

令和元年6月11日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04701

研究課題名(和文)人工ヒトがん幹細胞の合成致死性を指標とするがん根治療法の開発

研究課題名(英文) Development of eradicated cancer treatment based on synthetic lethality of induced cancer stem cells

研究代表者

清野 透 (KIYONO, Tohru)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：10186356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：正常ヒト上皮細胞に種々のがん遺伝子セットを導入し、膵がん、肺腺がん、卵巣がんなどの誘導型人工がん幹細胞モデルを作出した。HPV16 E6E7、MYCと変異KRASをヒト正常上皮細胞に導入すると強い造腫瘍性細胞が誘導されたが、この細胞からHPV16 E6E7とMYCの発現を止めると細胞死が誘導され造腫瘍性は消失した。KRASに変異を持つ肺腺がん細胞株や膵がん細胞株に対しドミナントネガティブに働くMYC(OmoMYC)を発現誘導させる空胞化を伴う細胞死を誘導できる事を確認した。すなわち変異RASを有するがんではMYCの活性を抑制することで合成致死がもたらされる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RASは全がんの30%で活性型変異が見つかるが、RASを標的とした分子標的薬はいまだに開発されていない。また、変異RASの遺伝子増幅ががんの浸潤転移を促進し変異RASの発現量の増加ががんの増悪にかかわっている。RASに変異を持つがんではMYCの高発現によりその造腫瘍性を支えておりMYC発現の低い細胞に変異RASを発現させると過剰なマクロピノサイトーシスによる細胞死がもたらされることを示した。変異RASを持つがん、特に悪性度の高い変異RASを高発現するがんではMYCの機能を抑えることで合成致死をもたらし治療が有効であることが明らかになり、RASに変異のあるがんに対する治療戦略を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：By conditionally expressing a set of oncogenes in normal human epithelial cells, we established induced cancer stem cells as models of human cancers including pancreatic cancer and lung adenocarcinoma. Conditional expression of HPV16 E6E7, MYC and activated KRAS conferred highly tumorigenic potential to normal human epithelial cells, but halting expression of HPV16 E6E7 and MYC in the cells resulted in massive macro-pinocytotic cell death and loss of tumorigenicity. By conditional expression of a dominant-negative form of MYC (OmoMYC) in human cancer cell lines with mutant KRAS, including pancreatic cancer and lung adenocarcinoma, resulted in macropinocytotic cell death. The results suggest suppression of MYC can induce synthetic lethality to human cancer cells with active mutation of RAS family genes.

研究分野：ウイルス腫瘍学

キーワード：がん幹細胞 合成致死 RAS マクロピノサイトーシス MYC

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、ヒト細胞のがん化機構の研究材料としてふさわしいヒト上皮培養細胞が、TERT 発現に加えて pRb/p16 経路の不活化により不死化できることを世界で初めて示した (Kiyono et al, Nature 1998)。この論文は発表以来これまでに 850 回以上引用され、多くのヒト正常細胞を用いたがん研究に応用されている。Weinberg らは TERT, SV40 初期遺伝子, 活性型 Ras の 3 つをヒト正常乳腺上皮細胞に導入してその不死化とがん化に成功し、その性状を解析した (Ince et al., Cancer Cell. 2007)。申請者らは、ヒト正常子宮頸部上皮細胞にわずか 4 個のがん遺伝子 (HPV16 E6, E7, 活性型 RAS, MYC) を導入するだけで、造腫瘍性の極めて強い Tumor Initiating Cell (TIC) を誘導できることを明らかにした (Cancer Res. 2008)。TIC とがん幹細胞 (CSC) の生物学的性格はほぼ同じであることから、ここでは遺伝子導入により誘導された TIC を iPS 細胞にちなんで、iCSC (人工がん幹細胞) と呼ぶことにする。さらに、HPV 遺伝子を用いず、上皮性卵巣がん (Carcinogenesis 2009)、舌がん (Am J Cancer Res. 2011)、膵がん (Carcinogenesis 2014) の iCSC 作製にも成功している。

Weinberg らは、がんの根治における CSC を標的とした治療の重要性を周知すると共に (Guspa et al, Nat Med. 2009 for review)、自ら SV40 初期遺伝子などの導入により樹立した乳腺上皮細胞に、さらに EMT を誘導した非常に人工的な iCSC を用いても、種々のがん CSC 特異的に毒性を示す薬剤 (salinomycin) を同定できることを示した (Gupta et al. Cell 2009)。

申請者らは、上記の 4 因子 (HPV16 E6, E7, 活性型 RAS, MYC) 導入による iCSC 誘導を進展させ、単一のレンチウイルスベクターによる速やかな 4 因子導入と、"tetOFF" システムによりドキシサイクリン依存性に 4 因子の発現調節を行えるよう改良した。このベクターを用い 4 因子をヒト正常膵管上皮細胞に発現させると、ヒト膵がん様組織像を示す腫瘍を速やかに形成した。興味深いことには、ドキシサイクリン投与により退縮した膵がん様腫瘍の退縮後の組織を詳細に検索すると、単層円柱上皮からなる正常膵管様管腔構造が多数見られた。さらに、4 因子の発現をドキシサイクリン除去により再誘導すると正常膵管様構造から PanIN (Pancreatic Intraepithelial Neoplasia) 様組織像を経て再び膵がん様組織像をもつ腫瘍を形成した (Carcinogenesis 2014)。

根治を目指す抗がん剤の開発には、合成致死性に基づく oncogene addiction を利用することが有用である (Kaelin, Nat Rev Cancer 2005)。RNAi 技術を用いた合成致死スクリーニング法は極めて有効な方法であるが、大きな 2 つの問題がその可能性を制限してきた。第 1 に、がん細胞株には数多くの変異があり合成致死をもたらす変異の特定が困難なこと、第 2 に酵母などと異なり対照となる isogenic な正常培養細胞株を得ることが困難なことである。正常細胞と CSC の状態をドキシサイクリンのみで制御できる "可逆性 iCSC" はこれら 2 つの問題を払拭する理想的な細胞である。

RAS の変異は全がんの約 1/3 で変異が見つかるが、RAS 自身の阻害剤開発は困難なため合成致死にもとづく薬剤の開発が必要である。さらに、RAS 変異は膵がんなどでは多段階発がんの初期に起きるため PanIN などの前がん病変も標的とすれば、がん予防をも可能となる。申請者らは、ヒト正常子宮頸部上皮細胞に活性型 RAS 単独を発現させると、空胞化を伴う細胞死が誘導されることを見出し注目していた (Cancer Res 2008)。この細胞死は HPV16 E6, E7 で抑制できないが、MYC により抑制され腫瘍原性が亢進する (Carcinogenesis 2012)。類似の細胞死は glioblastoma 細胞でも非アポトーシス性細胞死として報告されており (Chi et al., Oncogene, 1999)、その本態は過剰な macropinocytosis による細胞死として methuosis と名付けられ (Ovenmeyer et al, Mol Cancer Res, 2008)。その後、methuosis を誘導する低分子化合物 (MOMIPP, Vaquinol-1) も報告された (Ovenmeyer et al, Mol Cancer, 2011; Kitambi et al. Cell, 2014)。一方、活性型 RAS は ROS 産生を介して 8-oxo-guanine を蓄積させるが、同時に 8-oxo-dGTPase である MTH1 の発現を増加させることにより DNA 傷害を防いでいる (Rai et al., PNAS 2009, Oncogene 2011)。MTH1 の阻害剤は RAS 変異を持つがん細胞の増殖を特異的に抑制することが示された (Huber et al., Nature 2014; Gad et al., Nature, 2014)。このような低分子化合物は、RAS に変異を持つ CSC だけでなく前がん病変の pre-CSC に合成致死をもたらす可能性のある有望な候補であると考えている。

2. 研究の目的

がん幹細胞(CSC: Cancer Stem Cell)の根絶ががんの根治に繋がるのと同様に、前がん病変の幹細胞(pre-CSC)を根絶すれば、がんは予防できる。このような予防・治療法の開発には、正常幹細胞には毒性がなく、CSC や pre-CSC における遺伝子異常を背景にして特異的に合成致死をもたらす薬剤や遺伝子のスクリーニング系の確立が必要である。申請者らは自らの先行基盤(B)研究において、ヒト初代正常膵管上皮培養細胞に4つのがん遺伝子発現を誘導したときに限りがん幹細胞の性質を獲得し、かつがん遺伝子発現の遮断により正常細胞への可逆性をもつ人工CSC(iCSC)の樹立に成功した。本研究では、この独自技術による可逆性 pre-iCSC, iCSC の作成と、これらに合成致死をもたらす薬剤の評価並びに標的遺伝子や新規薬剤のスクリーニングへの利用を提案し、その有効性を実証する。並行して実際の前がん～がん病変検体から分離・培養した pre-CSC, CSC を用いることで pre-iCSC, iCSC を用いたスクリーニング系の担保とし補完させる。

3. 研究の方法

1. KRAS 変異をもつ膵がんと前がん病変である PanIN のモデルとなる可逆性 iCSC と、pre-iCSC を樹立する。変異 KRAS、EGFR, BRAF の他、RET-, ALK-, ROS-融合遺伝子などをもつ末梢性肺腺がんのモデルとなる可逆性 iCSC、pre-iCSC を樹立する。
2. MYC や MTH1 の発現低下や活性阻害などにより、活性型 KRAS 発現時にのみ methuosis や DNA 傷害による合成致死が誘導されることを確認する。
3. shRNA ライブラリーまたは CRISPR/Cas sgRNA ライブラリーなどにより、活性型 KRAS 発現時にのみ合成致死を誘導する標的遺伝子の検索を進める。逆に活性型 KRAS 発現時による methuosis を抑制する遺伝子を検索し、その分子経路を明らかにする。

ドライバースクリーニングによる合成致死をもたらす標的遺伝子の異動を検討する。

4. 研究成果

TERT のみを導入したヒト BASC 候補細胞に ALK-, RET-, ROS-融合遺伝子の他、変異 AKT をドキシサイクリンで発現誘導できるレトロウイルスベクターで導入し、TRU-type 肺腺がんの前がん細胞の樹立を試みた。しかし、これらの細胞にドキシサイクリンで導入遺伝子の発現を誘導すると、細胞増殖が低下し、ヒト BASC 候補細胞のマーカーである p63/TTF-1 共陽性細胞から p63 単独陽性細胞に変化した。そのため、TRU-type 肺腺がんのモデル細胞にはならないと判断し、変異 CDK4, cyclin D1, TERT で不死化したヒト BASC 候補細胞と同じレトロウイルスベクターを用いてこれらの融合遺伝子の発現を試みた。樹立された細胞は不死化前と同様 TTF1/p63 共陽性細胞でありヒト BASC 候補細胞の性質を維持していることを確認した。また、ドキシサイクリン添加により各融合遺伝子の発現誘導も Western ブロットニングにより確認した。TRU-type 肺腺がんの前がん病変細胞をコンディショナルに誘導できる細胞が樹立できたと考えている。

正常ヒト上皮細胞にコンディショナルにがん遺伝子セットを発現させることにより、膵がん、肺腺がん、卵巣がんなどの誘導型人工がん幹細胞モデルを作出した。HPV16 E6E7、MYC と変異 KRAS をヒト正常上皮細胞に導入すると強い造腫瘍性細胞が誘導されたが、この細胞から HPV16 E6E7 と MYC の発現を止めると細胞死が誘導され造腫瘍性は消失した。一方、KRAS に変異を持つ肺腺がん細胞株 A549 や膵がん細胞株 AsPC1 に対しドミナントネガティブに働く MYC(OmoMYC)を発現誘導させることによりマクロピノソームの蓄積を伴う細胞死を誘導できることを確認した。また、がん細胞で発現している変異 KRAS を shRNA でノックダウンするとマクロピノソームの蓄積や細胞死は誘導されなくなったことから、細胞死誘導はがん細胞で発現している変異 KRAS に依存していることが示された。すなわち変異 RAS を有するがんでは MYC の活性を抑制することで合成致死がもたらされる可能性が示された。

種々の人工肺腺がん幹細胞を樹立したが、研究協力者が出向あるいは産休に入るなど予定していた Cas9/gRNA による合成致死 screening による新たな標的遺伝子の同定には至らなかった。一方肺腺がんの細胞株化は 30%程度しか成功していないのに対し、並行して進めていた上皮性卵巣がんの細胞株化はほぼ 95%と非常に高率にかつ短期間に樹立できることが分かった。また、それらの Xenograft も元の腫瘍組織像を忠実に反映することが確認できた。人工卵巣がん細胞モデルは既に作成していたため、卵巣がんでの研究を進めた。High-grade 漿液性腺がん(HGSC)は以前から Xenograft モデルが多くあるが、類内膜腺がん、明細胞がん、粘液性腺がんについては Xenograft モデルが少なく、我々の手でも半数以下が Xenograft 腫瘍を形成した。特に粘液性腺がんは試した3例とも Xenograft 腫瘍を形成できなかった。そこで、HPV16 E6E7, MYC, 活性型 KRAS(EMR と呼ぶ)をテトラサイクリン誘導系ベクターで導入し、強制的に Xenograft 腫瘍を形成させる方法を試みた。その結果、マウス皮下での腫瘍原性がなかった3株全てから短期間に腫瘍を形成させることに成功した。これらの腫瘍は病理学的に元の腫瘍とは明らかに異なり未分化腺がん

となったが、腫瘍形成後に EMR 遺伝子の発現を止めると、腫瘍はやや退縮したが残存腫瘍の組織像を調べると元の患者腫瘍の組織像を忠実に再現できていることが分かった。また、新たに樹立した 18 株の卵巣がん細胞株のうち明細胞がん由来の 7 株の内 4 株、類内膜腺がん由来の 2 株の全て、粘液性腺がん由来の 4 株の内 1 株で ARID1A が陰性であることが分かった。これらの細胞株に対して通常培地の添加物として用いられる増殖因子や阻害剤への増殖依存性を調べた。ARID1A 陰性の細胞株に対して特異的に compound X が強く増殖抑制することを見出した。これまで異なるドライバーがん遺伝子により作成した人工がん幹細胞ならびに患者由来の新規がん細胞株を用いて Cas9/gRNA による合成致死 screening による標的遺伝子の探索を進めたい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. Sekine A., Kiyono, T., Ryo E., Ogawa, R., Wakai, S., Ichikawa H., Suzuki K., Arai S., Tsuta K., Ishida M., Sasajima Y., Goshima N., Yamazaki N., Mori, T. Recurrent YAP1-MAML2 and YAP1-NUTM1 fusions in poroma and porocarcinoma. Journal of Clinical Investigation. 2019, in press.
2. Nakamura K, Nakayama K, Ishikawa N, Ishikawa M, Sultana R, Kiyono T., and Kyo S: Reconstitution of high-grade serous ovarian carcinoma from primary fallopian tube secretory epithelial cells. Oncotarget. 9: 12609-12619 2018.
3. Yoshida M, Taguchi A, Kawana K, Ogishima J, Adachi K, Kawata A, Nakamura H, Sato M, Fujimoto A, Inoue T, Tomio K, Mori M, Nagamatsu T, Arimoto T, Koga K, Hiraike O W, Oda K, Kiyono T., Osuga Y, and Fujii T: Intraperitoneal neutrophils activated by KRAS-induced ovarian cancer exert antitumor effects by modulating adaptive immunity. Int J Oncol. 53: 1580-1590 2018.
4. OEndo K, Yugawa T, Nakahara T., Ohno S I, Goshima N, Arakawa H, and Kiyono T.: Induction of non-apoptotic programmed cell death by oncogenic RAS in human epithelial cells and its suppression by MYC overexpression. Carcinogenesis. 39: 202-213 2018.
5. Yoshimatsu Y, Nakahara T, Tanaka K, Inagawa Y, Narisawa-Saito M, Yugawa T, Ohno S I, Fujita M, Nakagama H, and Kiyono T.: Roles of the PDZ-binding motif of HPV 16 E6 protein in oncogenic transformation of human cervical keratinocytes. Cancer Sci. 108: 1303-1309 2017.
6. Yokoi A, Yoshioka Y, Yamamoto Y, Ishikawa M, Ikeda S I, Kato T, Kiyono T., Takeshita F, Kajiyama H, Kikkawa F, and Ochiya T: Malignant extracellular vesicles carrying MMP1 mRNA facilitate peritoneal dissemination in ovarian cancer. Nature communications. 8: 14470 2017.
7. Yamamoto E, Niimi K, Kiyono T., Yamamoto T, Nishino K, Nakamura K, Kotani T, Kajiyama H, Shibata K, and Kikkawa F: Establishment and characterization of cell lines derived from complete hydatidiform mole. Int J Mol Med. 40: 614-622 2017.
8. Noguchi K, Wakai K, Kiyono T., Kawabe M, Yoshikawa K, Hashimoto-Tamaoki T, Kishimoto H, and Nakano Y: Molecular analysis of keratocystic odontogenic tumor cell lines derived from sporadic and basal cell nevus syndrome patients. Int J Oncol. 51: 1731-1738 2017.
9. Kayama K, Watanabe S, Takafuji T, Tsuji T, Hironaka K, Matsumoto M, Nakayama K I,

Enari M, Kohno T, Shiraishi K, Kiyono T, Yoshida K, Sugimoto N, and Fujita M: GRWD1 negatively regulates p53 via the RPL11-MDM2 pathway and promotes tumorigenesis. EMBO reports. 18: 123-137 2017.

10. Hashimoto H, Suda Y, Miyashita T, Ochiai A, Tsuboi M, Masutomi K, Kiyono T, and Ishii G: A novel method to generate single-cell-derived cancer-associated fibroblast clones. J Cancer Res Clin Oncol. 143: 1409-1419 2017.
11. Fuchigami T, Koyama H, Kishida M, Nishizawa Y, Iijima M, Kibe T, Ueda M, Kiyono T, Maniwa Y, Nakamura N, and Kishida S: Fibroblasts promote the collective invasion of ameloblastoma tumor cells in a 3D coculture model. FEBS Open Bio. 7: 2000-2007 2017

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 清野透 新規プログラム細胞死メカニズムによるがん抑制機構 北海道大学遺伝子病制御研究所「感染、免疫、がん、炎症」研究集会 2018
2. Ghani F.I., Yugawa T., Nakahara T., Yoshimatsu Yuki, Takahashi K., Kohno T., Watanabe R., Yoshida H., Yoshida M., Ishikawa M., Kato T. and Kiyono T. An ex-vivo culture system of ovarian cancer retains the pathological features of primary tumors faithfully 日本癌学会総会 2018
3. Ghani F.I., Dendo, K., Yoshimatsu Yuki, Takahashi K., Kohno T., Watanabe R., Yoshida H., Yoshida M., Ishikawa M., Kato T. and Kiyono T. An efficient method to establish ovarian cancer cell lines recapitulating features of primary tumors 第 2 回がん三次元培養研究会 2018 年 11 月 27 日
4. Dendo K, Yugawa T, Nakahara T, Ohno SI, Goshima N, Arakawa H, Kiyono T. Induction of Macropinocytic Cell Death by Oncogenic RAS in Human Epithelial Cells and Its Suppression by MYC Overexpression 分子生物学会年会 2017
5. Ghani F.I., Yugawa T., Nakahara T., Takahashi K., Kohno T., Yoshida H., Yoshida M., Ishikawa M., Kato T., and Kiyono T. A novel primary culture condition for modeling human ovarian cancer 第 1 回がん三次元培養研究会 2017 年 12 月 11 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 2 件)

名称：不死化ヒト気道上皮細胞の製造方法、当該方法により得られる不死化ヒト気道上皮細胞及び当該不死化ヒト気道上皮細胞を備える、ウイルス分離又はウイルス抑制剤スクリーニング用キット

発明者：山谷睦雄、西村秀一、清野 透

権利者：国立大学法人東北大学

種類：特許権

番号：特願 2018-60860

出願年：平成 29 年 3 月 28 日

国内外の別：国内

名称：機能的肝前駆細胞または機能的肝細胞を調製する方法

発明者：梅澤 明弘、清野 透

権利者：国立研究開発法人国立成育医療研究センター、国立研究開発法人国立がん研究センター

種類：特許権

番号：特願 2018-60860

出願年：平成 29 年 12 月 27 日
国内外の別：国内外

6 . 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
研究協力者氏名：田頭香澄美
ローマ字氏名： DENDO Kasimi

研究協力者氏名：Farhana Ishrat Ghani
ローマ字氏名：Farhana Ishrat GHANI

研究協力者氏名：温川 恭至
ローマ字氏名：YUGAWA Takashi

研究協力者氏名：中原 知美
ローマ字氏名：NAKAHARA Tomomi

研究協力者氏名：山田健二
ローマ字氏名：YAMADA Kenji

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。