

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2013

課題番号：21390377

研究課題名(和文) 2光子励起顕微鏡を用いた大腸癌化及び癌、周囲間質応答の新規確証提示

研究課題名(英文) In vivo characterization of carcinogenesis and cancer-host interaction in colorectal cancer using two photon laser scanning microscopy

研究代表者

楠 正人 (Kusunoki, Masato)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50192026

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,600,000円、(間接経費) 2,880,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌幹細胞が発癌過程または浸潤及び転移過程で周囲間質と相互作用をしながら進展していく様子を二光子励起顕微鏡で生体内可視化することを試みた。大腸癌肝転移モデルの早期では、癌細胞と肝類洞内皮細胞との接着及び停止、癌細胞に胞血小板が付着する tumor cell induced platelet aggregation、癌細胞と白血球との相互作用が観察できた。後期では癌細胞塊と周囲間質及び腫瘍血管が観察できた。RFP-HT29の5-FU抵抗性クローンは癌細胞の紡錘形変化と瀰漫性増殖への変化と周囲の著明な間質反応が確認できた。

研究成果の概要(英文)：We attempted to visualize in vivo dynamic interactions between cancer stem cells (CSCs) and their surrounding stromal cells during the process of carcinogenesis, tumor invasion and metastasis in colorectal cancer using two photon laser scanning microscopy (TPLSM). We hypothesized that residual cancer cells after chemoradiotherapy (CRT) may contain putative CSCs which show not only CRT-resistant property, but also epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenotype. On liver metastasis model, dynamic tumor-host interactions including tumor-endothelial, tumor-platelet, and tumor-leukocyte interactions were observed in vivo real-time by TPLSM. Treatment resistant clones (made by repeated exposure of anti-cancer drug or irradiation) were inoculated into mice, and visualized their characteristics in vivo real-time using TPLSM. The small fraction of treatment resistant clones showed spindle shaped morphology. Their growth pattern was changed from localized growth to diffusely invasive growth.

研究分野：消化器外科

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：二光子レーザー顕微鏡 癌幹細胞 癌-間質反応

1. 研究開始当初の背景

二光子レーザー顕微鏡(Two-Photon Laser Scanning Microscopy; TPLSM)は物質励起に二光子過程を利用した顕微鏡である。長波長の励起光を用いるため、退色・光毒性が低く、生きたままの組織や細胞の観察や、組織表面から数百マイクロメートルといった深部観察も可能である。また、蛍光波長の異なる二つの蛍光色素(Green Fluorescent Protein; GFP と Red Fluorescent Protein; RFP など)を1波長で同時励起する多重同時染色も可能である。我々は独自の腹腔内臓器固定法を確立し、マウスモデルにおける消化管や肝臓のTPLSMを用いた生体内リアルタイムイメージングに成功した。

癌幹細胞は、抗癌剤抵抗性、放射線抵抗性、再発、転移との関連が示唆される細胞集団である。それらは、それらを取り巻く微小環境、いわゆるがん幹細胞ニッチとともに存在し、細胞増殖の静止期に止まり、治療抵抗性を示していると考えられている。

我々は抗癌剤治療または放射線治療に抵抗し遺残した癌細胞の中に癌幹細胞が多く含まれているとの仮説を立てた。大腸癌治療において直腸癌では切除率の向上を目的とした原発巣に対する術前化学放射線治療が行われるが、その切除標本の病理組織学的解析では、治療に抵抗し遺残した癌細胞と周囲間質反応が観察できる。また、転移性大腸癌に対する抗がん剤多剤併用療法後に転移巣切除された患者の切除標本でも、抗癌剤抵抗性遺残癌細胞と周囲間質反応が観察できる。

このような遺残癌細胞と周囲間質反応を *in vitro* 及び *in vivo* で解析することで、癌治療の新たな治療ターゲットである癌幹細胞とニッチの病態解明を目指そうと考えた。さらに、TPLSM を用いた生体内リアルタイムイメージング法により癌細胞と間質細胞との相互作用をありのままの状態を観察し、大腸癌幹細胞が発癌過程または浸潤及び転移過程で周囲間質と相互作用をしながら進展していくメカニズムを解明する。

2. 研究の目的

大腸癌幹細胞が発癌過程または浸潤及び転移過程で周囲間質と相互作用をしながら進展していく様子を二光励起顕微鏡で生体内可視化すること試みた。

3. 研究の方法

大腸癌幹細胞が発癌過程または浸潤及び転移過程で周囲間質と相互作用をしながら進展していく様子を二光励起顕微鏡で生体内可視化すること試みた。

3. 研究の方法

<ヒト臨床検体を用いた検討>

化学放射線療法を施行した直腸癌切除標本のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを用い遺残癌細胞及び周囲間質細胞から RNA

を抽出し癌幹細胞マーカー、上皮間葉移行関連マーカー及び癌増殖、進展関連マーカーの mRNA 発現を real-time RT-PCR を用いて検討する。

<ヒト大腸癌細胞株を用いた検討>

ヒト大腸癌細胞株を用い、放射線照射後遺残癌細胞における癌幹細胞マーカー及び上皮間葉移行の評価を行う。

<二光子励起顕微鏡を用いたヒト大腸癌移植モデルの生体内イメージング>

Red fluorescent protein (RFP) 標識ヒト大腸癌細胞株(RFP-HT29) を green fluorescent protein (GFP) 発現ヌードマウスに移植し、二光子励起顕微鏡で生体内リアルタイムイメージングする方法を確立した。

ヒト大腸癌細胞株を GFP ニードマウス(immunodeficient)に移植した異種移植モデルのみならず、RFP 標識マウス大腸癌細胞株(RFP-SL4) を GFP マウス(immunocompetent)に移植した同種移植モデルにおいても同様に癌-宿主反応の解析を行い、宿主応答に差があるかどうかを調べた。

<治療抵抗性大腸癌細胞株の作成>

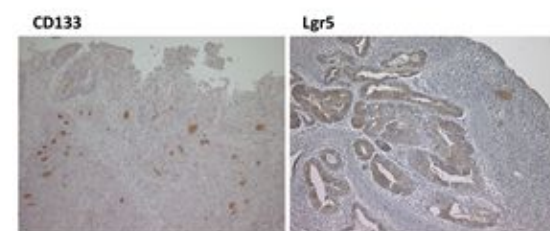
大腸癌に用いる抗癌剤の key drug のひとつである 5-FU をまたは放射線の長期、頻回暴露により RFP-HT29 の治療抵抗性クローンを作成し(*in vitro*)、GFP ニードマウスに移植した。

4. 研究成果

直腸癌化学放射線療法後遺残癌細胞と癌幹細胞との関連

遺残癌細胞の CD133 (大腸癌幹細胞マーカーのひとつ) や Lgr5 (幹細胞マーカー) などの発現は再発や予後不良と関連していた (Figure 1)。

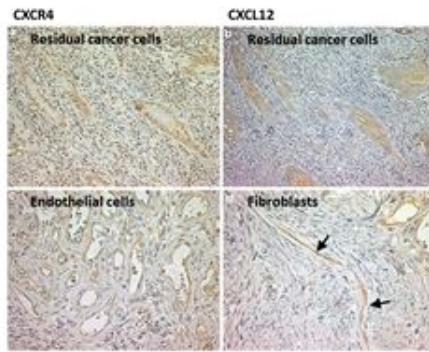
Figure 1. 遺残癌細胞のCD133とLgr5発現



直腸癌化学放射線療法後遺残癌周囲間質細胞と癌進展との関連

遺残癌細胞周囲間質細胞の CXCR4 や CXCL12 (癌増殖、浸潤、転移関連マーカー) や FAP- α や SDF-1 (cancer-associated fibroblasts 関連マーカー) などの発現も再発や予後不良と関連していた (Figure 2)。

Figure 2. 遺残癌細胞及び周囲間質細胞のCXCR4とCXCL12発現



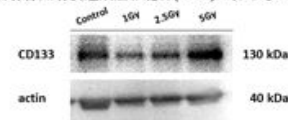
放射線照射後遺残癌細胞と癌幹細胞との関連

大腸癌細胞株 HT29 に放射線を照射後遺残し生存している細胞の CD133 は照射量依存的な発現増強を認めた (Figure 3-a)。放射線照射後遺残癌細胞は癌幹細胞が多く存在している可能性が示唆された。

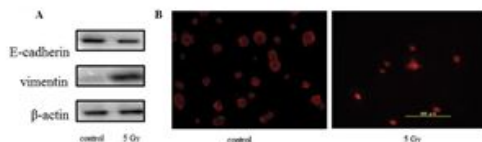
放射線照射後遺残癌細胞と上皮間葉移行との関連

放射線照射により大腸癌細胞株 CaR1 は線維芽細胞様に形態変化し、E-cadherin 発現低下と Vimentin 発現上昇を認め (Figure 3-b)、放射線により上皮間葉移行が誘導されたことが証明された。

Figure 3. (a) 放射線照射後遺残癌細胞株 (HT29) における CD133 発現



(b) 放射線照射後遺残癌細胞株 (CaR1) における EMT 関連蛋白発現



二光子励起顕微鏡を用いた癌-宿主反応の生体内イメージング

異種移植モデル (ヒト大腸癌細胞株)

異種移植モデルにおいて、脾臓への癌細胞移植後、肝類洞内の癌細胞は類洞内皮細胞に接着し、停止した (tumor-endothelial interaction)。さらに、癌細胞に血小板が付着する tumor cell induced platelet aggregation (TCIPA) が観察された (tumor-platelet interaction; Figure 4-a, c)。類洞内 Kupper 細胞と癌細胞との反応も観察された (tumor-leukocyte interaction; Figure 4-b)。転移巣形成 (Figure 4-d) に伴い拡張、蛇行した腫瘍血管も形成された。腫瘍血管内では、凝集した血小板と血管内皮細胞との反応も観察された (Figure 5)。

Figure 4.

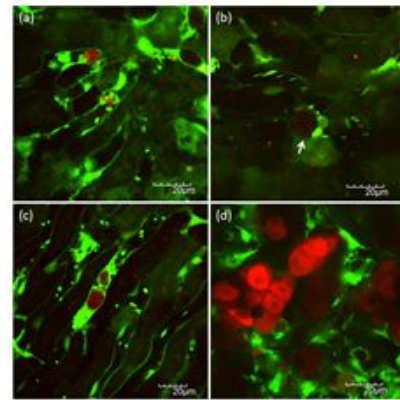
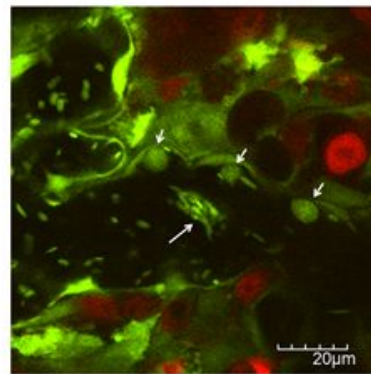


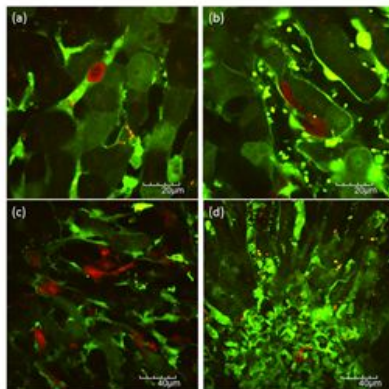
Figure 5. 腫瘍血管内の白血球-内皮細胞反応と凝集血小板



同種移植モデル (マウス大腸癌細胞株)

同種移植モデルも同様の癌-宿主反応が観察できたが (Figure 6)、形態学的には異種移植モデルとの差は明らかに出来なかった。RFP-HT29 では限局性増殖であり、RFP-SL4 では瀰漫性増殖である。これら増殖様式が癌細胞自体の増殖、浸潤能による差なのか、異種または同種移植モデルによる差なのかは明らかに出来なかった。

Figure 6.



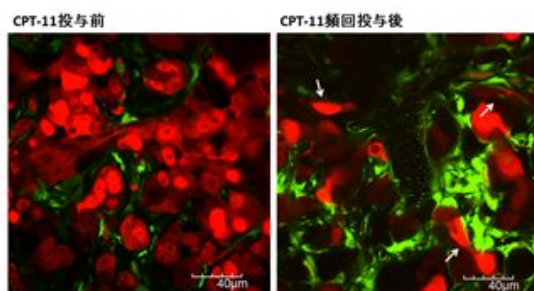
治療抵抗性大腸癌細胞と宿主反応との関連
抗癌剤である 5-FU または放射線の長期、頻回暴露により RFP-HT29 の治療抵抗性クローンを作成し (in vitro)、GFP ノードマウスに移植した。治療抵抗性クローンは肝転移モデルでは腫瘍形成性増殖から瀰漫性増殖に変

化し、転移形成能も促進した。二光子励起顕微鏡でこのクローンの増殖、浸潤を形態学的に解析したところ、一部癌細胞が紡錘形に形態変化し、その周囲に著明な間質反応を伴っていることが確認できた。

担癌マウス(肝転移モデル)に抗癌剤であるCPT-11を頻回投与(5回以上)後の遺残(治療抵抗性)大腸癌細胞をTPLSMにて生体内イメージングすると上記同様に一部癌細胞が紡錘形に形態変化していた(Figure 7)。

大腸癌幹細胞様クローンを用いた同所性移植モデルの検討は十分に遂行することが出来なかった。また、アゾキメタン(AOM)とデキストラン硫酸(DSS)によるマウス大腸発癌モデルを用いた発癌過程における癌-間質反

Figure 7. 肝転移巣のCPT-11抵抗性癌細胞



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14件)

1. Toiyama Y, Hur K, Tanaka K, Inoue Y, Kusunoki M, Boland CR, Goel A. Serum miR-200c is a novel prognostic and metastasis-predictive biomarker in patients with colorectal cancer. *Ann Surg*. 2014;259(4):735-743. (査読有り)
2. Toiyama Y, Inoue Y, Saigusa S, Kawamura M, Kawamoto A, Okugawa Y, Hiro J, Tanaka K, Mohri Y, Kusunoki M. C-reactive protein as predictor of recurrence in patients with rectal cancer undergoing chemoradiotherapy followed by surgery. *Anticancer Res*. 2013;33(11):5065-5074. (査読有り)
3. Inoue Y, Kawamoto A, Okigami M, Okugawa Y, Hiro J, Toiyama Y, Tanaka K, Uchida K, Mohri Y, Kusunoki M. Multimodality therapy in fistula-associated perianal mucinous adenocarcinoma. *Am Surg*. 2013;79(9):e286-288. (査読有り)
4. Toiyama Y, Yasuda H, Saigusa S, Tanaka K, Inoue Y, Goel A, Kusunoki M. Increased expression of Slug and Vimentin as novel predictive biomarkers for lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 2013;34(11):2548-2557. (査読有り)
5. Inoue Y, Kusunoki M. Advances and directions in chemotherapy using implantable port systems for colorectal cancer: a historical review. *Surg Today*. 2013 Jul 28. (査読有り)
6. Saigusa S, Tanaka K, Toiyama Y, Matsushita K, Kawamura M, Okugawa Y, Uchida K, Inoue Y, Mohri Y, Kusunoki M. Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 expression in ductular reactions after chemotherapy for metastatic colorectal cancer. *Hepatol Res*. 2013;43(1):84-90. (査読有り)
7. Tanaka K, Toiyama Y, Inoue Y, Uchida K, Araki T, Mohri Y, Mizoguchi A, Kusunoki M. Intravital imaging of gastrointestinal diseases in preclinical models using two-photon laser scanning microscopy. *Surg Today*. 2013;43(2):123-129. (査読有り)
8. Saigusa S, Inoue Y, Tanaka K, Toiyama Y, Matsushita K, Kawamura M, Okugawa Y, Hiro J, Uchida K, Mohri Y, Kusunoki M. Clinical significance of LGR5 and CD44 expression in locally advanced rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy. *Int J Oncol*. 2012;41(5):1643-1652. (査読有り)
9. Tanaka K, Okigami M, Toiyama Y, Morimoto Y, Matsushita K, Kawamura M, Hashimoto K, Saigusa S, Okugawa Y, Inoue Y, Uchida K, Araki T, Mohri Y, Mizoguchi A, Kusunoki M. In vivo real-time imaging of chemotherapy response on the liver metastatic tumor microenvironment using multiphoton microscopy. *Oncol Rep*. 2012;28(5):1822-1830. (査読有り)
10. Fujikawa H, Tanaka K, Toiyama Y, Saigusa S, Inoue Y, Uchida K, Kusunoki M. High TrkB expression levels are associated with poor prognosis and EMT induction in colorectal cancer cells. *J Gastroenterol*. 2012;47(7):775-784. (査読有り)
11. Tanaka K, Morimoto Y, Toiyama Y, Matsushita K, Kawamura M, Koike Y, Okugawa Y, Inoue Y, Uchida K, Araki T, Mizoguchi A, Kusunoki M. In vivo time-course imaging of tumor angiogenesis in colorectal liver metastases in the same living mice using two-photon laser scanning microscopy. *J Oncol*. 2012;2012:265487.

(査読有り)

12. Kawamoto A, Yokoe T, Tanaka K, Saigusa S, Toiyama Y, Yasuda H, Inoue Y, Miki C, Kusunoki M. Radiation induces epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells. *Oncol Rep*. 2012;27(1):51-57. (査読有り)
13. Tanaka K, Morimoto Y, Toiyama Y, Okugawa Y, Inoue Y, Uchida K, Kimura K, Mizoguchi A, Kusunoki M. Intravital dual-colored visualization of colorectal liver metastasis in living mice using two photon laser scanning microscopy. *Microsc Res Tech*. 2012;75(3):307-315. (査読有り)
14. Saigusa S, Toiyama Y, Tanaka K, Yokoe T, Okugawa Y, Fujikawa H, Matsusita K, Kawamura M, Inoue Y, Miki C, Kusunoki M. Cancer-associated fibroblasts correlate with poor prognosis in rectal cancer after chemoradiotherapy. *Int J Oncol*. 2011;38(3):655-663. (査読有り)

15.

[学会発表](計7件)

2014 Gastrointestinal Cancers Symposium, San Francisco, CA, USA. January 16-18, 2014, 2014.

Clinical significance of serum angiopoietin-like protein 2 in colorectal cancer patients. Takahito Kitajima, Yuji Toiyama, Tadanobu Shimura, Shozo Ide, Hiroki Imaoka, Satoru Kondo, Mikio Kawamura, Yoshinaga Okugawa, Aya Kawamoto, Junichiro Hiro, Susumu Saigusa, Masaki Ohi, Koji Tanaka, Yasuhiro Inoue, Yasuhiko Mohri, Masato Kusunoki *J Clin Oncol* 32, 2014 (suppl 3; abstr 417)

2014 Gastrointestinal Cancers Symposium, San Francisco, CA, USA. January 16-18, 2014, 2014.

Serum angiopoietin-like protein 2 as a novel biomarker of diagnosis and prognosis in gastric cancer. Yuji Toiyama, Yasuhiro Inoue, Takahito Kitajima, Tadanobu Shimura, Hiroki Imaoka, Satoru Kondo, Shozo Ide, Masato Okigami, Hiromi Yasuda, Susumu Saigusa, Masaki Ohi, Koji Tanaka, Yasuhiko Mohri, Masato Kusunoki *J Clin Oncol* 32, 2014 (suppl 3; abstr 9)

AACR Annual Meeting 2013, March 31-April 4, 2013 Chicago, Illinois, USA

The clinical significance of tissue miR-124 methylation in sporadic and ulcerative colitis-associated colorectal cancer Yuji Toiyama, Keun Hur, Koji Tanaka, Yasuhiro Inoue, Takeshi Nagasaka, Masato Kusunoki, C. Richard Boland, Ajay Goel.

AACR Annual Meeting 2013, March 31-April 4, 2013 Chicago, Illinois, USA

Prognostic value of angiopoietin-like protein 2 (ANGPTL2) at the tumor margins in patients with gastric cancer Tadanobu Shimura, Koji Tanaka, Susumu Saigusa, Satoru Kondo, Takahito Kitajima, Yuji Toiyama, Yoshinaga Okugawa, Yasuhiro Inoue, Toshimitsu Araki, Keiichi Uchida, Yasuhiko Mohri, Tsutomu Nobori, Masato Kusunoki.

AACR Annual Meeting 2013, March 31-April 4, 2013 Chicago, Illinois, USA

Expression of tropomyosin-related kinase B (TrkB) at the tumor invasive front as an independent prognostic factor in gastric cancer Koji Tanaka, Tadanobu Shimura, Susumu Saigusa, Satoru Kondo, Takahito Kitajima, Yuji Toiyama, Yoshinaga Okugawa, Yasuhiro Inoue, Masaki Ohi, Toshimitsu Araki, Keiichi Uchida, Yasuhiko Mohri, Masato Kusunoki.

AACR Annual Meeting 2013, March 31-April 4, 2013 Chicago, Illinois, USA

Prognostic impact of Vasohibin 1 (VASH1) expression in tumor cells of colorectal cancer patients Takahito Kitajima, Koji Tanaka, Susumu Saigusa, Tadanobu Shimura, Satoru Kondo, Yuji Toiyama, Yoshinaga Okugawa, Yasuhiro Inoue, Masaki Ohi, Toshimitsu Araki, Keiichi Uchida, Yasuhiko Mohri, Hiroki Hori, Masato Kusunoki.

AACR Annual Meeting 2013, March 31-April 4, 2013 Chicago, Illinois, USA

Aberrant expression of trefoil factor 3 (TFF3) is associated with tumor progression and an unfavorable prognosis in patients with colorectal cancer Satoru Kondo, Koji Tanaka, Susumu Saigusa, Takahito Kitajima, Tadanobu Shimura, Yuji Toiyama, Yoshinaga Okugawa, Yasuhiro Inoue, Toshimitsu Araki, Keiichi Uchida, Yasuhiko Mohri, Kenichiro Ishii, Masato Kusunoki.

[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1件）

名称：個体内部の組織学的イメージ像を観察・取得する方法
発明者：溝口 明、山口 輪作
権利者：有限会社 楠屋
種類：特許権
番号：5268282
取得年月日：2013-05-17
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

楠 正人 (Masato Kusunoki)
三重大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50192026

(2) 研究分担者

井上 靖浩 (Yasuhiro Inoue)
三重大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20324535

三木 誓雄 (Chikao Miki)
三重大学・大学院医学系研究科・客員教授
研究者番号：50242962

問山 裕二 (Yuji Toiyama)
三重大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：00422824

(3) 連携研究者

()

研究者番号：