

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06899

研究課題名(和文) 大腸癌幹細胞と上皮間葉転換大腸癌細胞に共通する抗癌剤治療抵抗性メカニズムの解明

研究課題名(英文) The mechanism of chemotherapy resistance in colon cancer stem cells and epithelial mesenchymal transition colon cancer cells

研究代表者

松原 淳一 (Matsubara, Junichi)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：40782371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト大腸癌組織を免疫不全マウスに移植して作成した移植片腫瘍モデルを新たに作成し、大腸癌治療の臨床における標準治療薬の一つであるイリノテカンを用いた抗癌剤治療を行った。治療後、腫瘍を摘出し、FACS (fluorescence activated cell sorting) を用いて癌幹細胞と非癌幹細胞を分離回収する作業を行った。治療前後における遺伝子発現解析を行い、申請者が以前に行った研究で同定した大腸癌の抗癌剤治療抵抗性に関わる遺伝子E2F4に関連し、その下流標的であるCDKN3という遺伝子が新たに治療抵抗性メカニズムに関連していることを示唆する結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：We developed patient-derived xenograft tumor models from clinical samples of colon cancer patients. We did in vivo chemotherapy experiments using the PDX models treated with irinotecan which is one of the standard chemotherapy drugs in clinical practice of colon cancer treatment. Cancer stem cells were sorted by FACS (fluorescence activated cell sorting) and transcriptomic analysis of the sorted cells was subsequently done. Then, we have identified CDKN3 as a new mechanism of chemotherapy resistance in colon cancer cells. CDKN3 is one of the downstream targets of transcription factor E2F4 which I previously reported as a key transcription factor in the mechanism of chemotherapy resistance.

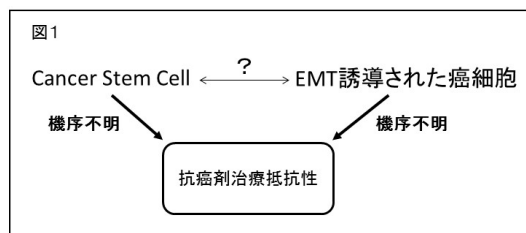
研究分野：消化器癌の化学療法

キーワード：がん幹細胞 大腸癌 上皮間葉形質転換 抗癌剤 治療抵抗性

## 1. 研究開始当初の背景

我が国において大腸癌は罹患数・死亡数とも過去 50 年にわたり増加し続けており、2014 年には死亡数は 4 万 8 千人を超え、肺癌に続き第 2 位となった(厚生労働省人口動態統計)。根治が期待できる唯一の治療法は外科的切除術である。しかしながら、約 25% の症例で診断時に既に遠隔転移をきたしており、外科的切除後に転移再発する症例(約 25%)を合わせると、全体の 50%以上の症例(切除不能大腸癌)では、完治は難しく延命を主目的とした抗癌剤による全身化学療法が行われる。大腸癌に対しては過去 20 年の間に有用な新規抗癌剤が次々と臨床導入されたが、依然として切除不能大腸癌の予後は極めて不良で、5 年生存率はわずか 10%程度である。したがって、大腸癌に対する有効な化学療法の開発は急務である。そのためには、新規薬剤開発をすすめるとともに既存の薬剤に対する耐性メカニズムの解明が治療成績の向上に非常に重要である。

これまでに報告されている大腸癌の治療抵抗性メカニズムはいくつかあるが、中でも、癌幹細胞(Cancer Stem Cell)は重要な役割を果たしていると考えられている。固形腫瘍の Cancer Stem Cell は、Stanford 大学の Michael Clarke らにより乳癌で初めて提唱されて以来、多くの癌で報告されるようになった。大腸癌ではこれまでに CD133(+)細胞および CD44(+)CD166(+)EpCAM<sup>high</sup> 細胞が Cancer Stem Cell として報告された。しかしながら、抗癌剤治療抵抗性における Cancer Stem Cell の役割およびそのメカニズムについてはいまだ明らかではない(図 1)。



もう一つの有力な抗癌剤治療抵抗性メカニズムとして、上皮-間葉転換(Epithelial-mesenchymal transition: EMT)が最近新たに報告された。しかしながら、EMT と抗癌剤治療抵抗性に関しても、やはりその詳しい分子生物学的メカニズムは不明である(図 1)。

Cancer Stem Cell と EMT に関しては、これまでに互いの関連性を示唆する報告がなされている。乳癌では EMT 誘導した乳腺細胞が Stem Cell と同じ性質を獲得すると報告され、乳癌でも同様の結果が報告された。膵癌でも Cancer Stem Cell と EMT 誘導し

た癌細胞は互いに分子生物学的な形質が似ていると報告されている。しかしながら、実際に治療抵抗性において重要な役割を果たすタンパクについての報告はほとんど無く、両者の遺伝子発現およびタンパク発現を具体的に比較検討した報告も無い。したがって、Cancer Stem Cell と EMT 誘導された癌細胞が同じものか否かは現在のところ不明である(図 1)。この 2 つの有力な薬物耐性機序を分子生物学的に明らかにすることで、抗癌剤治療抵抗性の克服、さらには新規治療法の開発につながる可能性が期待できる。

申請者はこれまで、消化器癌症例の血液検体を用いた高精度のプロテオミクス解析により、癌治療成績向上のためのバイオマーカー開発を行ってきた。その結果、膵癌症例におけるゲムシタピン治療の副作用を事前に予測する血液バイオマーカーや、予後を予測するマーカー、および膵癌・大腸癌を早期に発見するためのマーカーなど、プロテオミクス解析による数多くの成果を報告してきた。本研究では、プロテオミクス解析により、大腸癌の Cancer Stem Cell および EMT 誘導癌細胞の治療抵抗性メカニズムに関わるタンパクの同定を行うが、この手法を用いて Cancer Stem Cell および EMT 誘導癌細胞のタンパク発現解析および機能解析を行った研究は過去に報告が無く、新規性が高い。また、申請者は平成 23 年から 4 年半の間、前述の Stanford 大学 Michael Clarke 教授の研究室に博士研究員として留学し、大腸癌幹細胞の幹細胞性にかかわる分子生物学的メカニズムについて研究を行ってきた。Cancer Stem Cell 研究の先駆者からの指導を受け、Stem Cell 研究が活発に行われている研究室での申請者自身の経験が、本研究の遂行に有利に働くことは明らかである。以上のような申請者のこれまでの研究成果および消化器癌治療の臨床経験から、抗癌剤治療抵抗性メカニズムを Cancer Stem Cell とプロテオミクス分野からのアプローチで明らかにしていく、という着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、申請者がこれまで培ってきた Cancer Stem Cell 研究とプロテオミクス研究に関する多くの知識と経験を活かし、「大腸癌の Cancer Stem Cell および EMT 誘導した大腸癌細胞の治療抵抗性に関わる分子生物学的メカニズムを解明すること」を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト大腸癌組織内の Cancer Stem Cell において抗癌剤治療抵抗性に関わるタンパ

## クの同定

ヒト大腸癌手術検体を京都大学医学部附属病院から入手し、3mm 大の組織片にする。それを免疫不全マウス (NOD-SCID : NOD.CB17-Prkdcscid/J) の皮下に移植し PDX tumor を作成する。cancer cell line から作成した xenograft tumor がヒト生体内の癌の状態とは大きく異なる遺伝子変異を保有しているのに対し、PDX tumor の遺伝子変異はより生体内の癌の状態に近く、Cancer Stem Cell 研究を行うのに適している。

ヒト大腸癌 PDX tumor を移植した免疫不全マウスにおいて、大腸癌治療の臨床における標準治療薬の一つである irinotecan を用いた抗癌剤治療を行う。irinotecan はマウス体重グラム当たり 50  $\mu\text{g}$  を 1 週間に 1 回腹腔内投与し、それを 3 週間行う。治療後、腫瘍を摘出し細胞間接着を酵素処理して単細胞化し、FACS (fluorescence activated cell sorting) を用いて Cancer Stem Cell (CD44+/CD166+) と non-cancer stem cell を分離回収する。

回収した細胞を質量分析機で解析できるように前処理し、放射性同位元素を標識に用いた ICAT-LC-MS (isotope-coded affinity tags - liquid chromatography - mass spectrometry) 法により標的とする細胞分画を絞った高感度解析を行う。質量分析機による測定は、京都大学大学院工学研究科附属流域圏総合環境研究センターで行う。得られたプロテオミクスデータは、Cancer Stem Cell と non-cancer stem cell においてそれぞれ治療前後で比較する。この測定法での解析が計画通りに進まない場合には、申請者が以前使用した経験のある 2DICAL (2-dimensional image converted analysis of LC-MS) 法という網羅的なプロテオミクス解析により、異なった解析アルゴリズムでアプローチする。この比較解析により、Cancer Stem Cell において特異的に発現が変化しているタンパクが同定される。

### (2) EMT 誘導したヒト大腸癌細胞株の抗癌剤治療抵抗性に関わるタンパクの同定

ヒト大腸癌細胞株に転写因子 Twist, Snail および Slug をそれぞれ強制発現させて EMT 誘導する。EMT は、間葉系マーカーである Zeb1, Vimentin および Fibronectin 発現レベルの上昇、E-cadherin 発現レベルの低下により確認する。転写因子強制発現の際、EMT 誘導細胞 (GFP-reporter 陽性) と未誘導細胞が混在するが、そのまま NOD-SCID マウスの皮下に移植し Xenograft tumor を作成する。その後、前述の PDX tumor の実験と同様の irinotecan 治療を 3 週間行ったのち腫瘍を摘出し、FACS により EMT 誘導細胞

(GFP-reporter 陽性) と未誘導細胞を分離回収する。PDX tumor の実験と EMT 誘導癌細胞の実験で抗癌剤治療時の腫瘍の微小環境 (NOD-SCID マウスの皮下) を同じにすることで、細胞に与える抗癌剤治療の生物学的影響を均一にし、効果的に非特異的な差異を除外することができる。分離回収した細胞は ICAT-LC-MS によりプロテオミクス解析し、EMT 誘導細胞および未誘導細胞においてそれぞれ治療前後で比較する。この比較解析により、EMT 誘導癌細胞において特異的に発現が変化しているタンパクが同定される。

### (3) Cancer Stem Cell と EMT 誘導癌細胞の治療抵抗性に関わるタンパクの同定

Cancer Stem Cell と EMT 誘導癌細胞の実験結果を比較することで、両者の抗癌剤治療抵抗性メカニズムに共通する候補タンパクが同定される。

### (4) DNA マイクロアレイによる mRNA 発現解析

前述の 2 つ実験系 (Cancer Stem Cell と EMT 誘導癌細胞) のそれぞれのサンプルを DNA マイクロアレイ (GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array, Affymetrix) でも解析し、プロテオミクス解析結果の参照データとする一方で、プロテオミクス解析が当初の計画通りに進まない場合の次善の策とする。

タンパク発現レベルが大きく変化し細胞増殖に重要な役割を果たしているタンパクであっても、mRNA レベルでは変化が見られないタンパクもしばしば存在するため、本研究ではプロテオミクス解析の結果を可能な限り優先する。

### (5) 新規同定した Cancer Stem Cell と EMT 誘導癌細胞に共通する治療抵抗性メカニズムの機能的検証

ヒト大腸癌 PDX tumor および大腸癌細胞株において、新規同定したタンパクを発現抑制または強制発現し、実際に抗癌剤治療感受性に変化がみられるかどうかを検証する。

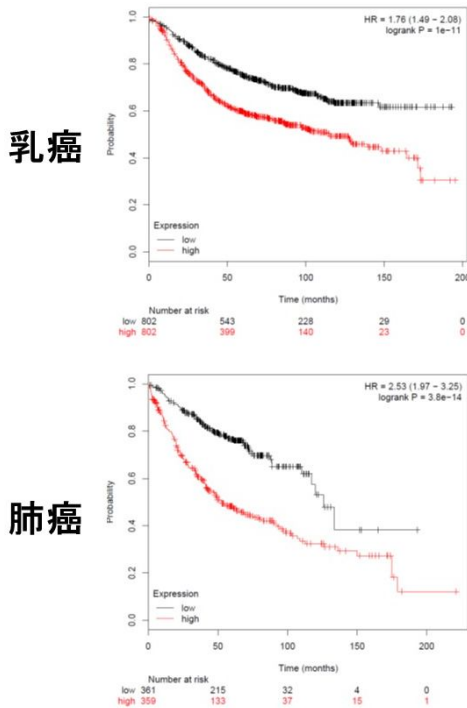
## 4. 研究成果

(1) 樹立したヒト大腸癌 PDX tumor を移植した免疫不全マウスにおいて、大腸癌治療の臨床における標準治療薬の一つである irinotecan を用いた抗癌剤治療を行った。irinotecan はマウス体重グラム当たり 50  $\mu\text{g}$  を 1 週間に 1 回腹腔内投与し、それを 3 週間行った。治療後、腫瘍を摘出し細胞間接着

を酵素処理して単細胞化し、FACS (fluorescence activated cell sorting) を用いて Cancer Stem Cell (CD44+/CD166+) と non-cancer stem cell を分離回収する作業を行った。分離回収した細胞を用いてトランスクリプトーム解析を行った結果、筆者が以前に行った大腸癌 Cancer Stem Cell の抗癌剤治療抵抗性に関わる研究において抗癌剤耐性機序に重要な因子として同定された転写因子 E2F4 が、再現性をもってその重要性が確認された。

(2) E2F4 は細胞分裂における細胞周期を制御している転写因子として知られている。申請者によるクロマチン免疫沈降シーケンス実験 (ChIP-sequence) でも、その E2F4 が発現制御する標的遺伝子の中には細胞周期を制御するタンパクが複数含まれていることが確認された。また、殺細胞性抗癌剤治療に対する癌細胞の生理的な反応はストレス応答 (DNA-damaging response) として知られ、一般的に細胞分裂周期の停止 (cell cycle arrest) をひきおこすことが報告されている。以上のことから、殺細胞性抗癌剤治療に対する耐性メカニズムとして、E2F4 が制御する細胞周期停止応答 (cell cycle arrest) が重要な役割をはたしていることが強く示唆される。

図2 — CDKN3 High expression  
— CDKN3 Low expression

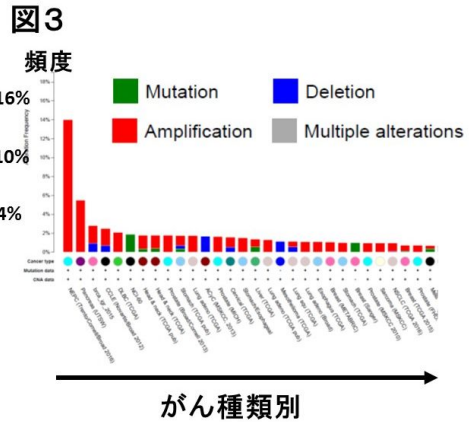


細胞周期を阻害する遺伝子は複数存在するが、そのうち Wee1 や Chk1/Chk2 についてはすでに分子標的薬剤が存在し臨床試験も進行している。上記以外の主な細胞周期阻害遺伝子として CIP/KIP family と INK4 family に属する遺伝子群が知られているが、申請者による抗 E2F4 抗体を用いた ChIP-sequence 実験では、Wee1 と Chk1/Chk2 とともに INK4 family 遺伝子 (CDKN2A (p16), CDKN2C, CDKN2D, CDKN3) が E2F4 の転写制御標的遺伝子として同定された。なかでも CDKN3 については、

オンラインデータベース「Kaplan-Meier Plotter」における肺癌症例と乳癌症例の化学療法に対する無増悪生存期間解析で、CDKN3 の mRNA 発現が高いとどちらの癌でも有意に予後不良であること (図2)

別のオンラインデータベース「cBioPortal」を用いた癌種横断的な解析において、どの癌種においても CDKN3 遺伝子欠失はみられずむしろ遺伝子増幅が数%で見られること (図3)

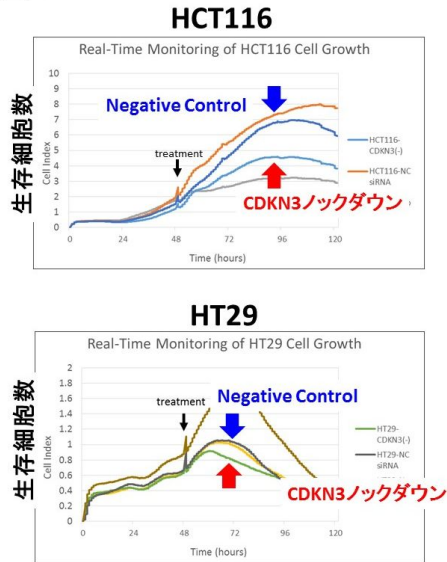
の2点が明らかとなった。



また、ヒト大腸癌細胞株 (HCT116, HT29) を用いた *in vitro* 実験を行い、CDKN3 をノックダウンすると、抗癌剤 irinotecan に対する癌細胞の感受性が上昇することを確認した (図4、未発表データ)。

CDKN3 は、Cancer Stem Cell の治療抵抗性に関わる因子として良い治療標的になりうると思われる。

図4



今後は EMT 細胞における CDKN3 の分子生物学的な役割についても検討を重ねるとともに、CDKN3 を阻害する新規化合物の開発にも取り組んでいく予定である。

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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

(1) 第76回 日本癌学会学術総会  
2017年9月29日、横浜

International Sessions: 癌幹細胞の理解と克服に向けた新たな取り組み

“A E2F4/p107 complex regulates LDHA in the mechanism of chemotherapy resistance in human colorectal cancer stem cells”

Junichi Matsubara, Yong F. Li, Piero Dalerba, Debashis Sahoo, Russ B. Altman, and Michael F. Clarke

(2) 2017 AACR Annual Meeting,  
April 2, 2017. Washington DC

Poster Session (Experimental and Molecular Therapeutics: Gene

Expression of Drug Resistance)

“E2F4/p107 complex regulates chemotherapy resistance in human colorectal cancer stem cells”

Junichi Matsubara, Yong F. Li, Piero Dalerba, Debashis Sahoo, Taichi Isobe, Russ B. Altman, and Michael F. Clarke.

[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 0 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]  
ホームページ等: なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
松原 淳一 (MATSUBARA, Junichi)  
京都大学大学院医学研究科・特定助教  
研究者番号: 40782371

(2) 研究分担者  
なし ( )

研究者番号:

(3) 連携研究者  
なし ( )

研究者番号:

(4) 研究協力者  
なし ( )