

令和元年5月28日現在

機関番号：84414

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10140

研究課題名(和文) プロテアソームとオートファジーのクロストークによる癌幹細胞維持機構と治療抵抗性

研究課題名(英文) Proteasome activity and autophagy which relate to cancer stemness and treatment resistance

研究代表者

植村 守 (Uemura, Mamoru)

独立行政法人国立病院機構大阪医療センター(臨床研究センター)・その他部局等・研究員

研究者番号：10528483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：プロテアソーム活性を標識するウィルスベクターを用いて、低プロテアソーム活性下の大腸癌細胞を分離し、この細胞が癌幹細胞性を持つことを明らかにした。

低プロテアソーム活性下細胞が癌幹細胞性を持つにいたった機序を解明するために、低プロテアソーム活性下において発現変化がみられる遺伝子をマイクロアレイ解析によって検索した。その結果、オートファジー関連遺伝子であるAtg9bをはじめ、複数の低酸素関連遺伝子やEID3等が低プロテアソーム活性下の大腸癌細胞において発現が亢進していることが判明した。特に、EID3発現は、大腸癌予後因子となることが分かり、腫瘍増殖や抗癌剤や放射線治療に抵抗性を示す一因となっていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌治療において、癌幹細胞の制御が重要であり、そのためには、癌幹細胞分離や、癌幹細胞の治療抵抗性機序の解明等が重要である。本研究では、癌幹細胞を従来の表面マーカーのみではなく、癌幹細胞の細胞生物学的特徴に着目し癌幹細胞の分離を試みつつ、治療抵抗性や癌幹細胞性付与に関わる因子及び標的遺伝子を解明し、これを制御することにより、癌幹細胞の産出を抑制し癌の根治につながる新たな治療法を創出することを目標とした。

本研究では、低プロテアソーム活性が大腸癌幹細胞性と関連があり、EID3遺伝子が癌幹細胞の治療抵抗性に関連している可能性を示した。今後新たな治療標的と成り得ると思われた。

研究成果の概要(英文)：Low proteasome activity cells (LPACs) had a significantly increased capacity for radioresistance and chemoresistance (5-fluorouracil and oxaliplatin), significantly lower reactive oxygen species activity, and significantly increased sphere formation capacity compared with non-LPACs. The number of cells in the G0-G1 phase was significantly higher among LPACs. Subcutaneous injection of as few as 20 LPACs led to tumor formation in immunologically incompetent mice. Microarray analysis revealed that the expression of EP300-interacting inhibitor of differentiation 3 (EID3) was significantly increased in LPACs. In vitro assay revealed that EID3 positively controlled cell proliferation and treatment resistance. The high expression of EID3 was an adverse prognostic indicator in patients with colorectal cancer (P=0.0400).

研究分野：大腸癌

キーワード：大腸癌 癌幹細胞 低プロテアソーム活性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

癌幹細胞(CSC)は抗癌剤や放射線に対して抵抗性を示し、癌再発の原因となっている。その為、CSCを治療標的とした癌根治が期待されている。大腸癌においてもCSC候補マーカーが同定され、治療戦略が実験レベルで検討されているが、実臨床とは大きな隔たりがある。その原因としては、表面マーカーを用い、造腫瘍性を主な根拠として同定されてきた細胞集団が真のCSCではなく、CSCの真の標的化に繋がり難いという点が挙げられる。これを解決するためには真のCSCの分離や、上皮細胞間葉系細胞移行現象(EMT)のように、非CSCに幹細胞性を付与するような現象の本質を明らかにする必要がある。

### 2. 研究の目的

近年、細胞内タンパク分解機構であるプロテアソームやオートファジーが癌幹細胞(CSC: cancer stem cell)性と関連性を持つことが示唆されてきている。我々は、低プロテアソーム活性(LPA: low proteasome activity)を標識する imaging vector を利用しLPAと大腸癌CSC、さらに治療抵抗との関連を検討する実験を開始しており positive な結果を得られつつある。また、LPAとオートファジーとの関連性については非常に興味深い新規の知見が得られつつある。今後はこれを発展させ、LPA・オートファジー機構による癌幹細胞性維持機構の解明をはじめ、治療抵抗性機序の解明、プロテアソームとオートファジーとのクロストーク機構解明などにより、治療標的分子同定による大腸癌CSCを標的とした治療戦略の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

- ・低プロテアソーム活性を有する大腸癌細胞の分離
- ・低プロテアソーム活性と癌幹細胞性の検討(細胞周期解析、in vivo 造腫瘍性確認)
- ・低プロテアソーム活性癌細胞の治療抵抗性機序の解明
- ・低プロテアソーム活性下に発現が亢進したオートファジー関連遺伝子(ATG)群等の機能解析

### 4. 研究成果

癌幹細胞性との関連性が示唆される特色であるプロテアソーム活性を標識するウィルスベクターを用いて、低プロテアソーム活性下(LPA)の大腸癌細胞を分離することに成功し、この細胞が下記のように癌幹細胞性を持つことを明らかにしてきた。LPA状態の大腸癌細胞は幹細胞性(sphere formation 亢進、低ROS活性、幹細胞マーカーの上昇)を持ち、実臨床でのkey drugであるとなる5-FUとOxaliplatinに対して治療抵抗性を有し、放射線治療に対しても通常癌細胞よりも強い抵抗性を示すことが分かった。また、LPAによる癌幹細胞性維持機構や治療抵抗性メカニズムを探索する目的で、マイクロアレイにより発現遺伝子を網羅的に解析した結果、MMP1やEID3といった遺伝子が複数LAP細胞株にて共通して発現亢進がみられ、in vitro 実験系における遺伝子導入やノックダウンではこれら遺伝子と治療抵抗性との関連性が判明した。また、パスウェイ解析の結果、細胞周期促進関連遺伝子群が抑制されており、dormantな細胞集団(幹細胞性)であることが示唆された。さらに、LPA大腸癌細胞では、複数のオートファジー関連遺伝子(ATG)の発現が亢進していたことから、LPA大腸癌細胞でのオートファジーレベルを確認したところオートファジーが亢進していることが判明し、癌幹細胞性維持機構においてプロテアソームとオートファジーのクロストークが存在し、これらが重要な役割を果たしていることが示唆された。

上記のごとく、複数の遺伝子が低プロテアソーム活性下の大腸癌細胞において発現が亢進していたが、特に、複数の低酸素関連遺伝子や分化抑制に関わるとされる EID3 発現は、大腸癌手術症例において独立した予後因子となることが分かり、細胞実験においても、腫瘍増殖や抗癌剤や放射線治療に抵抗性を示す一因となっていることが判明した。EID3 は治療標的になり得ると考えられるため、今後さらなる検討を加えていく予定である。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 25 件)

1. Takeda T, Haraguchi N, Yamaguchi A, Uemura M, Miyake M, Miyazaki M, Ikeda M, Sekimoto M. Laparoscopic sigmoidectomy in a case of sigmoid colon cancer with situs inversus totalis. *Asian J Endosc Surg*. 2019 Jan;12(1):111-113.
2. Uemura M, Ikeda M, Kawai K, Nishimura J, Takemasa I, Mizushima T, Yamamoto H, Sekimoto M, Doki Y, Mori M. Laparoscopic surgery using a Gigli wire saw for locally recurrent rectal cancer with concomitant intraperitoneal sacrectomy. *Asian J Endosc Surg*. *Asian J Endosc Surg*. 2018 Feb;11(1):83-86. doi: 10.1111/ases.12407.
3. (**correspondence author**) Kawai K, Uemura M, Munakata K, Takahashi H, Haraguchi N, Nishimura J, Hata T, Matsuda C, Ikenaga M, Murata K, Mizushima T, Yamamoto H, Doki Y, Mori M. Fructose-bisphosphate aldolase A is a key regulator of hypoxic adaptation in colorectal cancer cells and involved in treatment resistance and poor prognosis. *Int J Oncol*. 2017 Feb;50(2):525-534. doi: 10.3892/ijo.2016.3814.
4. Takeyama H, Mizushima T, Uemura M, Haraguchi N, Nishimura J, Hata T, Matsuda C, Takemasa I, Ikenaga M, Murata K, Yamamoto H, Doki Y, Mori M. Adipose-Derived Stem Cells Ameliorate Experimental Murine Colitis via TSP-1-Dependent Activation of Latent TGF- $\beta$ . *Dig Dis Sci*. 2017 Aug;62(8):1963-1974.
5. (**co-first author and correspondence author**) Munakata K, Uemura M, Tanaka S, Kawai K, Kitahara T, Miyo M, Kano Y, Nishikawa S, Fukusumi T, Takahashi Y, Hata T, Nishimura J, Takemasa I, Mizushima T, Ikenaga M, Kato T, Murata K, Carethers JM, Yamamoto H, Doki Y, Mori M. Cancer Stem-like Properties in Colorectal Cancer Cells with Low Proteasome Activity. *Clin Cancer Res*. 2016 Nov 1;22(21):5277-5286.
6. Uemura M, Kim HM, Ikeda M, Nishimura J, Hata T, Takemasa I, Mizushima T, Yamamoto H, Doki Y, Mori M. Long-term outcome of adrenalectomy for metastasis resulting from colorectal cancer with other metastatic sites: A report of 3 cases. *Oncol Lett*. 2016 Sep;12(3):1649-1654.
7. Mokutani Y, Uemura M, Munakata K, Okuzaki D, Haraguchi N, Takahashi H, Nishimura J, Hata T, Murata K, Takemasa I, Mizushima T, Doki Y, Mori M, Yamamoto H. Down-Regulation of microRNA-132 is Associated with Poor Prognosis of Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2016 Dec;23(Suppl 5):599-608.
8. Nishimura J, Hasegawa J, Ogawa Y, Miwa H, Uemura M, Haraguchi N, Hata T, Yamamoto H, Takemasa I, Mizushima T, Nezu R, Doki Y, Mori M.  $^{18}\text{F}$ -Fluorodeoxyglucose positron emission tomography ( $^{18}\text{F}$ -FDG PET) for the early detection of response to neoadjuvant chemotherapy for locally advanced rectal cancer. *Surg Today*. 2016 Oct;46(10):1152-8. doi: 10.1007/s00595-015-1297-x.
9. Takahashi H, Suzuki Y, Nishimura J, Haraguchi N, Ohtsuka M, Miyazaki S, Uemura M, Hata T,

- Takemasa I, Mizushima T, Yamamoto H, Doki Y, Mori M. Characteristics of carbonic anhydrase 9 expressing cells in human intestinal crypt base. *Int J Oncol.* 2016 Jan;48(1):115-22.
10. Uemura M, Kim HM, Hata T, Sakata K, Okuyama M, Takemoto H, Fujii H, Fukuzaki T, Morita T, Hata T, Takemasa I, Satoh T, Mizushima T, Doki Y, Mori M. First-line cetuximab-based chemotherapies for patients with advanced or metastatic *KRAS* wild-type colorectal cancer. *Mol Clin Oncol.* 2016 Aug;5(2):375-379.
  11. Fukuda Y, Yamamoto K, Hirao M, Nishikawa K, Nagatsuma Y, Nakayama T, Tanikawa S, Maeda S, Uemura M, Miyake M, Hama N, Miyamoto A, Ikeda M, Nakamori S, Sekimoto M, Fujitani K, Tsujinaka T. Sarcopenia is associated with severe postoperative complications in elderly gastric cancer patients undergoing gastrectomy. *Gastric Cancer.* 2016 Jul;19(3):986-93.
  12. Tamai K, Takemasa I, Uemura M, Nishimura J, Hata T, Higashihara H, Osuga K, Mizushima T, Yamamoto H, Doki Y, Mori M. Single-site laparoscopic colectomy for rectosigmoid cancer with middle aortic syndrome: report of a case. *Surg Case Rep.* 2015;1(1):53. doi: 10.1186/s40792-015-0050-4.
  13. Mizushima T, Takahashi H, Takeyama H, Naito A, Haraguchi N, Uemura M, Nishimura J, Hata T, Takemasa I, Yamamoto H, Doki Y, Mori M. A clinical trial of autologous adipose-derived regenerative cell transplantation for a postoperative enterocutaneous fistula. *Surg Today.* 2015 Sep 5. [Epub ahead of print]
  14. Mokutani Y, Yamamoto H, Uemura M, Haraguchi N, Takahashi H, Nishimura J, Hata T, Takemasa I, Mizushima T, Doki Y, Mori M. Effect of particle beam radiotherapy on locally recurrent rectal cancer: Three case reports. *Mol Clin Oncol.* 2015 Jul;3(4):765-769.
  15. Nonaka R, Miyake Y, Hata T, Kagawa Y, Kato T, Osawa H, Nishimura J, Ikenaga M, Murata K, Uemura M, Okuzaki D, Takemasa I, Mizushima T, Yamamoto H, Doki Y, Mori M. Circulating miR-103 and miR-720 as novel serum biomarkers for patients with colorectal cancer. *Int J Oncol.* 2015 Sep;47(3):1097-102. doi: 10.3892/ijo.2015.3064.
  16. Takeyama H, Mizushima T, Iijima H, Shinzaki S, Uemura M, Nishimura J, Hata T, Takemasa I, Yamamoto H, Doki Y, Mori M. Platelet Activation Markers Are Associated with Crohn's Disease Activity in Patients with Low C-Reactive Protein. *Dig Dis Sci.* 2015 Nov;60(11):3418-23. doi: 10.1007/s10620-015-3745-2.
  17. (**co-first author**) Matsuda C, Uemura M, Nakata K, Shingai T, Nishimura J, Hata T, Ikenaga M, Takemasa I, Mizushima T, Kato T, Ikeda M, Ohue M, Murata K, Hasegawa J, Satoh T, Yamamoto H, Sekimoto M, Nezu R, Doki Y, Mori M. Randomized phase II study of S-1 dosing schedule for resected colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2015 Jun 3;15:452. doi: 10.1186/s12885-015-1476-6.
  18. Nishimura J, Satoh T, Fukunaga M, Takemoto H, Nakata K, Ide Y, Fukuzaki T, Kudo T, Miyake Y, Yasui M, Morita S, Sakai D, Uemura M, Hata T, Takemasa I, Mizushima T, Ohno Y, Yamamoto H, Sekimoto M, Nezu R, Doki Y, Mori M; Multi-center Clinical Study Group of **Osaka**, Colorectal Cancer Treatment Group (MCSGO). Combination antiemetic therapy with aprepitant/fosaprepitant in patients with colorectal cancer receiving oxaliplatin-based chemotherapy (SENRI trial): a multicentre, randomised, controlled phase 3 trial. *Eur J Cancer.* 2015 Jul;51(10):1274-82. doi: 10.1016/j.ejca.2015.03.024.

19. (**correspondence author**) Munakata K, Uemura M, Shimizu J, Miyake M, Hata T, Ikeda K, Dono K, Kitada M, Doki Y, Mori M. Gasless transumbilical laparoscopic-assisted appendectomy as a safe and cost-effective alternative surgical procedure for mild acute appendicitis. *Surg Today*. 2016 Mar;46(3):319-25. doi: 10.1007/s00595-015-1177-4.
20. (**correspondence author**) Ogawa H, Uemura M, Nishimura J, Hata T, Ikenaga M, Takemasa I, Mizushima T, Ikeda M, Sekimoto M, Yamamoto H, Doki Y, Mori M. Preoperative Chemoradiation Followed by Extensive Pelvic Surgery Improved the Outcome of Posterior Invasive Locally Recurrent Rectal Cancer without Deteriorating Surgical Morbidities: A Retrospective, Single-Institution Analysis. *Ann Surg Oncol*. 2015 Dec;22(13):4325-34. doi: 10.1245/s10434-015-4452-0.
21. Hiraki M, Nishimura J, Takahashi H, Wu X, Takahashi Y, Miyo M, Nishida N, Uemura M, Hata T, Takemasa I, Mizushima T, Soh JW, Doki Y, Mori M, Yamamoto H. Concurrent Targeting of KRAS and AKT by MiR-4689 Is a Novel Treatment Against Mutant KRAS Colorectal Cancer. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2015 Mar 10;4:e231. doi: 10.1038/mtna.2015.5.
22. Mizushima T, Nakajima K, Takeyama H, Naito A, Osawa H, Uemura M, Nishimura J, Hata T, Takemasa I, Yamamoto H, Doki Y, Mori M. Single-incision laparoscopic surgery for stricturing and penetrating Crohn's disease. *Surg Today*. 2016 Feb;46(2):203-8. doi: 10.1007/s00595-015-1145-z..
23. Takeyama H, Yamamoto H, Hata T, Takahashi Y, Ohtsuka M, Nonaka R, Inoue A, Naito A, Matsumura T, Uemura M, Nishimura J, Takemasa I, Mizushima T, Doki Y, Mori M. A novel single-stapling technique for colorectal anastomosis: a pre-ligation single-stapling technique (L-SST) in a porcine model. *Surg Endosc*. 2015 Aug;29(8):2371-6. doi: 10.1007/s00464-014-3960-5.
24. Inoue A, Yamamoto H, Uemura M, Nishimura J, Hata T, Takemasa I, Ikenaga M, Ikeda M, Murata K, Mizushima T, Doki Y, Mori M. MicroRNA-29b is a Novel Prognostic Marker in Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2015 Dec;22 Suppl 3:1410-8. doi: 10.1245/s10434-014-4255-8.
25. Miyazaki S, Yamamoto H, Miyoshi N, Wu X, Ogawa H, Uemura M, Nishimura J, Hata T, Takemasa I, Mizushima T, Konno M, Doki Y, Mori M, Ishii H. A Cancer Reprogramming Method Using MicroRNAs as a Novel Therapeutic Approach against Colon Cancer : Research for Reprogramming of Cancer Cells by MicroRNAs. *Ann Surg Oncol*. 2015 Dec;22 Suppl 3:1394-401. doi: 10.1245/s10434-014-4217-1.

〔学会発表〕(計 17 件)

〔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：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：水島 恒和  
ローマ字氏名：Mizushima Tsunekazu  
所属研究機関名：大阪大学・医学系研究科  
部局名：炎症性腸疾患治療学寄付講座  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：00527707

研究分担者氏名：河合 賢二  
ローマ字氏名：Kawai Kenji  
所属研究機関名：大阪大学・医学系研究科  
部局名：消化器外科  
職名：特任助教  
研究者番号（8桁）：10717599

研究分担者氏名：波多 豪  
ローマ字氏名：Hata Tsuyoshi  
所属研究機関名：大阪大学・医学系研究科  
部局名：消化器外科  
職名：医員  
研究者番号（8桁）：80749747

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。