 夏越祥次: 癌転移の分子機構. 消化器外科学レビュー2012-最新主要文献と解説-. 癌転移の分子機構 197-202, 総合医学社.

(2)喜多芳昭, 夏越祥次: 癌の遺伝子診断・治療. 消化器外科学レビュー2011-最新主要文献と解説-. 195-200, 総合医学社.

6. 研究組織

(1)研究代表者

喜多芳昭 (KITA YOSHIAKI)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・
特任助教

研究者番号: 30570692