

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08385

研究課題名(和文) 進行期直腸癌の β -カテニン/EMT誘導癌幹細胞化による化学・放射線療法の耐性機構研究課題名(英文) Possible role of nuclear β -catenin in resistance to preoperative chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer

研究代表者

高橋 博之 (Takahashi, Hiroyuki)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号：60377330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：進行期直腸癌に対する術前化学・放射線療法(NCRT)の無効症例の原因の1つにがん幹細胞(CSC)の存在がある。現在、がん幹細胞化には β -カテニン/EMT(上皮間質転換)機構の関与が考えられている。そこで、直腸癌のNCRT効果予測における腫瘍形態および β -カテニンの有用性について調べた。その結果、 β -カテニンの核内集積に伴い治療抵抗性が増強すること、また、 β -カテニンの誘導により形態的および質的にEMT/CSC化を起こした癌細胞はNCRTに対し抵抗性を持つことが明らかになった。以上より β -カテニンの核内発現はNCRT前に効果予測因子となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A total of 109 cases of locally advanced rectal cancer, along with a colon cancer cell line, were investigated. Nuclear β -catenin accumulation in pretreatment-biopsied samples was inversely associated with the therapeutic efficacy of chemoradiotherapy in resected rectal cancer. Nuclear β -catenin was predominantly observed in EMT-like lesions with decreased E-cadherin and increased Snail expression, along with expression of CSC-related markers. The EMT-like lesions also showed significant decreases in both apoptosis and cell proliferation. In-vitro, induced EMT/CSC properties together with nuclear β -catenin accumulation showed inhibition of cell proliferation and resistance to doxorubicin treatment. Nuclear β -catenin accumulation may contribute to chemoradioresistance, probably through its regulation of EMT/CSC properties. In addition, nuclear β -catenin in pretreatment-biopsied samples is useful in predicting the efficacy of chemoradiotherapy in patients with rectal cancer.

研究分野：消化管病理

キーワード：癌幹細胞 化学放射線療法 上皮間葉転換 直腸癌 β -カテニン

1. 研究開始当初の背景

・進行直腸癌におけるがん幹細胞研究の必要性

多くの大腸癌は根治的切除が可能だが、依然、進行期直腸癌の治療は難渋する。近年、これらの症例に対して、術前化学放射線療法（NCRT）＋外科的切除の併用療法が施行され、比較的良好な成績が得られている。しかし、NCRT 無効症例も存在し、その対策の必要性に迫られている。申請者は、この治療抵抗性に、腫瘍組織内のがん幹細胞の関与を考えた。一般に、癌にも正常組織と同様のヒエラルキーが存在し、その頂点に位置するがん幹細胞のみが強い自己複製能と癌形成能を有する（*Nature* 1994）。また、がん幹細胞は、抗癌剤や放射線に対して強い耐性を示し、腫瘍の再発・転移の根幹となる（*Nature* 2006）。すなわち、直腸癌のがん幹細胞制御機構の解明は、NCRT 効果予測や新しい治療パラダイムの構築に繋がる重要な課題である。

・β-カテニン/上皮間葉転換（EMT）機構によるがん幹細胞化

がん幹細胞の制御機構には、様々なシグナル伝達系が関与している。例えば、Snail や Slug などによる EMT 誘導により幹細胞様形質変換が生じる（*Cell* 2008）。また、大腸癌では、EMT による簇出現象に核内β-カテニンや Snail が中心的な役割を演じる（*Nature* 1998）。これまでに申請者の研究グループは、β-カテニンや Snail/Slug を中心とした様々なシグナルネットワークによる癌細胞の分化・増殖制御機構を、精力的に検索してきた。その結果、① β-カテニン系は、Snail/GSK-3β系などのシグナル伝達系とのクロストークを介して、子宮内膜癌細胞の増殖抑制と細胞分化を制御する（*Am J Pathol* 2004, *J Pathol* 2007, 2008）。

② 子宮癌肉腫において、β-カテニン/Slug系による E-カドヘリン発現抑制を介した EMT 誘導が、がん幹細胞化に重要である（*Am J Pathol* 2009）。③ 子宮癌肉腫の軟骨肉腫成分への分化誘導に、核内β-カテニン系と Sox9/NF-κB 系が関与することを報告した（*Hum Pathol* 2013）。加えて、申請者は、

④ 子宮異型ポリープ状腺筋腫で、核内β-カテニン系は上皮成分の構築に關与する（*Hum Pathol* 2014）、⑤ 胃腺腫・癌の上皮性不規則分岐部で、核内β-カテニン発現とがん幹細胞マーカーであるアルデヒド脱水素酵素（ALDH1）発現が一致することを明らかにした（*Histopathology* 2014）。これらの知見は、進行期直腸癌におけるβ-カテニン/EMT（β-カテ/EMT）誘導がん幹細胞化と NCRT 抵抗性機構との関連性の解明、およびその臨床的応用への挑戦の礎となった。

・NCRT 効果における直腸癌のがん幹細胞化誘導機構の作業仮説

一般に、がん幹細胞は、通常の組織幹細胞起源と推測されているが、分化した癌細胞の先祖帰りによるがん幹細胞化機構も指摘されている（*Science* 2004）。申請者は、大腸癌のβ-カテニン依存性 EMT 由来の簇出部では、高率に癌細胞が二次的にβ-カテ/EMT 誘導がん幹細胞化を示し、これが NCRT に対する感受性を左右する可能性を考えた。そこで、先行実験として、NCRT 前後の直腸癌症例を用いて、腫瘍形態の変化と核内β-カテニン発現を中心に検索を行った。

その結果、① 核内β-カテニン発現と術前 NCRT の治療効果は反比例した。② 癌組織簇出部で、核内β-カテニンは ALDH1、CD133、Lgr5 などのがん幹細胞マーカーと共発現を示した。③ 正常粘膜の腺管上皮の幹細胞マーカー陽性細胞には、核内β-カテニン発現は認めなかった。④ 少数例だが、進行期直腸癌のβ-カテニン遺伝子変異は認めなかった。これらの結果から申請者は下記の作業仮説を立案した。進行期直腸癌において①β-カテ/EMT 依存性（二次性）と非依存性（一次性）のがん幹細胞が存在する。②β-カテ/EMT により誘導される腫瘍内簇出部で、二次性がん幹細胞が誕生する。③そのがん幹細胞が NCRT 抵抗性に關与する。④そのメカニズムの解明は、直腸癌の治療効果予測や新規治療薬の開発に繋がる。

2. 研究の目的

現在、切除困難な進行期直腸癌に対して術前化学放射線療法（NCRT）＋外科療法が施行され、一定の成果が得られている。しかし、一部に NCRT 無効で治療に難渋する症例がある。申請者は、この原因として自己複製能・多分化能を特徴とするがん幹細胞に注目した。最近、がん幹細胞化に、β-カテニン系と上皮間葉転換（EMT）の関与が指摘された。本研究は、進行期直腸癌で、①腫瘍組織内のβ-カテニン/EMT（β-カテ/EMT）誘導がん幹細胞化機構を同定し、②NCRT 耐性機構との関連性を明らかにする。③β-カテ/EMT 依存性がん幹細胞の遺伝子発現プロファイル解析から、

その抗癌剤耐性を導く責任分子を網羅的に検索する。最後に、④病理組織標本で、 β -カテ/EMT がん幹細胞の可視化による予後予測システムの確立と新しい治療パラダイムの構築へ展開する。

3. 研究の方法

臨床検体 (*in vivo*) と大腸癌培養細胞 (*in vitro*) の両側面から、免疫組織化学・分子病理学的手法で検索・解析を行う。

A. β -カテ/EMT 誘導がん幹細胞の証明

1) 直腸癌の β -カテニン関連遺伝子異常の解析およびがん幹細胞関連マーカーの検出

<方法> 100 例前後の進行期直腸癌の腫瘍内簇出 (EMT) 部を中心に、 β -カテニンおよび各種がん幹細胞マーカー (CD133, CD44, ALDH1, Sox2, lgr5, msil, EphB2, EphB3, CD24, CD29) の免疫染色を施行し、核内 β -カテニンと共染を示すがん幹細胞マーカーを同定する。また、 β -カテニンおよび APC 遺伝子のホットスポットの点突然変異を、PCR-direct sequence 法で検索する。

2) β -カテ/EMT 誘導がん幹細胞の同定

<目的> 臨床検体で得られた結果を大腸癌培養細胞で検証し、 β -カテ/EMT 誘導がん幹細胞マーカーを同定する。

<方法> 大腸癌培養細胞 (DLD1, HCT-116, HT-29) で、恒常的外因性 β -カテニン遺伝子過剰発現細胞を作製し、 β -カテニン誘導がん幹細胞化を、Aldefluor 法 (がん幹細胞が ALDH1 が高活性であることを利用した検出法) と Spheroid 法で確認する。

さらに、A-1) で核内 β -カテニンと共発現することが確認できたがん幹細胞マーカー発現をフローサイトメトリーで検索する。

3) β -カテ/EMT 依存性がん幹細胞化の証明

<方法> A-2 で作製した恒常的 β -カテニン過剰発現する大腸癌細胞を HGF/TGF- β 処理により EMT を誘導し、 β -カテ/EMT 誘導がん幹細胞を作製する。がん幹細胞化の確認は、形態観察、Aldefluor 法、Spheroid 法で行う。同時に、核内 β -カテニン関連がん幹細胞マーカー発現を蛍光抗体法や western blot 法およびフローサイトメトリーなどで検索する。

B. β -カテ/EMT 依存性がん幹細胞の化学療法耐性機構の解明

1) β -カテ/EMT 依存性がん幹細胞のアポトーシス制御系の変化

<目的> β -カテ/EMT 誘導がん幹細胞での抗癌剤に対するアポトーシス制御系の変化を検索する。

<方法> 上記 A-3) で作製した β -カテ/EMT

誘導がん幹細胞を doxorubicin 等の抗癌剤で処理した後、anti- or pro-apoptotic pathway の変化を TUNEL 法、western blot 法、及びフローサイトメトリーで検索する。また、同がん幹細胞をヌードマウスに移植し、抗癌剤耐性を腫瘍形成数、腫瘍重量で比較検討する。

2) 遺伝子発現プロファイル解析による抗癌剤耐性制御分子候補の網羅的検索

<目的> β -カテ/EMT 誘導がん幹細胞で、抗癌剤耐性に中心的役割を演じる制御候補分子 (治療ターゲット分子) を選別する。

<方法> i) 上記 A-3) で作製した β -カテ/EMT 誘導がん幹細胞を抗癌剤で処理した後に、cDNA マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイル解析を行い、制御候補分子群を選別する。ii) 選別した分子群の発現を、定量的 Real-time PCR 法や western blot 法で、mRNA・タンパクレベルで確認する。iii) siRNA によるノックダウンによる抗癌剤耐性の変化を比較検討し、最も有力な抗癌剤耐性責任分子の絞り込みを行う。

3) β -カテ/EMT 誘導がん幹細胞の抗癌剤耐性を阻害する小分子化合物の網羅的検索

<方法> 発現プロファイル解析 (B-2) で同定した抗癌剤耐性責任分子を抑制する小分子化合物を検索し、新しい治療パラダイム構築のための基礎データを集積する。

C. 進行期直腸癌の β -カテ/EMT 誘導がん幹細胞の病理組織での臨床応用

1) 病理組織標本で β -カテ/EMT 誘導がん幹細胞と NCRT 効果との関連性について検索

<方法> 病理組織標本で、 β -カテニン、EMT マーカー (snail, slug など)、および A-1), 2) で同定した β -カテ/EMT 誘導がん幹細胞の特異的マーカーの免疫染色を行い、病理組織標本上での β -カテ/EMT 誘導がん幹細胞の可視化を行う。

2) 上記因子による NCRT 効果および予後予測システムの確立

<方法> β -カテ/EMT 誘導がん幹細胞と NCRT 効果や予後との関連性を検索し、進行期直腸癌の NCRT 併用外科切除療法の予後予測システムの構築を図る。

4. 研究成果

NCRT の治療効果と治療前標本における核 β -カテニン陽性率の関係

NCRT 前の内視鏡検査による生検組織で行

った β -カテニンの免疫染色では、核 β -カテニン陽性率は、治療効果の低い Grade 1 で低値、治療効果の高い Grade 3 で高値を示した (Fig. 1)。

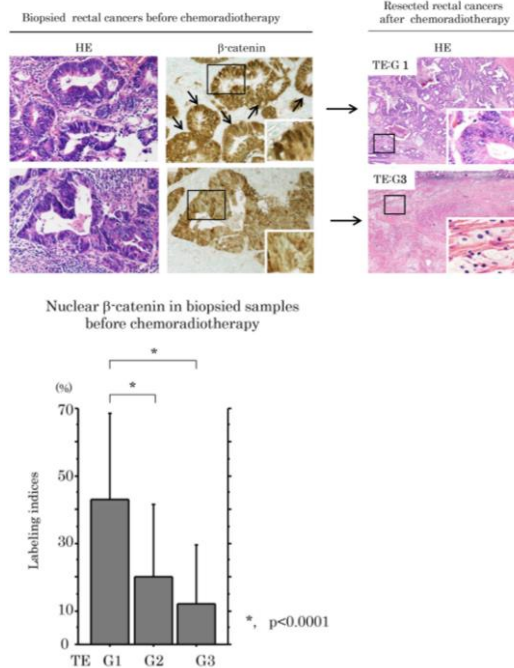


Fig. 1 NCRT の治療効果と治療前核 β -カテニン陽性率の関係。倍率: $\times 200/\times 400$ 。

手術標本 (NCRT 後) における EMT 関連因子の評価

NCRT 後の手術標本の HE 染色で、EMT の観点から、高円柱状や立方状の腫瘍細胞からなり、主に管状構造で増殖する比較的大きな胞巣を non-EMT lesion、平坦あるいは紡錘形の腫瘍細胞や、腫瘍細胞が 1 個から 5 個未満の集塊からなる簇出を EMT-like lesion とした (Fig. 2)。核 β -カテニン陽性率、Snail IHC score は、non-EMT lesion より EMT-like lesion で有意に高く、逆に E-cadherin IHC score、アポトーシスや Ki-67 の陽性率は non-EMT lesion で有意に高値を示した。

A

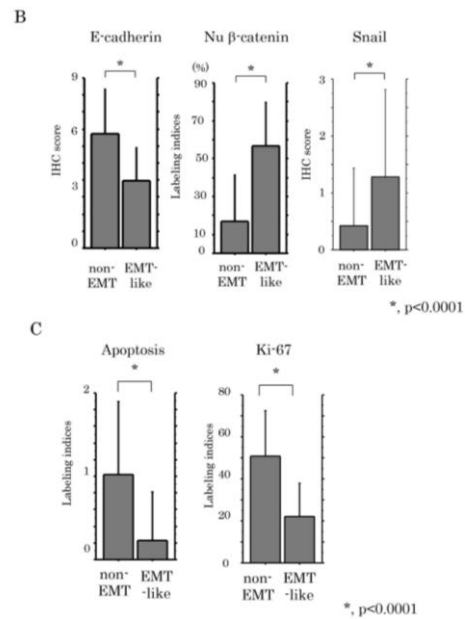
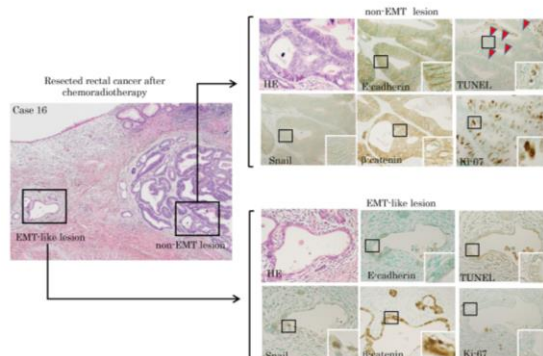


Fig. 2 手術標本での EMT 関連因子の評価。倍率: 左, $\times 40$, 右, $\times 200/\times 400$ 。

手術標本 (NCRT 後) における CSC 関連因子の評価

大腸の幹細胞マーカーとして知られる *lgr5* の mRNA 発現を in situ hybridization で調べ、核 β -カテニン発現との関係を検討した。EMT-like lesion では、*lgr5* 陽性部位において *lgr5* 陰性部位に比べて有意に高い核 β -カテニン陽性率を示した (Fig. 3)。

A

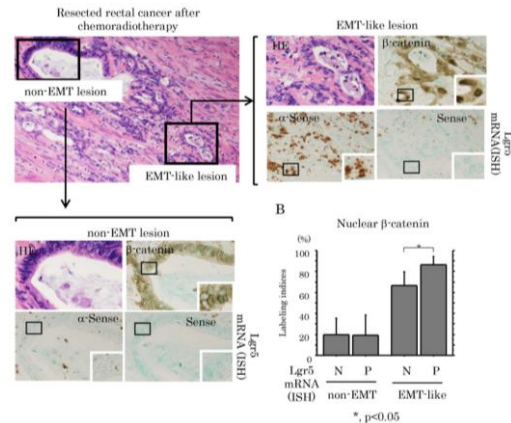


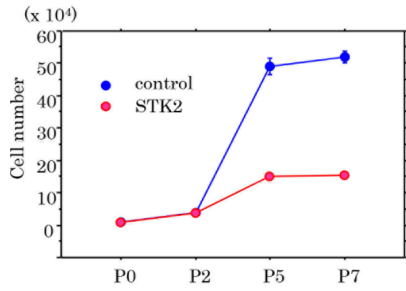
Fig. 3 手術標本での EMT 関連因子の評価。倍率: $\times 200/\times 400$ 。略語: N, negative; P, positive。

DLD1 細胞における核 β -カテニンと EMT/CSC 関連因子との関係

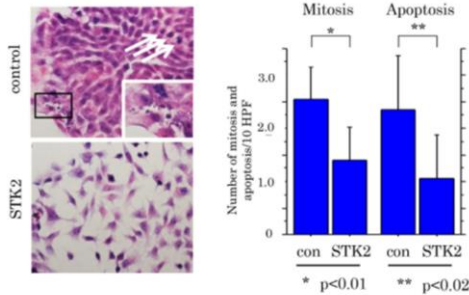
DLD1 に STK2 培地を用いて、核 β -カテニン発現と EMT/CSC との関連を調べた。STK2 で培養した DLD1 は、コントロールに比べて特に対数増殖期に増殖が抑制された (Fig. 4A)。また、STK2 で培養した DLD1 は、線維芽細胞様に細長く形態が変化し、核分裂像やアポトーシスの頻度は低下した (Fig. 4B)。また、STK2 による培養により、蛋白発現は

E-cadherin 低下、核 β -カテニンや Slug の増加を示した (Fig. 4C)。免疫蛍光染色で、STK2 によって線維芽細胞様形態変化と E-cadherin 膜発現低下、核 β -カテニン発現増加を確認した (Fig. 4D)。さらに、STK2 の培養で、spheroid assay による高い spheroid 形成能 (Fig. 4E)、Aldefluor assay で高い ALDH 酵素活性を認めた (Fig. 4F)。

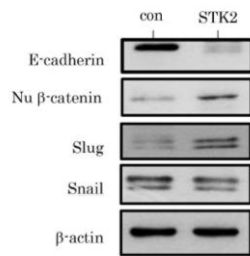
A



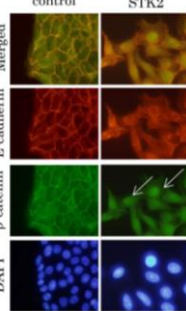
B



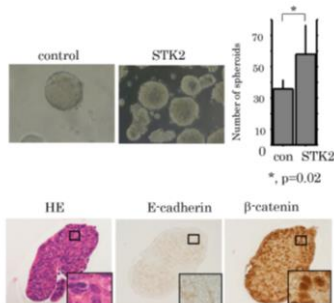
C



D



E



F

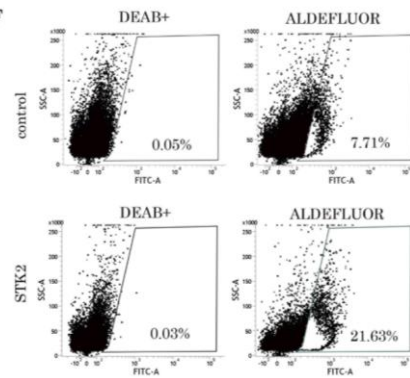
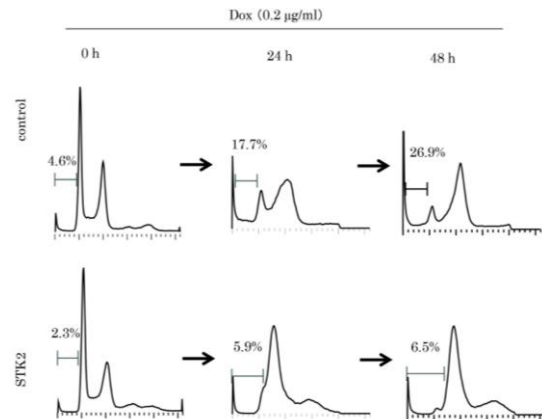


Fig. 4 (A) DLD1 の増殖曲線。(B) 左 ; HE 染色。倍率: $\times 200/\times 400$ 。右 ; mitosis, apoptosis の評価。(C) Western blot。(D) 免疫蛍光染色。(E) Spheroid assay。(F) Aldefluor assay。

EMT/CSC 誘導と DOX 耐性との関係

EMT/CSC が誘導されると考えられる STK2 による培養を行うと、flow cytometry を用いた細胞周期解析でアポトーシスに相当する sub G1 期が DOX 投与後も抑えられており (Fig. 5A)、TUNEL 法でもアポトーシスが低値を示した (Fig. 5B)。

A



B

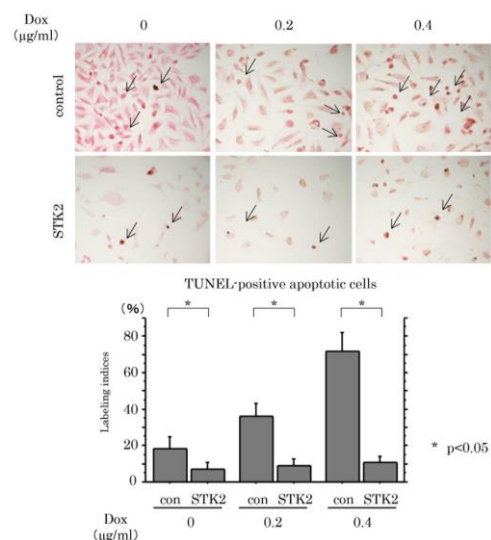
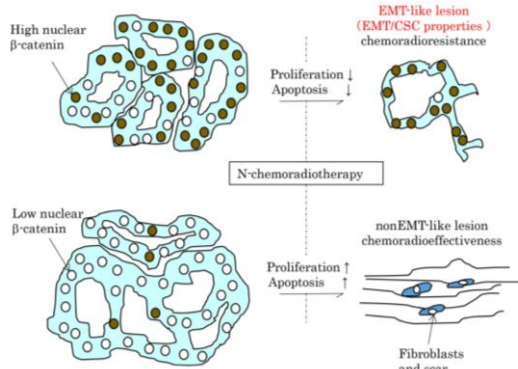


Fig. 5 (A) flow cytometry を用いた細胞周期解析。(B) TUNEL 法。

人体標本および培養細胞の結果はともに、核 β -カテニン陽性癌細胞と EMT/CSC 関連因子との強い関連を示した。核 β -カテニン陽性の EMT/CSC 関連癌細胞では増殖能およびアポトーシスが抑制されており、治療抵抗性とも関連していた。核 β -カテニン陽性によって生じた EMT 部では、CSC 化が高頻度に生じていることが、治療抵抗性の原因である可能性が示唆された。

β -カテニン/EMT 誘導がん幹細胞は NCRT 抵抗性を示し、核 β -カテニン陽性は NCRT 前に効果予測因子となることが示唆された。



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 1 件)

Takahashi H, Nakamura K, Usami A, Tsuruta T, Hashimura M, Matsumoto T, Saegusa M.: Possible role of nuclear β -catenin in resistance to preoperative chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *Histopathology.*, 査読有, 2017;71:227-237. doi: 10.1111/his.13227.

[学会発表] (計 3 件)

① 高橋博之, 橋村美紀, 松本俊英, 三枝信: 進行期直腸胃癌の β -カテニン/EMT 誘導癌幹細胞化による化学・放射線療法の耐性機構の解析. 第106回日本病理学会総会, 2017

② 高橋博之, 宇佐美茜, 千葉理紗子, 橋村美紀, 三枝信: 進行期直腸癌の β -カテニン/EMT 誘導癌幹細胞化による化学・放射線療法の耐性機構の解析. 第105回日本病理学会総会, 2016

③ 高橋博之, 中村貴恵, 鶴田智子, 三枝信: 進行期直腸癌の β -カテニン/EMT 誘導癌幹細胞化による化学・放射線療法の耐

性機構の解析. 第104回日本病理学会総会, 2015

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 博之 (Takahashi, Hiroyuki)
北里大学・医療衛生学部・教授
研究者番号: 60377330

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

三枝 信 (Saegusa, Makoto)
北里大学・医学部・教授
研究者番号: 00265711
橋村 美紀 (Hashimura, Miki)
中村 貴恵 (Nakamura, Kie)
宇佐美 茜 (Usami, Akane)