

p75 neurotrophin receptor expression is a characteristic
of the mitotically quiescent cancer stem cell population present
in esophageal squamous cell carcinoma

食道扁平上皮癌の静止期癌幹細胞同定における p75NTR の有用性

2015 年度

大学院医学薬学教育部 博士課程 生命・臨床医学専攻

学籍番号 31261023

山口哲司

目次

要旨

1. 序論	・ ・ ・ ・ ・ 3
2. 材料と方法	
2.1. 組織マイクロアレイ	・ ・ ・ ・ ・ 4
2.2. 免疫組織学的染色	・ ・ ・ ・ ・ 4
2.3. ヒト食道扁平上皮癌細胞と培養	・ ・ ・ ・ ・ 4
2.4. 癌幹細胞表面抗原の解析と細胞ソーティング	・ ・ ・ ・ ・ 5
2.5. RNA 抽出, cDNA 合成, real-time PCR	・ ・ ・ ・ ・ 5
2.6. 細胞周期解析	・ ・ ・ ・ ・ 5
2.7. 抗癌剤耐性解析	・ ・ ・ ・ ・ 5
2.8. コロニー形成能解析	・ ・ ・ ・ ・ 6
2.9. ノドマウスまたは NOD/SCID マウスを用いた腫瘍形成能解析	・ ・ ・ ・ ・ 6
2.10 統計解析	・ ・ ・ ・ ・ 6
3. 結果	
3.1. 食道扁平上皮癌組織における p75NTR, CD44, CD90 の発現	・ ・ ・ ・ ・ 7
3.2. ヒト食道扁平上皮癌細胞株における p75NTR, CD44, CD90 の発現	・ ・ ・ ・ ・ 7
3.3.分離された細胞サブセットの CSC 関連遺伝子の発現	・ ・ ・ ・ ・ 8
3.4. 細胞周期解析	・ ・ ・ ・ ・ 8
3.5. 薬剤耐性能	・ ・ ・ ・ ・ 8
3.6. コロニー形成能	・ ・ ・ ・ ・ 8
3.7. 腫瘍形成能	・ ・ ・ ・ ・ 9
4. 考察	・ ・ ・ ・ ・ 9
5. 総括	・ ・ ・ ・ ・ 11
6. 謝辞	・ ・ ・ ・ ・ 12
7. 参考文献	・ ・ ・ ・ ・ 12
8. 表、図	・ ・ ・ ・ ・ 15

要旨

目的：

細胞分裂の静止期にある癌幹細胞 (Cancer stem cell; CSC) が、治療抵抗性を有し、またより高い転移能をもつ表現型であると報告されている。我々の研究の目的は、食道扁平上皮癌 (Esophageal squamous cell carcinoma; ESCC) における、静止期癌幹細胞を、CSC マーカーとして報告されている p75 ニューロトロフィン受容体 (p75 neurotrophin receptor; p75NTR)、CD44、CD90 の細胞表面での発現に基づき同定する方法を見つけ出すことである。

方法および結果：

外科的に切除された 56 症例の ESCC 標本を Cancer stem cell マーカーおよび Ki-67 で 2 重染色することにより、p75NTR 陰性細胞にくらべ p75NTR 陽性細胞がより増殖期にある割合が低いことが分かった。次に、ESCC 細胞株 (KYSE 細胞) から、p75NTR および CD44、CD90 の発現をもとに分離した細胞集団を用いて実験を行った。幹細胞関連遺伝子 (Nanog、p63、Bmi1) や上皮間葉転換関連遺伝子 (N-cadherin, fibronectin) の発現レベルを、Real time PCR により解析すると、CD44 陽性または CD90 陽性細胞よりも、それらの発現にかかわらず p75NTR 陽性細胞で有意に遺伝子発現が高いことが分かった。さらに、p75NTR 陽性細胞集団は、CD44 陽性または CD90 陽性細胞集団に比べ、*in vitro* で有意に高いコロニー形成を有し、マウスへの細胞移植によっても有意に高い腫瘍形成能を示した。さらに、抗癌剤に対する抵抗性を MTT 試験により解析すると、p75NTR 陽性細胞は、シスプラチンに対し有意に高い抵抗性を示した。また、培養細胞株において、p75NTR-陽性/CD44 陰性および p75NTR-陽性/CD90 陰性 KYSE 細胞は、静止期にある細胞が有意に高い比率で含まれていた。

総括：

これらの結果から、食道扁平上皮癌において、p75NTR 発現に基づいて、より癌幹細胞様特性が高くさらにより静止期にある細胞を多く含む細胞集団を特定することで、癌幹細胞集団を分離することができることを示唆する。そして、この結果が研究者に新しい診断および治療における標的を提供することとなると思われる。

1. 序論

近年の研究により、癌幹細胞 (Cancer stem cells; CSC) のうち、一部は細胞分裂の静止期にあり、それらは化学療法抵抗性やより高い浸潤能を有することが示されている (1,2)。p75 ニューロトロフィン受容体 (p75 neurotrophin receptor; p75NTR) は、食道上皮の基底層で発現しており (3,4)、また食道扁平上皮癌 (esophageal squamous cell carcinoma; ESCC) においても、p75NTR は高いコロニー形成能や腫瘍形成能を示す細胞集団に発現していることが示されている (5,6)。一方、CD44 (7) や CD90 (8) も、ESCC において、高い腫瘍形成能や転移能を有する細胞集団を特徴づける癌幹細胞マーカーであると報告されている。しかしながら、いずれの検討においても、細胞分裂周期についての検討報告はない。本研究の目的は、ESCC における静止期癌幹細胞を同定するための、p75NTR や CD44、CD90 の発現形式を同定するこちである。

2. 材料と方法

2.1. 組織マイクロアレイ

以前の報告 (9) 同様に、1990 年から 2008 年の間に当科で切除術を行った食道扁平上皮癌患者から採取した 56 標本から組織マイクロアレイを作成し使用した。全例に根治手術が施行され、在院死はなかった。経過観察中央値は 29 か月であった。男性が 50 例、女性が 6 例であり、平均年齢は 62.8 歳であった。TNM 分類 (Ver.6) により、StageI が 6 例、StageIIA が 15 例、StageIIB が 5 例、StageIII が 24 例、StageIV が 6 例であった。すべての遠隔転移症例は遠隔リンパ節転移であり、すべての症例で遠隔転移リンパ節も含め切除されていた。56 症例中の 36 症例で術後に CDDP をベースとした化学療法が追加されていた。これらの検討は、富山大学内の倫理委員会の承認を得ておこなった (#20-57)。

2.2. 免疫組織学的染色

免疫組織染色には抗 Ki-67 抗体 (dilution 1:100)、抗サイトケラチン-オスカー診断抗体 (dilution 1:200, Abcam Ltd, Cambridge, UK)、抗ヒト p75NTR モノクローナル抗体 (NGER5; dilution 1:100, Abcam)、抗ヒト CD44 モノクローナル抗体 (156-3C11; dilution 1:400, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)、抗ヒト CD90 モノクローナル抗体 (EPR3132; dilution 1:100, Abcam) を一次抗体として使用した。免疫染色は Envision Plus kits、horseradish peroxidase、3,3'-diaminobenzidine (DAB; Dako Cytomation, Kyoto, Japan) を使用しおこなった。

p75NTR や CD44、CD90 陽性細胞数や、その他の細胞数の測定は、無作為に選択した 3 視野で、全測定細胞中の陽性細胞の割合を計算した。観察視野のなかで 5% 以上陽性細胞を認めた場合に、その腫瘍がマーカー発現陽性と定義した。

Ki-67 labeling Index を測定するために、Bond III automated immunostainers (Leica Biosystems) を用いて、Ki-67 (brown)/p75NTR (red) または Ki-67 (brown)/CD44 (red) の 2 重免疫染色をおこなった。Ki-67 labeling index は全対象細胞数のうち、Ki-67 の核染色陽

性細胞数の割合と定義した。

2.3. ヒト食道扁平上皮癌細胞と培養

ヒト食道扁平上皮癌細胞株 (KYSE-30, KYSE-140, KYSE-150, KYSE-220, KYSE-510, KYSE-520, and KYSE-790) は Shimada ら (10) によって樹立され、Shimada らの報告通りに 5% fetal calf syndrome (FCS) (Gibco; Grad Island, NY, USA) を添加した Ham'sF12/Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 medium (Wako, Osaka, Japan) で培養した。

2.4. 癌幹細胞表面抗原の解析と細胞ソーティング

サンプル細胞の表面抗原の検出は FACS Cant II flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, Calif, USA) を用いて、また細胞ソーティングは FACS Aria II cell sorter (BD Biosciences, San Jose, Calif, USA) で行い、BD FACSDiva software (BD Biosciences) で解析を行った。Fluorescein isothiocyanate (FITC)- または allophycocyanin (APC) 標識モノクローナルマウス抗ヒト p75NTR 抗体 (clone ME20.4-1.H4), 抗ヒト CD44 抗体 (clone BD105) は Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany) から入手した。FITC-標識モノクローナルマウス抗ヒト CD90 (clone 5E-10) 抗体 は BD Biosciences (San Jose, Calif, USA) から入手した。FITC 標識抗体は、CSC 表面マーカーの検出に使用した。アイソタイプコントロールとして APC- or FITC 標識マウス IgG 抗体 (Miltenyi Biotec) を使用した。培養細胞を、phosphate-buffered saline (-) (PBS (-)) で一度洗浄し、0.25% trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて 培養プレートから剥離し、遠心チューブに回収し遠心をかけた。上澄みを破棄し単細胞を再度 2%FBS 添加 PBS(-) で希釈し、FITC 標識抗体または Isotype control 抗体を加え、暗所で 4°C 30 分間反応させた。2%FBS 添加 PBS(-) で 2 度洗浄し、再度希釈したのち、死細胞を除去するために 7-aminoactinomycin D (7-AAD; BIO-RAD Laboratories, Richmond, Calif, USA) をくわえ、Flow cytometer で、解析および細胞ソートを行った。サンプル細胞のうち陽性細胞の割合が 1%以上であった場合、その細胞株を発現陽性と定義した。

KYSE-30 は p75NTR-陽性/CD44-陰性、p75NTR-陰性/CD44-陽性、p75NTR-陰性/CD44-陰性の 3 つの細胞分画に分離し、KYSE-140 は p75NTR-陽性/CD90-陽性、p75NTR-陽性/CD90-陰性、p75NTR-陰性/CD90-陽性、p75NTR-陰性/CD90-陰性の 4 つの細胞分画に分離した。

2.5. RNA 抽出, cDNA 合成, real-time PCR

ソート細胞から TRIzol Regent (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて全 RNA を抽出した。PrimeScript 1st strand cDNA synthesis kit (TaKaRa Inc., Kyoto, Japan) を使用し cDNA を作成したのちに、the quantitative polymerase chain reaction (qPCR) 解析を行った。cDNA サンプルは、SYBER premix Ex Taq II (TaKaRa Inc., Kyoto, Japan) を用いて、an Mx3000P real-time qPCR system (Agilent Technologies, CA, US) により増幅し解析した

(11)。プライマー配列は、Table1 に示す。それぞれの細胞分画の mRNA 発現レベルは、 $\Delta\Delta$ CT 法によって、GAPDH の発現を基準にし、両マーカー陰性細胞を基準として発現量比を比較検討した。

2.6. 細胞周期解析

細胞周期の解析は、Cycle TEST PLUS DNA reagent kit (Becton Dickinson Inc., San Jose, CA, USA)を用いて処理し、FACS Cant II で測定し、FCS4 Express Cytometry (Becton Dickinson Inc.)で解析を行った。

2.7. 抗癌剤耐性解析

それぞれの細胞分画を 96-well plate (Thermo Scientific, Yokohama, Japan)に、3,200 cells/well の濃度で播種し、5%FCS 添加 Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F-12 を培地として、5% CO₂、37°C で培養した。プレートに播種後、一晚培養し付着させたのち、いくつかの濃度に調整したシスプラチン CDDP (Wako, Osaka, Japan)を添加した。薬剤添加後、2 日後に培地交換を行った。細胞生存率は薬剤添加後 3 日目に、3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Trevigen, Gaithersburg, MD)により、FilterMax F5 plate reader (Molecular devices, Tokyo, Japan)を用いて、595nm 波長での吸光度を測定することにより解析した。すべての解析は独立した 3 回の実験から得た結果を平均値±標準偏差で表現した。

2.8. コロニー形成能解析

KYSE-30 または KYSE140 から、FACS Aria II によりソートした細胞集団を、それぞれ 60-mm tissue culture dishes (Thermo Scientific, Yokohama, Japan)に 1,000 細胞ずつ播種した。14 日間培養したのちに、crystal violet (0.5% crystal violet dissolved in 20% methanol)で細胞コロニーを染色した。直径 3mm 以上のコロニー数を測定し解析した。

2.9. ノードマウスまたは NOD/SCID マウスを用いた腫瘍形成能解析

富山大学の動物実験委員会による承認をえて、これに従って行った。5-6 週齢のマウスを用いて、腫瘍形成能の解析を行った。無胸腺ノードマウス(BALB/CAN. Cg-Foxnl^{nu}/CrCrlj)は KYSE-30 の解析に、NOD/SCID マウス (NOD. CB17-Prdkcsid/J)は KYSE-140 の解析に使用した。すべてのマウスは Charles River Laboratories, Yokohama, Japan から入手した。KYSE 細胞からソートした 1,000-30,000 細胞をそれぞれマウスの両腰皮下に注入した。4 週後にマウスを犠死させ、皮下に形成された腫瘍を摘出した。摘出腫瘍は 10%ホルマリンにて固定したのちに、パラフィン包埋し、免疫組織化学的な染色解析を行った。外観上腫瘍形成兆候を示さなかった部位は、犠死させてのちに皮膚を切開し腫瘍形成の有無を確認した。

2.10 統計解析

統計解析は、JMP v.11 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を用いて行った。 χ^2 乗検定と Fisher's 検定を統計解析のために使用し、 $p < 0.05$ を統計学的有意とした。

3. 結果

3.1. 食道扁平上皮癌組織における p75NTR, CD44, CD90 の発現

我々はまず、組織マイクロアレイを用いて、原発食道扁平上皮癌腫瘍組織 56 症例における、p75NTR および CD44、CD90 の発現を免疫組織染色により評価した (Figure 1A)。p75NTR は 56 例中 19 例 (33.9%) で陽性であり、とくに腫瘍の浸潤部に最も近い数層の細胞で陽性をしめした。CD44 は 56 例中 31 例 (55.4%) で発現しており、腫瘍びまん性に発現していた。一方で、CD90 は 56 例の食道扁平上皮癌組織において癌細胞での発現が認められなかった。同様の方法で陽性コントロールとして行った肝細胞癌組織では癌細胞に CD90 発現を確認した。p75NTR の発現は、性別や年齢、腫瘍局在、pTNM 分類といった臨床病理学的因子との相関は認めなかった (Table 2)。一方で、CD44 の発現は、腫瘍深達度、リンパ節転移に対して相関を認めた (Table 2)。p75NTR および CD44 がともに発現していた腫瘍は 12 例 (21.4%) にみとめ、びまん性に分布する CD44 陽性細胞のうちの、いくつかだけが p75NTR 陽性細胞であった。p75NTR もしくは CD44 の一方のみが発現している組織はそれぞれ 7 例 (12.5%)、および 19 例 (33.9%) であった。p75NTR および CD44 とともに発現を認めなかった癌組織は 18 例 (32.1%) であった。

2 重免疫染色による Ki-67 labeling Index により、大半の p75NTR 陽性細胞は細胞周期の休止期であることが示された (Figure 1B)。一方で、CD44 陽性細胞の大半は増殖期であった。全細胞の Ki-67 labeling Index は 0.407 であり、p75NTR 陽性細胞が 0.175、CD44 陽性細胞が 0.456 であった (Figure 1C)

3.2. ヒト食道扁平上皮癌細胞株における p75NTR, CD44, CD90 の発現

食道扁平上皮癌において、CSC マーカーの発現により細胞のサブセットを特定するために、10 株の ESCC 細胞株 (KYSE-30, KYSE-70, KYSE-140, KYSE-150, KYSE-180, KYSE-220, KYSE-450, KYSE-510, KYSE-520, and KYSE-790) の、p75NTR, CD44, CD90 の発現を flow cytometer を用いて測定した (Figure 2A, Table 3)。10 株中 6 株 (60.0%) が p75NTR 陽性であり、その発現率は 6.4–50.4% であった。CD44 陽性細胞株は 9 株 (90.0%) であり、発現率は 2.4–97.8% であった。CD90 陽性細胞株は 1 例 (10.0%) のみであり、50.9% の細胞で陽性であった。p75NTR 陽性/CD44 陽性 細胞株が 5 株、p75NTR 陽性/CD90 陽性細胞株が 1 株であった (Table 3)。Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) はすべての ESCC 細胞株で発現しており、発現率は 97.5–99.9% であった。ESCC 細胞株における p75NTR, CD44, CD90 の発現パターン (Table 3) から、dual-color flow cytometric 解析に、KYSE-30 および KYSE-140 を使用することとした。p75NTR または CD44 を発現している KYSE-30 は、p75NTR 陽性/CD44 陽性細胞が 1.1%、p75NTR 陽性/CD44 陰性細胞が 14.9%、p75NTR 陰性/CD44 陽性細胞が 23.2%、p75NTR 陰性/CD44 陰性細胞が 60.8% であった (Figure 2B)。p75NTR および CD90 を発現している KYSE-140 では、p75NTR 陽性/CD90 陽性細胞が 20.4%、p75NTR 陽性/CD90 陰性細胞が 12.6%、p75NTR 陰性/CD90 陽性細胞が 32.3%、p75NTR 陰性/CD90 陰性細胞が 35.2% であった (Figure 2B)

3.3.分離された細胞サブセットの CSC 関連遺伝子の発現

我々は、それぞれの分画における幹細胞関連遺伝子、分化マーカー遺伝子、EMT 関連遺伝子の発現を real-time PCR によって解析した。

KYSE-30 において、p75NTR 陽性/CD44 陰性細胞集団の Nanog, p64, Bmi-1 の発現は、p75NTR 陰性/CD44 陽性細胞および p75NTR 陰性/CD44 陰性細胞集団に比較し、有意に高かった (Figure 3A)。反対に、Involucrin の発現は有意に低かった (Figure 3B)。

p75NTR 陽性/CD44 陰性および p75NTR 陰性/CD44 陽性細胞集団の E-cadherin の発現は、p75NTR 陰性/CD44 陰性細胞集団にくらべて有意に低かった (Figure 3C)。さらに、p75NTR 陽性/CD44 陰性細胞集団は、N-cadherin, fibronectin の発現が p75NTR 陰性/CD44 陽性細胞および p75NTR 陰性/CD44 陰性細胞集団よりも有意に高かった (Figure 3C)。

KYSE-140 において、Nanog, p63, Bmi-1 の発現は、p75NTR 陽性/CD90 陽性および p75NTR 陽性/CD90 陰性細胞集団で、p75NTR 陰性/CD90 陽性および p75NTR 陰性/CD90 陰性細胞集団に比べ有意に高かった (Figure 3A)。また、p75NTR 陰性/CD90 陰性細胞集団の Involucrin の発現は、他の細胞集団に比べ有意に高かった (Figure 3B)。さらに、p75NTR 陰性/CD90 陰性細胞集団は、E-cadherin の発現が有意に高かった (Figure 3C)。p75NTR 陽性/CD90 陽性細胞集団は N-cadherin および fibronectin の発現は他の細胞集団にくらべて有意に高かった (Figure 3C)。

3.4. 細胞周期解析

Flow cytometry を用いた細胞周期解析により、p75NTR 陰性/CD44 陽性 KYSE-30 細胞は、G0/G1 期にある細胞の割合が最も低く、活発に細胞分裂を行っている細胞集団であることがわかった。一方で、p75NTR 陽性/CD44 陰性細胞および p75NTR 陰性/CD44 陰性細胞集団は、G0/G1 期にある細胞集団はそれぞれの 67%以上であり、比較的静止期にある細胞を多く含む細胞集団であった (Figure 4A)。

KYSE-140 において、p75NTR 陽性/CD90 陽性細胞集団は最も活発な細胞分裂を示している細胞集団であり、p75NTR 陽性/CD90 陰性細胞集団は G0/G1 期が 42.6%であり、比較的静止期にある細胞が多い集団であった (Figure 4B)。

3.5. 薬剤耐性能

MTT assay によって、それぞれの細胞集団の薬剤耐性能を測定、比較した。KYSE-30 において、p75NTR 陰性/CD44 陽性細胞は、p75NTR 陽性/CD44 陰性細胞集団と比較し、CDDP に対して有意に生存率が低かった (Figure 4C)。KYSE-140 においては、p75NTR 陰性/CD90 陰性細胞は、p75NTR 陽性または CD90 陽性細胞にくらべ、CDDP に対する抵抗性が有意に低かった (Figure 4C)。

3.6. コロニー形成能

KYSE-30 における、コロニー形成能は、p75NTR 陽性/CD44 陰性細胞集団、p75NTR 陰性/CD44 陽性細胞集団、p75NTR 陰性/CD44 陰性細胞集団の順に高かった (Figure 5A)。一方、KYSE-140 における、コロニー形成能は、p75NTR 陽性/CD90 陽性、p75NTR 陽性

/CD90 陰性、p75NTR 陰性/CD90 陽性、p75NTR 陰性/CD90 陰性細胞集団の順にたかかった (Figure 5A)。

3.7. 腫瘍形成能

KYSE-30 において、 3×10^3 細胞をマウスの皮下移植したところ、p75NTR 陽性/CD44 陰性細胞で 4/4sites (100%)、p75NTR 陰性/CD44 陽性細胞で 2/4sites (50%) で腫瘍が形成された。一方で、p75NTR 陰性/CD44 陰性細胞は、 1×10^4 細胞を皮下移植しても腫瘍は形成されなかった (Table 4)。 1×10^4 細胞の p75NTR 陽性/CD44 陰性細胞を皮下移植して形成された腫瘍重量は、p75NTR 陰性/CD44 陽性細胞から形成された腫瘍より有意に重かった (Figure 5B)。組織学的検査により、マウス皮下に形成された腫瘍の表現型が原発性 ESCC 腫瘍に近似していることが示された (Figure 5C)。また、p75NTR はマウス皮下に形成された腫瘍辺縁近くの数層で少数の細胞に発現をみとめた。一方で CD44 は腫瘍辺縁以外においてびまん性に発現をみとめた (Figure 5C)。Ki-67 labeling Index により、p75NTR 陽性細胞の 86.9%が細胞周期の静止期にあすが、一方で CD44 陽性細胞の 74.8%が分裂期にあった。

KYSE-140 においては、 3×10^3 細胞を NOD/SCID マウスの皮下に移植した部位に、p75NTR 陽性/CD90 陽性細胞集団で 2/4 sites(50%)、p75NTR 陽性/CD90 陰性細胞集団で 1/4 sites (25%)で腫瘍が形成された (Table 4)。一方で、p75NTR 陰性/CD90 陽性細胞は 1×10^4 細胞を皮下移植した部位で 2/4 (50%)に形成された、p75NTR 陰性/CD90 陰性細胞集団は 3×10^4 細胞皮下移植しても腫瘍は形成されなかった (Table 4)。 1×10^4 細胞を注入した部位に形成された腫瘍の重量を比較すると、p75NTR 陽性/CD90 陽性細胞からの形成腫瘍は、p75NTR 陽性/CD90 陰性細胞および p75NTR 陰性/CD90 陽性細胞からの形成腫瘍より有意に重かった (それぞれ $p < 0.001$ 、 $p < 0.001$, Figure 5B)。さらに、p75NTR 陽性/CD90 陰性細胞より形成された腫瘍は、p75NTR 陰性/CD90 陽性細胞から形成された腫瘍より有意に大きかった ($p = 0.002$, Figure 5B)。形成腫瘍の免疫組織染色により、p75NTR は腫瘍辺縁に存在する細胞で発現を認めた。Ki-67 labeling Index をみると、全腫瘍細胞のうち 80.4%が増殖期にあるのに対して、p75NTR 陽性細胞は増殖期にある細胞は 40.4%であった ($p = 0.017$, Figure 5E)。マウス皮下移植により形成された腫瘍でも、CD90 陽性細胞は認めなかった。

4. 考察

今回我々が行った免疫組織学的染色により、外科的に切除された ESCC 標本における、ESCC の CSC マーカーとして報告されている p75NTR、CD44 および CD90 の発現は、それぞれ p75NTR 単独発現が 21.4%、CD44 単独発現が 25.0%、p75NTR 及び CD44 両発現が 30.4%であることが分かった。さらに、切除標本の 23.3%では、上記の CSC マーカーいづれも検出されなかった。他の様々な腫瘍で示されているような Heterogeneity が (12)、ESCC 腫瘍における表面マーカー発現でも示された。

食道癌において、CD44 は癌組織にびまん性に発現しているのに対して、p75NTR は腫瘍の辺縁部で発現していることは、以前に行われた実験結果と同様であった (5,7)。免疫 2 重染色に基づく Ki67-labeling Index により、大部分の CD44 陽性細胞が増殖期にあるのに対して、p75NTR 陽性細胞の大半が細胞周期の静止期にあることが示された。これらは、細胞の表面マーカー発現の組み合わせに基づいて CSC 集団を分離することで、ESCC の中から静止期にある CSC を見つけ出すことが可能になることが示唆される。

ESCC 標本のいずれの腫瘍細胞でも、CD90 の発現は認められなかった。しかしながら、すべての切除標本において、腫瘍細胞を取り囲んでいる間質細胞で CD90 の発現を認めた。これは、以前に頭頸部扁平上皮癌の間質細胞において CD90 が検出されたという報告と一致する (13)。また、われわれは陽性コントロールとして肝細胞癌標本において、腫瘍細胞の CD90 発現を確認した (7)。ESCC 切除標本を用いて qPCR を行い CD90 の発現を検出した報告や、ESCC 切除新鮮癌組織から Flow cytometry により CD90 陽性細胞を検出したとの報告はある (8) が、免疫染色により ESCC 切除癌組織における CD90 の発現を確認した報告はない。また、KYSE 細胞株の p75NTR, CD44, CD90 発現は、それぞれ 10 株のうち 6 株、9 株、1 株であり、ESCC 細胞の細胞表面マーカー発現における Heterogeneity も示された。われわれが、ESCC 切除標本の免疫組織学的染色からえた所見、つまり癌組織で CD90 の発現を認めなかったこととは異なり、ESCC 細胞株では KYSE-140 においては、50.9%の細胞に CD90 の発現を認めた。CD90 は、さまざまな生物学的物質 (例えば thymopoietin, prostaglandins、interleukin-1、tumor necrosis factor α 、vascular endothelial growth factor、nerve growth factor (NGF)) によって誘発されることが報告されている (14,15)。これらの報告と、KYSE 細胞において NGF の自己分泌が検出されたという報告 (16) とあわせると、特定の細胞培養環境により CD90 の発現が誘発された可能性が示唆される。

KYSE-30 において、p75NTR 陽性/CD44 陰性細胞集団は、幹細胞関連遺伝子の高発現、扁平上皮への分化マーカーの低発現、また高い薬剤抵抗性、in vitro におけるコロニー形成能、in vivo における腫瘍形成能が有意に高いことが示され、p75NTR 陽性/CD44 陰性細胞集団がより高い癌幹細胞様特性を示す細胞を多く含んでいることを示した。またさらに、大部分の p75NTR 陽性/CD44 陰性 KYSE-30 細胞は、静止期にあった。p75NTR 陽性細胞が、より高い癌幹細胞様特性を有し静止期にあることが示された。一方で、CD44 陽性細胞は、増殖期にある細胞集団であり、癌幹細胞様特性が劣っていた。

KYSE-140 においては CD90 の発現の有無にかかわらず、p75NTR 陽性細胞で幹細胞関連遺伝子が高発現し、分化関連遺伝子の発現は低かった。また高い薬剤抵抗性、in vitro におけるコロニー形成能、in vivo における腫瘍形成能が高いことが示され、癌幹細胞様特性が高いことが示された。

一方で、p75NTR/CD90 の発現パターンに基づく KYSE-140 の分析により、p75NTR 陽性細胞の中に、細胞周期における異なった 2 つの集団が確認された。つまり、p75NTR 陽

性/CD90 陽性細胞集団は活発に増殖している細胞集団であり、p75NTR 陽性/CD90 陰性細胞集団は細胞分裂の静止期にある集団であった。このことから、ESCCにおいても高い癌幹細胞様特性を示しかつ静止期にある細胞集団が存在することが示され、静止期癌幹細胞の存在を示唆した。静止期にある CSC の存在は、メラノーマ (17) や卵巣癌 (18)、乳癌 (2)、膵臓癌 (19) のような固形癌においても示されており、さらにこれらの細胞が化学療法抵抗性や、浸潤および転移に影響し、さらに治癒切除後の再発の危険性を高めることが報告されている (1, 2, 12, 20)。白血病を対象としたいくつかの研究は、静止期 CSC を制御する分子のメカニズムを検討している。これらの研究は、白血病細胞の静止期 CSC を細胞周期に誘導する化学受容体の特定や、また静止期 CSC を直接ターゲットとする分子を特定することが重要であることを示唆している (21, 22)。

最近の報告で、NGF/proNGF/p75NTR が乳癌において静止期 CSC の自己複製能を調整する重要な役割を果たしていることが示されている (23)。我々の結果と、KYSE 細胞において NGF の過剰発現とその自己分泌が細胞増殖を誘導するとの報告 (16) から、p75NTR シグナルが、ESCC における静止期 CSC の調整において重要な役割を果たしているかもしれない。

DNA 結合蛍光色素 Hoechst33342 と抗 Ki-67 抗体を用いた 2 重染色により、造血幹細胞が細胞周期の静止期にあると報告されてように (24)、我々は食道癌組織で増殖マーカーの Ki-67 が陰性であったこと、Propidium Iodide (PI) により核染色体を染色し flow cytometer で DNA 含有量を測定することで細胞周期 G0/G1 期にある細胞が大半であったことから高い癌幹細胞様特性を示す細胞集団の中から静止期 CSC の同定を試みた。一方で、BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine) を用いた解析のように、DNA 複製期に BrdU の取り込みに基づいた解析法は、それらの動的な細胞周期動態に基づく静止期 CSC を分離する検討も報告されている (25)。自己複製能や非対称性細胞分裂を有し、G0/G1 期に存在する p75NTR 陽性細胞集団を対象とした更なる研究は、ESCC に存在する CSC のカイネティクス解明をさらに進めると思われる。

本研究において、p75NTR 陽性/CD44 陰性 KYSE-30 細胞が、p75NTR 陽性/CD90 陽性 KYSE-140 細胞が EMT マーカーを強く発現していた。EMT 過程は、浸潤能や転移能を増強する間葉移行性を獲得するだけでなく、幹細胞能の獲得や CSC における腫瘍形成性の特性を獲得する過程であると報告されている (20, 26)。これらの結果と、NGF が乳癌幹細胞分画における EMT を誘導するとの報告から、p75NTR シグナルが EMT の誘導と幹細胞特性の調整に関与しているかもしれない。KYSE 細胞の p75NTR 陽性細胞集団における、幹細胞能や細胞周期、EMT 過程を調整する分子機構の同定は、ESCC に対する新しい治療戦略開発の基礎を提供すると思われる。

5. 総括

我々は外科的切除標本や培養細胞系を用いた研究により、ESCC の p75NTR や CD44、

CD90 といった表面マーカーが、不均一な発現パターンを示すことが分かった。さらに、切除標本における Ki-67 labeling Index の解析により、p75NTR 陽性細胞の大半は細胞周期の静止期にあり、p75NTR 陰性細胞の大半は増殖期にあることを明らかにした。KYSE 細胞において、p75NTR 陽性細胞は、CD44 や CD90 の発現の有無にかかわらず、幹細胞関連遺伝子の高発現、分化関連遺伝子の低発現、高い抗癌剤耐性や *in vitro* におけるコロニー形成能、*in vivo* における腫瘍形成能を示す細胞集団であることを示した。さらに、KYSE 細胞において、p75NTR 陽性/CD44 陰性細胞および p75NTR 陽性/CD90 陰性細胞は、*in vivo* においても *in vitro* においても癌幹細胞様特性がより強く、細胞周期の静止期にある細胞集団であることを見出した。

これらの結果は、細胞表面マーカーの発現により ESCC からの静止期 CSC 同定分離の可能性を示した。また患者選択のための診断法としての有用性ととも、新しい治療法開発のためのターゲットを提供することとなる。

6. 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の遂行にあたり、御指導、御高閲を賜りました、富山大学 消化器・腫瘍・総合外科 塚田一博教授に感謝申し上げます。また、奥村知之 講師をはじめ、消化器・腫瘍・総合外科のスタッフの方々に感謝申し上げます。培養細胞の提供、実験技術のご指導を賜りました、京都大学大学院薬学研究科 ナノバイオ医薬創成科学講座嶋田裕教授に感謝申し上げます。

本研究は、文部科学省の科学研究費助成事業の科学研究(C) (承認番号 15K10088)、および中部先端医療開発円環コンソーシアム (Chubu Regional Consortium for Advances Medicine; C-CAM) の補助を受けて行われました。

7. 参考文献

1. Li L and Bhatia R: Stem cell quiescence. *Clin Cancer Res* 17: 4936–41, 2011.
2. Pece S, Tosoni D, Confalonieri S, et al.: Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content. *Cell* 140: 62–73, 2010.
3. Okumura T, Shimada Y, Imamura M and Yasumoto S: Neurotrophin receptor p75(NTR) characterizes human esophageal keratinocyte stem cells *in vitro*. *Oncogene* 22: 4017–26, 2003.
4. Okumura T, Shimada Y, Sakurai T, Hori R, Nagata T, Sakai Y and Tsukada K: Abnormal cell proliferation in the p75NTR-positive basal cell compartment of the esophageal epithelium during squamous carcinogenesis. *Dis Esophagus*, 2014.
5. Okumura T, Tsunoda S, Mori Y, et al.: The biological role of the low-affinity p75 neurotrophin receptor in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 12:

- 5096–103, 2006.
6. Huang S-D, Yuan Y, Liu X-H, et al.: Self-renewal and chemotherapy resistance of p75NTR positive cells in esophageal squamous cell carcinomas. *BMC Cancer* 9: 9, 2009.
 7. Zhao J-S, Li W-J, Ge D, et al.: Tumor initiating cells in esophageal squamous cell carcinomas express high levels of CD44. *PLoS One* 6: e21419, 2011.
 8. Tang KH, Dai YD, Tong M, et al.: A CD90 (+) tumor-initiating cell population with an aggressive signature and metastatic capacity in esophageal cancer. *Cancer Res* 73: 2322–32, 2013.
 9. Shimada Y, Okumura T, Sekine S, et al.: Expression Analysis of iPS Cell - Inductive Genes in Esophageal Squamous Cell Carcinoma by Tissue Microarray. *Anticancer Res* 32: 5507–5514, 2012.
 10. Shimada Y, Imamura M, Wagata T, Yamaguchi N and Tobe T: Characterization of 21 newly established esophageal cancer cell lines. *Cancer* 69: 277–284, 1992.
 11. Sekine S, Shimada Y, Nagata T, et al.: Establishment and Characterization of a New Human Gallbladder Carcinoma Cell Line. *Anticancer Res* 32: 3211–3218, 2012.
 12. Dick JE: Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 112: 4793–807, 2008.
 13. Liotta F, Querci V, Mannelli G, et al.: Mesenchymal stem cells are enriched in head neck squamous cell carcinoma, correlates with tumour size and inhibit T-cell proliferation. *Br J Cancer* 112: 745–54, 2015.
 14. Chung MT, Liu C, Hyun JS, et al.: CD90 (Thy-1)-positive selection enhances osteogenic capacity of human adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng Part A* 19: 989–97, 2013.
 15. Haeryfar SMM and Hoskin DW: Thy-1: More than a Mouse Pan-T Cell Marker. *J Immunol* 173: 3581–3588, 2004.
 16. Tsunoda S, Okumura T, Ito T, and et al.: Significance of nerve growth factor overexpression and its autocrine loop in esophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 95: 322–30, 2006.
 17. Roesch A, Fukunaga-Kalabis M, Schmidt EC, et al.: A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell* 141: 583–94, 2010.
 18. Gao M-Q, Choi Y-P, Kang S, Youn JH and Cho N-H: CD24+ cells from hierarchically organized ovarian cancer are enriched in cancer stem cells. *Oncogene* 29: 2672–80, 2010.
 19. Dembinski JL and Krauss S: Characterization and functional analysis of a slow cycling stem cell-like subpopulation in pancreas adenocarcinoma. *Clin Exp*

- Metastasis 26: 611–623, 2009.
20. Mani SA, Guo W, Liao M-J, et al.: The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133: 704–15, 2008.
 21. Roeder I, Horn M, Glauche I, Hochhaus A, Mueller MC and Loeffler M: Dynamic modeling of imatinib-treated chronic myeloid leukemia: functional insights and clinical implications. *Nat Med* 12: 1181–1184, 2006.
 22. Zhang B, Strauss AC, Chu S, et al.: Effective targeting of quiescent chronic myelogenous leukemia stem cells by histone deacetylase inhibitors in combination with imatinib mesylate. *Cancer Cell* 17: 427–42, 2010.
 23. Tomellini E, Touil Y, Lagadec C, et al.: Nerve growth factor and proNGF simultaneously promote symmetric self-renewal, quiescence, and epithelial to mesenchymal transition to enlarge the breast cancer stem cell compartment. *Stem Cells* 33: 342–53, 2015.
 24. Wilson A, Laurenti E, Oser G, et al.: Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell* 135: 1118–29, 2008.
 25. Buczaccki S, Davies RJ and Winton DJ: Stem cells, quiescence and rectal carcinoma: an unexplored relationship and potential therapeutic target. *Br J Cancer* 105: 1253–9, 2011.
 26. Chaffer CL, Marjanovic ND, Lee T, et al.: Poised chromatin at the ZEB1 promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity. *Cell* 154: 61–74, 2013.

8. 表と図

Table 1: Polymerase chain reaction primer sequences

Gene product	Forward (F) and reverse (R) primers (5'-3')	Size (bp)
Nanog	(F) ATGCCTCACACGGAGACTGT (R) AAGTGGGTTGTTTGCCTTTG	83
p63	(F) CAGACTTGCCAGATCATCC (R) CAGCATTGTCAGTTTCTTAGC	220
Bmi-1	(F) CCACCTGATGTGTGTGCTTTG (R) TTCAGTAGTGGTCTGGTCTTGT	162
Involucrin	(F) TGTTCCCTCCTCCAGTCAATACCC (R) ATTCCTCATGCTGTTCCCAGTGC	227
E-cadherin	(F) GTCTGTCATGGAAGGTGCT (R) TACGACGTTAGCCTCGTTC	370
N-cadherin	(F) AGCCAACCTTAACTGAGGAGT (R) GGCAAGTTGATTGGAGGGATG	136
Fibronectin	(F) AGGAAGCCGAGGTTTAACTG (R) AGGACGCTCATAAGTGTCACC	106
DPD	(F) TCAAGCACACGACTCTTGGTG (R) CATACCATTCCACAAGTCAGACC	205
ERCC-1	(F) GCCTCCGCTACCACAACCT (R) TCTTCTCTTGATGCGGCGA	313
GAPDH	(F) ACCACAGTCCATGCCATCAC (R) TCCACCACCCTGTTGCTGTA	452

Table 2: Relationship between the expression of CSC markers (p75NTR, CD44, and CD90) in resected ESCC specimens and patients' clinicopathological characteristics

	p75NTR			CD44			CD90		
	positive	negative	p-value	positive	negative	p-value	positive	negative	p-value
Sex									
Male	17	33		29	21		0	50	
Female	2	4	0.974	2	4	0.251	0	6	-
Age (y.o.)									
≥65	9	18		14	13		0	29	
<65	10	19	0.928	17	12	0.611	0	27	-
Site									
Ce-Ut	3	5		3	5		0	8	
Mt-Ae	16	32	0.818	28	20	0.276	0	48	-
pT									
T1-T2	9	11		7	13		0	20	
T3-T4	10	26	0.192	24	12	*0.022	0	36	-
pN									
N0	11	14		10	15		0	25	
N1-3	8	22	0.178	20	10	*0.048	0	30	-
Differentiation									
Well-mod	12	27		22	17		0	39	
Poor	3	6	0.881	6	3	0.574	0	9	-

Table 3: The percentage of cells expressing CSC markers (p75NTR, CD44, and CD90) in 10 ESCC cell lines

	p75NTR (%)	CD44 (%)	CD90 (%)
KYSE-30	13.8	30.6	-
KYSE-70	-	97.8	-
KYSE-140	29.9	-	50.9
KYSE-150	50.4	7.4	-
KYSE-180	-	2.8	-
KYSE-220	14.9	2.4	-
KYSE-450	-	3.6	-
KYSE-510	29.9	97.2	-
KYSE-520	-	80.7	-
KYSE-790	6.4	3.9	-

Table 4: In vivo tumor development experiment in which p75NTR-positive/CD44-positive KYSE-30 cells were injected into nude mice and p75NTR-positive/CD90-positive KYSE-140 cells were injected into NOD/SCID mice

		Tumor incidence		
Number of cells injected		30,000	10,000	3,000
KYSE-30	p75NTR+/CD44-	2 / 2	4 / 4	4 / 4
	p75NTR-/CD44+	2 / 2	4 / 4	2 / 4
	p75NTR-/CD44-	2 / 2	0 / 4	0 / 4
KYSE-140	p75NTR+/CD90+	2 / 2	2 / 2	2 / 4
	p75NTR+/CD90-	2 / 2	4 / 4	1 / 4
	p75NTR-/CD90+	2 / 2	2 / 4	0 / 4
	p75NTR-/CD90-	0 / 2	0 / 4	0 / 4

Fig. 1A

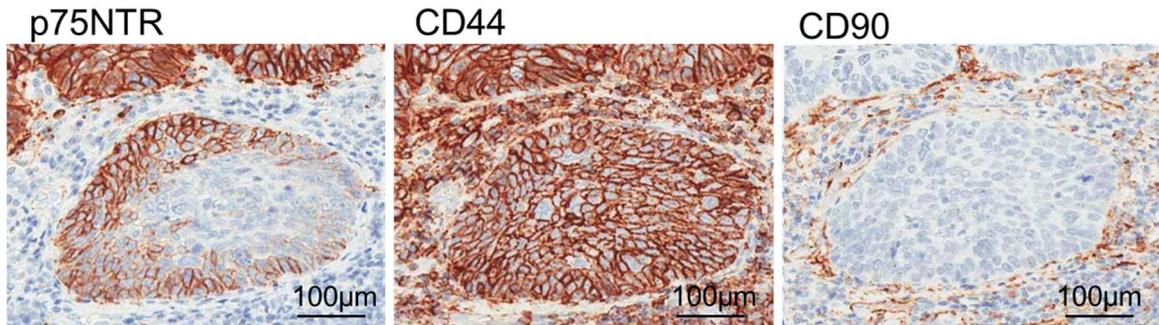


Fig. 1B

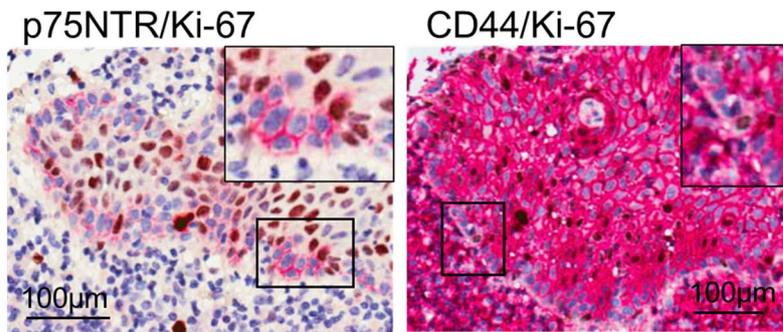


Fig. 1C

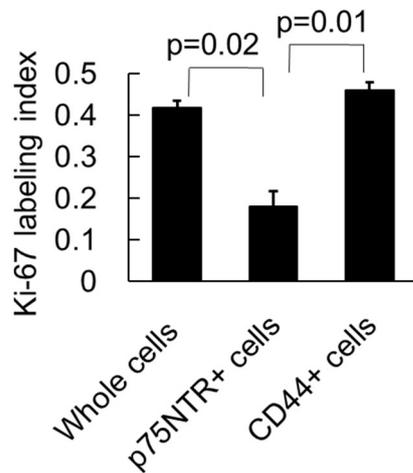


Figure 1: Expression of p75NTR, CD44, and CD90 in resected ESCC specimens

(A) The upper plates show representative findings of an immunohistochemical analysis of p75NTR, CD44, and CD90 expression in the ESCC tissue specimens. (B) The lower plates show the results of double staining of Ki-67 and p75NTR or CD44. (C) A comparison of the Ki-67 labeling indices of the p75NTR-positive cells and CD44-positive cells. The error bars represent the standard error of the mean.

Fig. 2A

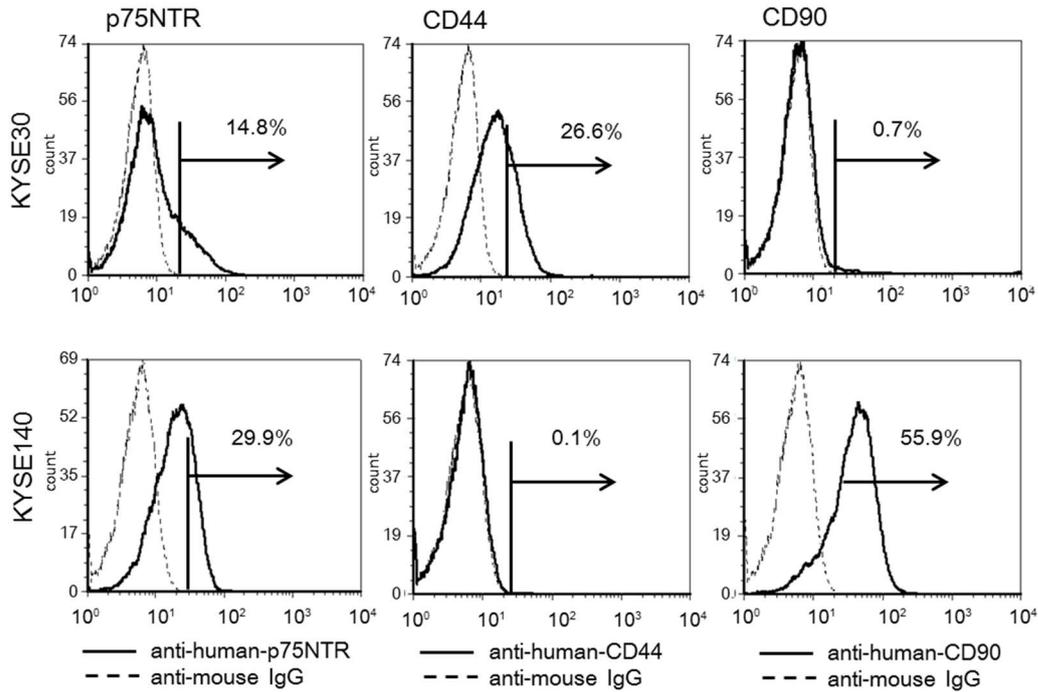


Fig. 2B

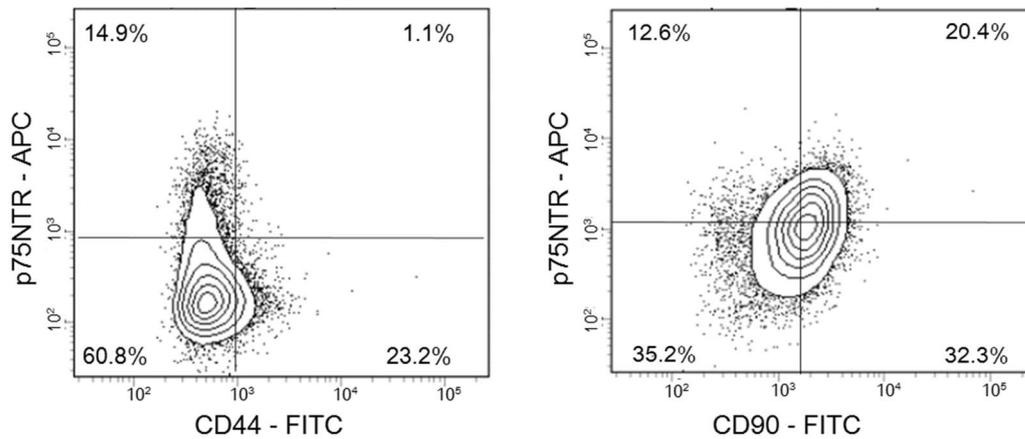


Figure 2: (A) Representative flow cytometric analysis of p75NTR, CD44, and CD90 expression in ESCC cells. Two KYSE cell lines (KYSE-30 and KYSE-140) were stained with anti-p75NTR, anti-CD44, and anti-CD90 antibodies and analyzed using flow cytometry. The levels of each marker were normalized to that of the control IgG, and the percentages of positive cells are shown in each panel. (B) KYSE-30 cells and KYSE-140 cells were co-stained with anti-p75NTR-APC and anti-CD44-FITC or anti-CD90-FITC antibodies, before being analyzed using two-color flow cytometry. The expression levels of each quadrant marker were normalized to that of the relevant isotype-matched control. The percentages of cells in each quadrant are shown.

Fig. 3A

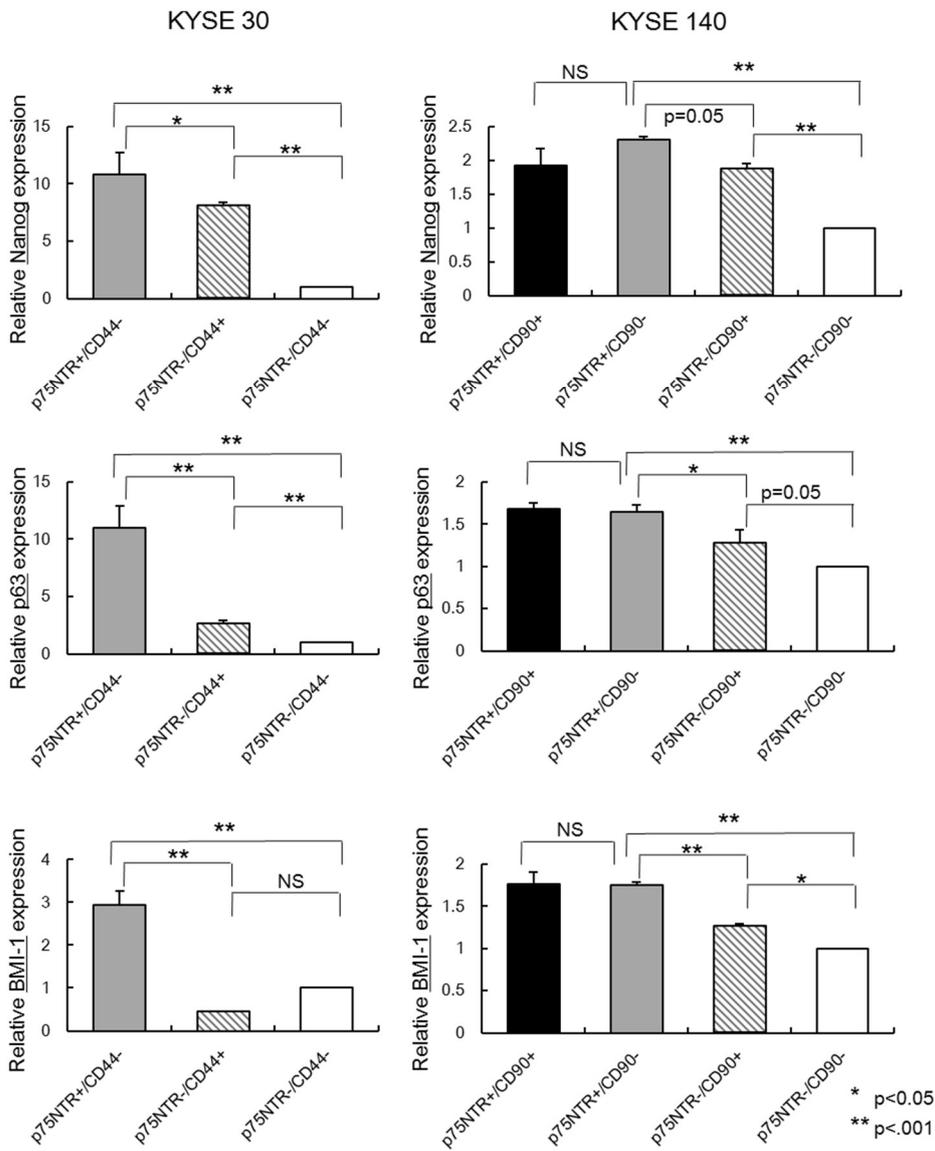


Fig. 3B

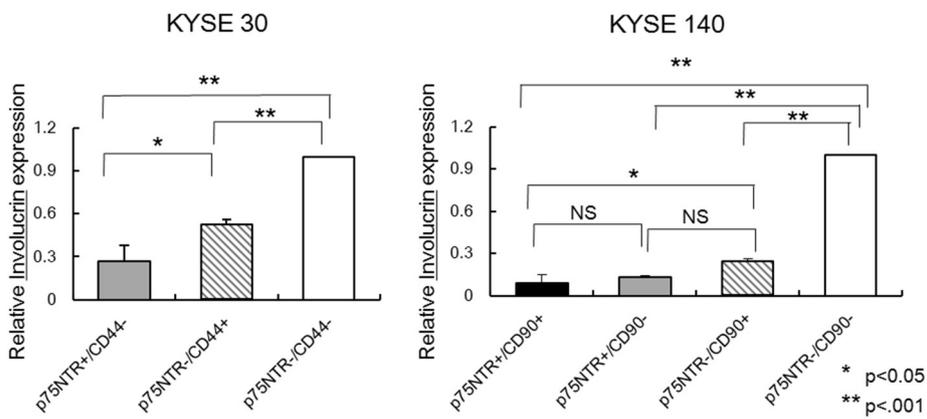


Fig. 3C

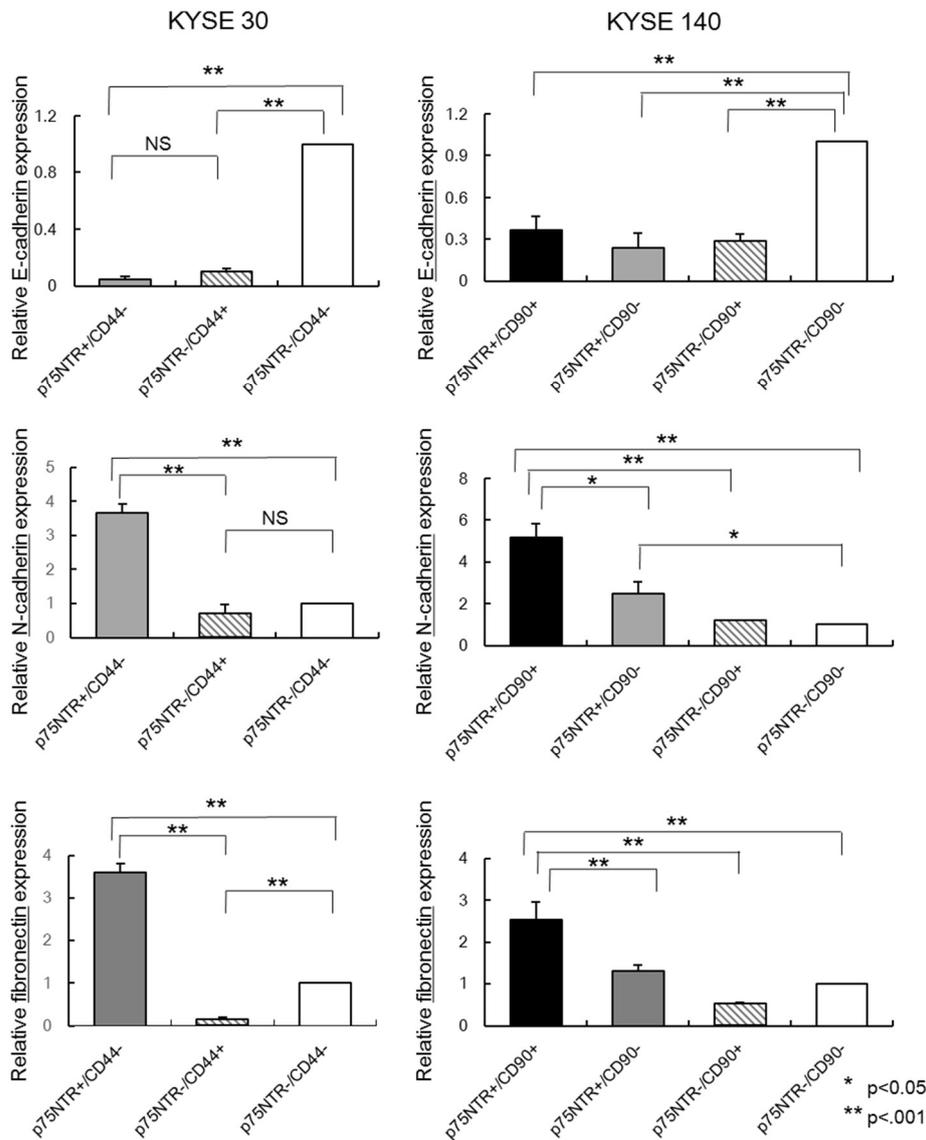


Figure 3: Expression of CSC-related genes in each cell subset

The CSC-related mRNA (A), keratinocyte differentiation-related mRNA (B), and EMT-related mRNA (C) expression levels of sorted p75NTR-positive/CD44-positive cells isolated from KYSE-30 cells (left panels) or sorted p75NTR-positive/CD90-positive cells isolated from KYSE-140 cells (right panels) were measured by real-time PCR. The expression levels of these cell markers are shown relative to their expression levels in the p75NTR-negative/CD44-negative cells or p75NTR-negative/CD90-negative cells. The error bars represent the standard error of the mean.

Fig. 4A

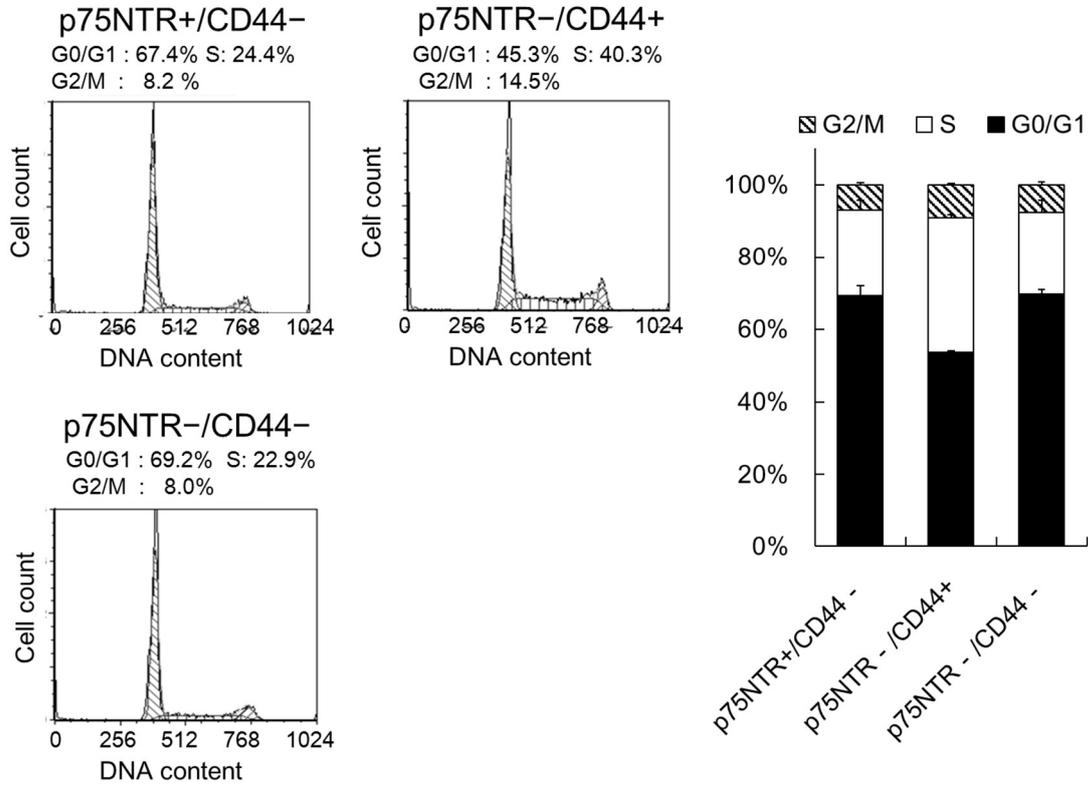


Fig. 4B

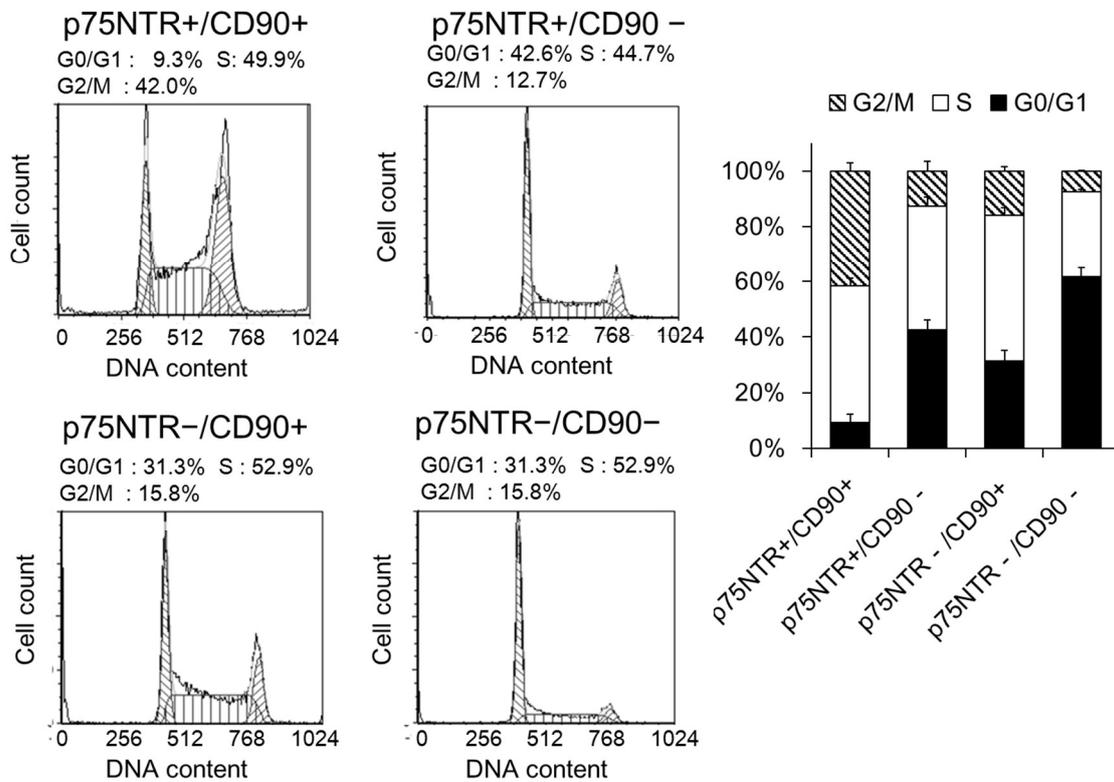


Fig. 4C

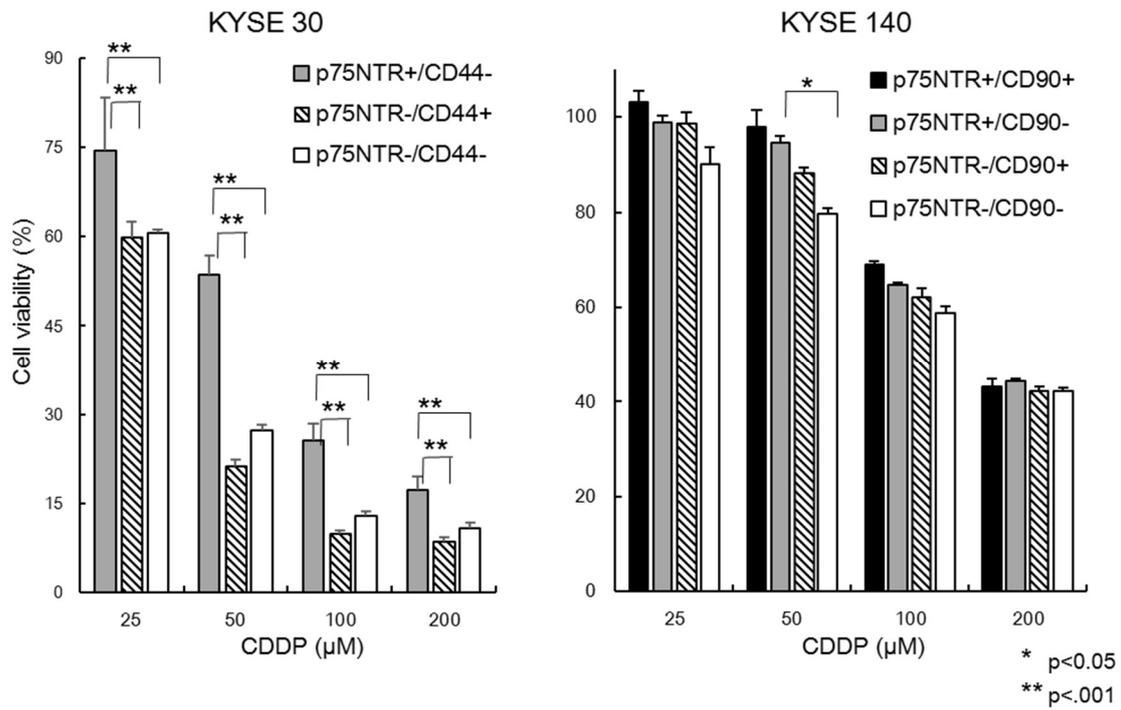


Figure 4: The cell cycle distribution and chemoresistance of KYSE-30 and KYSE-140 cell subsets

(A, B) Approximately 2×10^4 live cells were analyzed using the Cycle TEST PLUS DNA reagent kit and a FACS Cant II. The results were then analyzed using the FCS4 Express Cytometry software. The proportions of cells in each phase of the cell cycle are shown in each panel. The error bars represent the standard error of the mean. (C) Fractionated KYSE-30 and KYSE-140 cells in 96-well plates (3,200 cells per well) were treated with cisplatin (25, 50, 100, or 200 μM) (or left untreated) for 3 days, and then their viability was determined using the MTT assay.

Fig. 5A

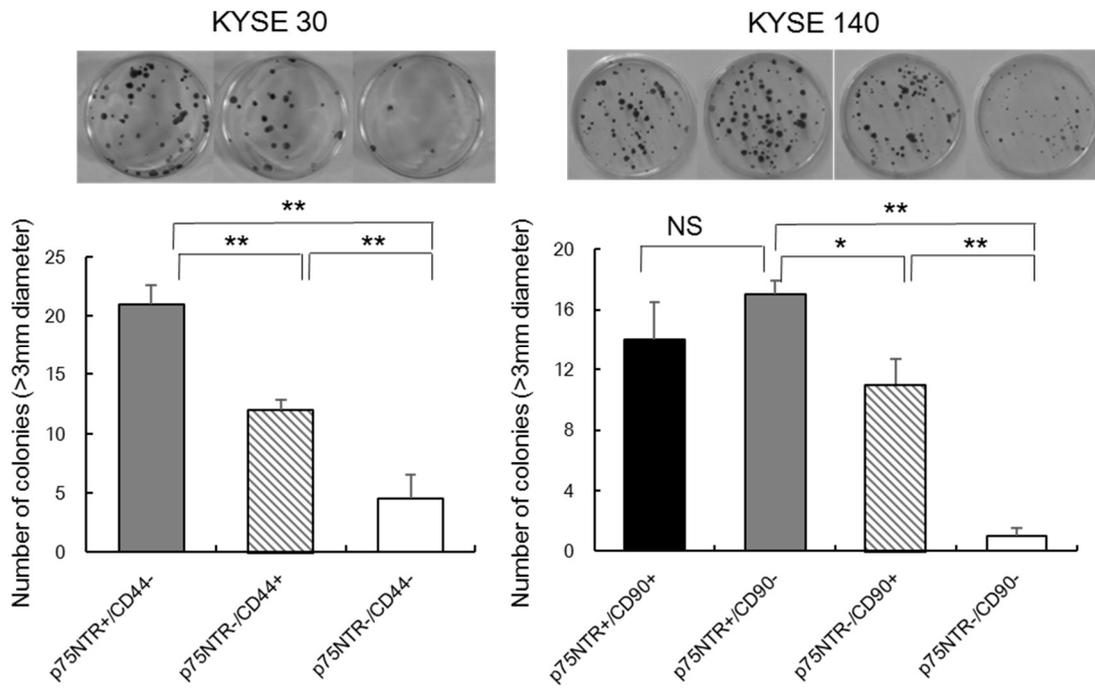


Fig. 5B

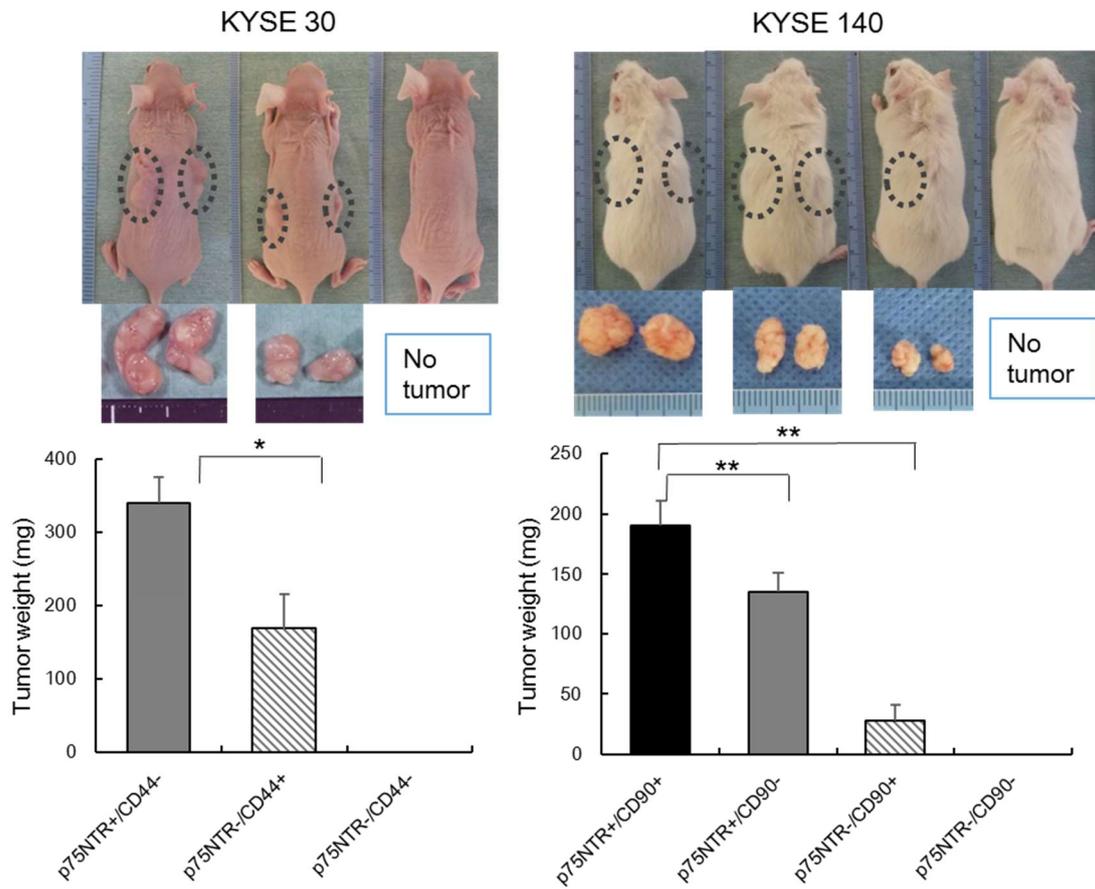


Fig. 5C

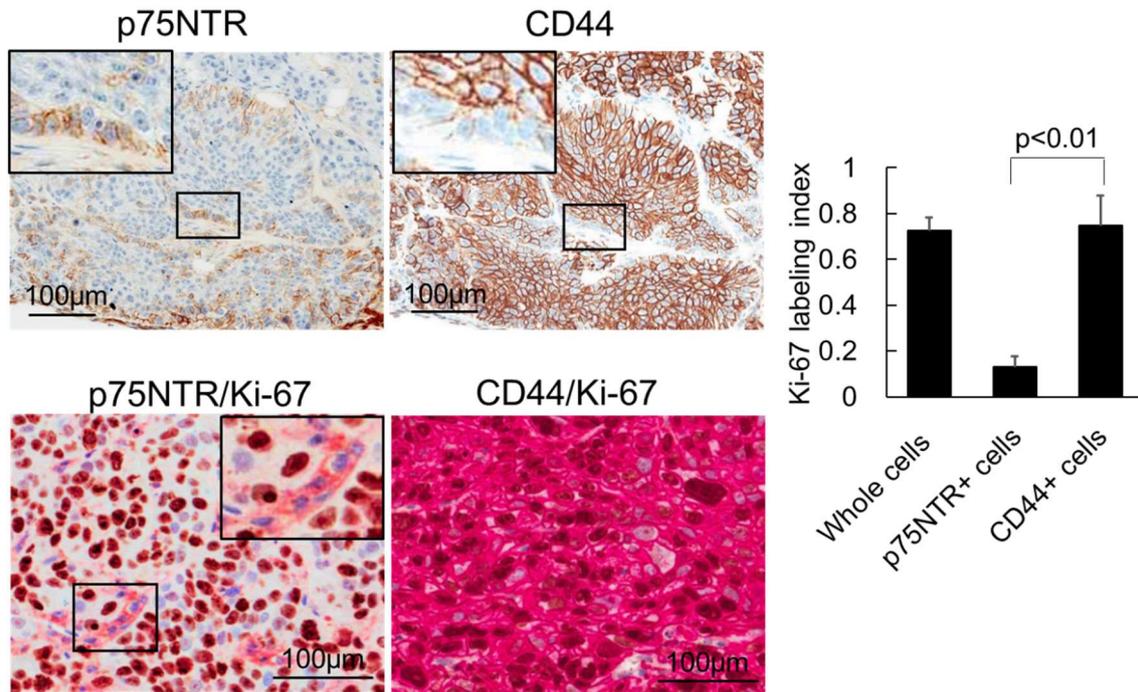


Fig. 5D

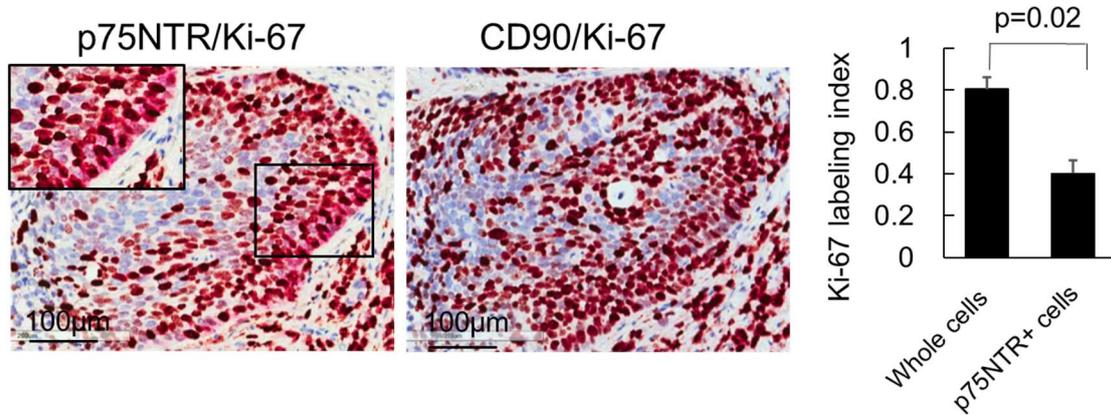


Figure 5: Colony formation assay and tumorigenicity analysis

(A) The colony formation abilities of subpopulations of KYSE-30 and KYSE-140 cells that were isolated based on their p75NTR, CD44, and CD90 expression patterns. Crystal violet staining of the colonies that had formed at 2 weeks after the plating procedure (upper panels). The mean number of colonies of >3 mm diameter was compared. The error bars represent the standard error of the mean (lower panels). (B) Representative nude mice with subcutaneous tumors derived from 1×10^4 of p75NTR-positive/CD44-negative, p75NTR-negative/CD44-positive, or p75NTR-negative/CD44-negative KYSE-30 cells and subcutaneous tumors derived from these subpopulations of

KYSE-30 cells (left upper panels). Representative NOD/SCID mice with subcutaneous tumors derived from 1×10^4 p75NTR-positive/CD90-negative, p75NTR-positive/CD90-negative, p75NTR-negative/CD90-positive, or p75NTR-negative/CD90-negative KYSE-140 cells, and subcutaneous tumors derived from this subpopulation of KYSE-140 cells (right upper panels). The lower panels show the mean tumor weight at each site. The error bars represent the standard error of the mean. (C) Representative immunohistochemical findings obtained during the staining of p75NTR and CD44 in a tumor derived from p75NTR-positive/CD44-negative KYSE-30 cells (upper panels), and the lower panels show the results obtained during the double staining of Ki-67 and p75NTR or CD44. Ki-67 labeling index data are also shown. (D) Representative immunohistochemical findings obtained during the double staining of Ki-67 and p75NTR or CD90 in a tumor derived from p75NTR-positive/CD90-positive KYSE-140 cells. Ki-67 labeling index data are also shown (right panel)