

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09381

研究課題名(和文) 大腸腫瘍幹細胞性維持におけるインスリン様増殖因子シグナルの治療標的としての可能性

研究課題名(英文) Insulin-like growth factor signaling pathway as a possible therapeutic target for the maintenance of colonic tumor stem-cell character.

研究代表者

宮本 心一 (Miyamoto, Shin'ichi)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：90378761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは大腸腫瘍幹細胞におけるIGFシグナルの活性化を見るために、腫瘍オルガノイドおよびヒト大腸癌組織においてDclk-1(腫瘍幹細胞マーカー)、MMP-7(IGF結合蛋白質を分解し、IGFを活性化するプロテアーゼ)、IGF type1 受容体の免疫染色を行った。両組織においてDclk-1陽性細胞とMMP-7陽性細胞の局在はまったく異なっており、MMP-7はDclk-1陽性細胞からは分泌されていないことが明らかになった。腫瘍自体が分泌するMMP-7が腫瘍微小環境においてIGFを活性化し、paracrine的にDclk-1陽性細胞に作用し、腫瘍幹細胞性の維持に寄与している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国では大腸癌は増加傾向にあり、罹患者数(総数で1位)、死亡者数とも多い(女性の癌死の1位)。大腸癌は進行したステージでも化学療法の進歩、分子標的薬の開発などにより、かなりの予後を見込めるようになった。その反面、高額な医療費も問題となっている。一方、大腸癌は便潜血によるスクリーニングを契機として、大腸内視鏡による早期発見、早期治療が可能な癌でもある。しかしながら大腸癌検診の受診率は50%にも満たないのが現状である。そこで大腸発癌のメカニズムの一端が明らかになり、新たな治療法が開発され、大腸癌の予防効果が科学的に証明されれば、社会的貢献度はきわめて高い。

研究成果の概要(英文)：We performed immunostaining of Dclk-1(specific marker of colon tumor stem cell), MMP-7(IGF binding protein proteinase) in tumor organoids and human colon cancer tissues to confirm the activation of IGF signal in colon tumor stem cells. The localization of Dclk-1-positive cells and MMP-7-positive cells was completely different in both tissues, showing that MMP-7 was not secreted from Dclk-1-positive cells. MMP-7 secreted by the tumor itself may activate IGF in the tumor microenvironment, act paracrine on Dclk-1-positive cells, and contribute to the maintenance of tumor stemness. MMP-7 is secreted from stromal cells as an inactive form and limited degradation by other proteases is required for its activation. In vitro systems, including organoid systems, do not contain stromal cells and cannot evaluate the activation of secreted MMP-7. Therefore, there is a limit in evaluating the activation of IGF signal following the activation of MMP-7 in the tumor stem cell niche in vitro.

研究分野：消化器内科学

キーワード：大腸腫瘍幹細胞 インスリン様増殖因子 MMP-7 Dclk-1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国では大腸癌は罹患者数、死亡者数ともに増加傾向にある。インスリン様増殖因子(Insulin-like Growth Factor; IGF)は、がんの発生、増殖、浸潤、転移のすべての過程に関与していることが知られている。IGF リガンドである IGF-1 ならびに IGF-2 は主に肝臓で産生され、クッパー細胞や血管内皮から産生される IGF 結合蛋白質(IGF binding protein; IGFBP)と結合して、大部分が非活性型として存在する。したがって、IGF が活性型 IGF (bioactive IGF)として作用を発揮するためには、タンパク質分解酵素による IGFBP の分解が必須である。これまでに、当研究室では、がん細胞から分泌されるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)-7 や前立腺特異抗原(PSA)が複数の IGFBP に対して分解酵素活性をもつこと発見した。さらに IGF 中和抗体を開発し、大腸癌肝転移、前立腺癌骨転移のモデルにおいて IGF が治療標的になりうることを証明した。これら一連の研究成果は癌細胞のプロテアーゼによって活性化される増殖因子を標的にするというまったく新しい治療概念を提唱することになった。大腸発癌においては家族性大腸腺腫症のモデルマウス(APC 遺伝子のヘテロ変異マウス)である Min マウスと MMP-7 のノックアウトマウスおよび腸管特異的 IGF-2 ノックアウトマウスをかけ合わせることにより大腸ポリープの発生が抑制されることから、MMP-7 が IGF・IGFBP 複合体を分解する結果、腫瘍微小環境内で IGF が活性化され(Bioactive IGF が産生され)腫瘍発生に寄与すると考えられた。さらにわれわれは Min マウスに IGF 中和抗体を投与し、主としてその抗アポトーシスによりポリープの発生が抑えられることも確認している。しかしながら大腸発癌における IGF の詳細な作用機序は不明なままであった。2013 年に同教室から、Dcl-1 が大腸腫瘍幹細胞の特異的マーカーであることが報告され(Nakanishi Y, et al. Nat Genet 2013)、2016 年にはヒト乳癌細胞から CD44 陽性、CD24 陰性のがん幹細胞が豊富な細胞群の一部に IGF type1 受容体(IGF-1R)が高発現していることが報告され(Tominaga K, et al. Oncogene 2016)、大腸腫瘍幹細胞の維持に IGF シグナルが関与している可能性を考え本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

がんの根治を目指すにはがん幹細胞を排除することが重要であり、がん幹細胞性を維持するために必要な生存シグナルの同定はがん幹細胞を標的とする治療開発に必須である。血清中の IGF の高値が大腸癌のリスクになる、成長ホルモンが過剰分泌され末梢の IGF-1 が増加する末端肥大症患者に大腸癌が多い、といった疫学データは、大腸発癌に IGF が関わっていることを強く示唆する。しかしながらがん幹細胞における IGF シグナルの意味づけは明らかではない。われわれは Min マウスで同定された Dcl-1 陽性大腸腫瘍幹細胞に着目し、腫瘍幹細胞性維持における IGF シグナルの重要性を証明し、大腸腫瘍幹細胞を標的とした新たな治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

- (1) Min マウスのポリープからオルガノイドを作成し、免疫染色などで Dcl-1 陽性細胞における IGF シグナルの活性化を証明し、オルガノイドの生育状態に与える IGF の影響を検討する。同時に単離した Dcl-1 陽性細胞の網羅的遺伝子解析も行う。
- (2) Min マウスに IGF 中和抗体を投与し、Dcl-1 陽性細胞の減少によりポリープの発生が抑制されていることを証明する。同時に経時的に採血を行い、Bioactive IGF が IGF 中和抗体の治療効果予測因子となりうるかを検討する。
- (3) 家族性大腸腺腫症に対して、すでにポリープ抑制効果が証明されているシクロオキシゲナーゼ(COX)2 阻害剤をコントロールに IGF 中和抗体の上乗せ効果を検証する。

4. 研究成果

- (1) 腫瘍オルガノイドおよびヒト大腸癌組織において Dcl-1、MMP-7、IGF type1 受容体(IGF-1R)の免疫染色を行った。両組織において Dcl-1 陽性細胞と MMP-7 陽性細胞の局在はまったく異なっており、少なくとも MMP-7 は Dcl-1 陽性細胞からは分泌されていないことが明らかになった。その後、Min マウスのポリープ数が減少してしまったこと、腫瘍オルガノイドが継代に連れ Dcl-1 細胞が減少していったこともあり、実験の休止を余儀なくされた。
- (2) 今後の検討課題と展望
正常腸管上皮において、パネート細胞から MMP-7 が分泌され Lgr5 陽性幹細胞に接して存在し、wnt3 を分泌することにより幹細胞ニッチを構成していることが知られている。パネート細胞由来の MMP-7 が IGFBP プロテアーゼ活性を持つことを考えれば、幹細胞ニッチにおいて活性化された IGF が幹細胞性維持に何らかの役割を持つことが想定される。一方、腫瘍においては腫瘍自体が分泌する MMP-7 が腫瘍微小環境において IGF を活性化し、paracrine 的に Dcl-1 陽性細胞に作用し、腫瘍幹細胞性の維持に寄与している可能性を考えている。しかしながらオルガノイドの培養には必ずしも血清(IGF が含まれる)を必要とせず、また MMP-7 は不活性型の前駆体で分泌され、その活性化には間質細胞から分泌される他のプロテアーゼによる分解が必要である。オルガノイドの系も含め in vitro の系では間質細胞を含まず、分泌された MMP-7 の活性化を評価できない。そのため、生体内での腫瘍幹細胞ニッチにおける MMP-7 の活性化については IGF シグナルの活性化を in vitro の系で評価するには限界がある。同時並行している肝転移モデルにおいても、ヒトの MMP-7 はマウス

の肝微小環境下では活性化されず、in vitro、in vivoの両者においてMMP-7によるIGFの活性化を直接証明することは、IGFBPの多様性も相まってかなり難しいことを実感している。上述したように腫瘍オルガノイドは継代を重ねるにつれ、Dclk-1陽性細胞が減少していくことも問題であったが、最近になりIGF-1とFGF-2を培地に加えることで腸管上皮のオルガノイドの安定培養が可能になることが報告された(Fujii M, et al. Cancer Stem Cell 2018)。この培養条件下で腫瘍オルガノイドにおいてDclk-1細胞が維持されれば少なくとも現象論的にはIGFが腫瘍幹細胞の維持に寄与していることは証明できるものとする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miyamoto S.	4. 巻 November
2. 論文標題 Importance of Matrixmetalloproteinae-7	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Impact	6. 最初と最後の頁 27-29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

特記すべきものなし。

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----