

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02796

研究課題名（和文）癌幹細胞の分子機構に立脚した大腸癌の予後因子同定と新規治療法の非臨床POC取得

研究課題名（英文）Identification of prognostic factors and development of preclinical POC for novel therapies for colorectal cancer based on molecular mechanisms of cancer stem cells.

研究代表者

青井 貴之（Takashi, Aoi）

神戸大学・科学技術イノベーション研究科・教授

研究者番号：00546997

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究においては、癌幹細胞の分子機構に立脚した大腸癌の新規治療法の非臨床POC取得に取り組んだ。大腸癌患者由来オルガノイドの樹立、培養とそれを用いた定量的薬効評価の系、さらにそのオルガノイドの免疫不全マウスへの移植によるxenograft作製及びそのれに対する薬効評価の系を確立した。これらの系を用いて、申請者らが「大腸癌細胞株を用いて行った先行研究において見出した新規治療薬候補の有効性を検討したところ、いずれの系でも有効であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌は世界で最も多い癌のひとつであり、年間60万人以上が大腸癌で死亡している。外科的・内科的治療の向上は続いているものの、切除不能症例の根治は未だ得られていない。今日では、新たな癌組織を再構築する能力を持つものは一部の細胞のみであると理解され、このような能力をもつ癌細胞は癌幹細胞とよばれる。癌幹細胞を標的とする治療薬開発はこれまで十分に進んでいるとは言えない。大腸癌幹細胞を標的とする新規治療薬可能性を示した本研究成果は、切除不能大腸癌の根治に繋がり得るものである。

研究成果の概要（英文）：In this study, we tried to obtain preclinical POC for a novel treatment of colorectal cancer based on the molecular mechanism of cancer stem cells. We established a system to generate organoids derived from human clinical specimens of colorectal cancer and to quantitatively evaluate the efficacy of drugs using these organoids, as well as a system to create xenografts by transplanting these organoids into immunodeficient mice and to evaluate the efficacy of drugs against these xenografts. Using these systems, we examined the efficacy of the novel therapeutic drug candidates that the applicants had discovered in our previous studies using colon cancer cell lines, and revealed that they were effective in the systems.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：大腸癌 癌幹細胞 オルガノイド xenograft

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は世界で最も多い癌のひとつであり、年間60万人以上が大腸癌で死亡している。外科的・内科的治療の向上は続いているものの、切除不能症例の根治は未だ得られていない。今日では、癌組織をなす癌細胞にはヒエラルキーがあり新たな癌組織を再構築する能力(すなわち、転移、再発を起こし得る能力)を持つものは一部の細胞のみであると理解され、このような能力をもつ癌細胞は癌幹細胞とよばれる。癌幹細胞では、既存の抗がん剤等や放射線に対する感受性が癌非幹細胞と比べて低く、治療抵抗性や予後不良の責任細胞と考えられている。従って、大腸癌幹細胞に着目した腫瘍の評価や大腸癌幹細胞を標的とする新規治療薬の開発は、切除不能大腸癌の根治を達成するために重要である。

上述のような理解に立脚して、これまでも癌幹細胞に着目した多くの研究開発が行われてきたにも関わらず、現時点においても切除不能大腸癌を内科的に根治することはできていない。この現状を打破するためには、従来にないマテリアルを用いた革新的研究開発手法を導入する必要がある。従来の大腸癌幹細胞研究では、切除組織を分散し、何らかの分子の発現を指標にセル・ソーターにより癌幹細胞が濃縮された細胞集団を採取し実験に供するという手法が主に用いられてきた。この手法では、癌幹細胞マーカー陽性細胞は癌組織の一部のみであり、また、切除検体の入手機会(余剰検体の生じる手術の実施)が限られることから、大腸癌幹細胞研究に用いる試料の量的・時機的制約が不可避であるという問題があった。

これら試料の制約という問題を解決する方策として、申請者らは大腸癌細胞株に特定の因子を導入することで人工的に大腸癌幹細胞様の細胞(幹細胞マーカー遺伝子発現上昇、細胞増殖速度低下、抗がん剤耐性、スフェア形成能増大、腫瘍形成能増大、自己複製能あり)を作製し選択的に回収することに成功し、人工大腸癌幹細胞と名付けて報告した(PLOS ONE, 2014; PCT/JP2015/68082)。出発材料とする癌細胞株はほぼ無限に拡大培養することが可能であるし、FK506の添加により人工大腸癌幹細胞を効率的に拡大培養する方法も申請者は見出している(特願2017-110626)ことから、試料の量的制約が解消される。人工大腸癌幹細胞は凍結融解も可能であることから、時機的な制約もなく研究が可能である。

さらに、人工大腸癌幹細胞は *in vivo* および *in vitro* において、ヒト大腸癌組織を模倣した構造や免疫染色パターンを示す癌組織を形成できることが明らかとなった。*In vitro* で形成されたヒト大腸癌類似の細胞集合体を“癌オルガノイド”と称することとした。さらに、間葉系幹細胞と血管内皮細胞株との混合培養を行うと、間質を伴う組織を *in vitro* で形成できることも分かった。

これら、人工大腸癌幹細胞とそこから分化した大腸癌非幹細胞、そして人工大腸癌幹細胞由来癌オルガノイドを用いた研究により、以下の成果を得た。(1)大腸癌における重要分子候補群として、人工大腸癌幹細胞特異的に高発現/低発現する遺伝子群を同定した(うち一つはRCAN2)。(2)人工大腸癌幹細胞において、化合物や siRNA による GSK3 阻害は NFAT の核移行を介して癌幹細胞特性の抑制効果があることから、GSK3 阻害作用をもち、抗てんかん薬として臨床の場で広く使われかつ安価な VPA が大腸癌幹細胞標的治療薬としてリポジショニングされ得る(Mol Cancer Res, 2017)。

しかし、上述の手法で見出した知見が実臨床に適用できるかどうかについて、研究開始当初その根拠は十分とは言えなかった。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに進めてきた大腸癌幹細胞研究を発展させて臨床応用に繋げることをめざすものである。具体的には、(1)VPAの有効性に関する非臨床POCを取得すること、(2)これまでの研究で抽出された大腸癌幹細胞における重要分子候補群について、その臨床的意義を明らかにすること、(3)大腸癌幹細胞研究手法をさらに進化をさせ、多様な臨床例の臨床検体を原材料とする研究を可能とすること、を目的とした。

3. 研究の方法

【(I) VPAの有効性に関する非臨床POC(Proof Of Concept)取得】

(i) 患者由来オルガノイドに対するVPAの効果の評価

神戸大学医学部附属病院での外科切除検体を用い、既報の方法を参考にオルガノイドを作製する系を確立する。

(ii) 患者由来 xenograft に対するVPAの効果の評価

神戸大学医学部附属病院での外科切除検体を用い、既報の方法を参考に xenograft を作製する系を確立する。系が確立したら、VPAの効果の評価する。

【(II) 大腸癌の新規予後因子同定】

これまでの研究で申請者らが抽出した、大腸癌幹細胞における重要分子候補群について、その臨床的意義を以下の方法により明らかにする。

(i) TCGA データにおける候補分子群と予後との相関の解析

国際的な癌データベースである TCGA データベースから大腸癌症例のデータ (N=597) を取得し、各々の候補分子をコードする遺伝子の発現量が予後と相関するか否かを、Stage をはじめ、様々な患者背景毎に層別化して解析する。

(ii) 自験臨床検体の免疫染色所見と予後との相関の解析

(i) で有意な結果が認められた遺伝子について、自験例の臨床検体を用いてその遺伝子産物に対する免疫染色により評価し、臨床経過との相関を解析する。

【(III) 大腸癌幹細胞に対する新規治療標的因子の探索と非臨床 POC 取得】

(i) 人工大腸癌幹細胞と癌オルガノイドを用いた検討

(II) において予後との有意な相関がみられた遺伝子について、それぞれの遺伝子の産物やそれが関与する分子機構の大腸癌幹細胞における治療標的としての意義を明らかにする。

【(IV) 臨床検体からの人工大腸癌幹細胞作製】

(i) これまでは、大腸癌細胞株からのみ人工大腸癌幹細胞を誘導していたが、臨床検体からも同様の方法で人工大腸癌幹細胞を誘導できるかを明らかにする。

(ii) (i) が成功しない場合、導入因子や培養条件を工夫し、誘導可能な条件を明らかにする。

4. 研究成果

【(I) VPA の有効性に関する非臨床 POC (Proof Of Concept) 取得】

大腸がんの切除検体からオルガノイドを作製する系を確立した。また、それらにおける主な遺伝子変異を同定した。さらに、*in vitro* の定量的な薬剤感受性試験系を確立し、我々の先行研究の結果から大腸癌に対する効果が期待された VPA の患者由来オルガノイドに対する *in vitro* での有効性が統計的優位差をもって明らかになった。さらに、ノックダウンを用いた実験から、大腸癌におけるバルプロ酸の標的分子およびその作用機序が患者由来オルガノイドで明らかになった。この結果は、我々が先行研究において独自技術である誘導型大腸癌幹細胞を用いて得ていた知見と一致するものであった。

また、患者由来大腸がんオルガノイドを免疫不全マウスに移植して xenograft を作製する系を確立した。これを用い、VPA の投与実験を行った。その結果、VPA 投与群では形成される腫瘍のサイズが有意に小さかったことから、*in vivo* でも POC が示されたと結論づけた。

【(II) 大腸癌の新規予後因子同定】【(III) 大腸癌幹細胞に対する新規治療標的因子の探索と非臨床 POC 取得】 当初計画に従って、予後因子の同定に取り組んだ。これまでに予後と相関するいくつかの因子を見出すことができた。しかし、それらに関する十分に詳細な解析を行うところまでは本研究期間内では達成できなかった。

【(IV) 臨床検体からの人工大腸癌幹細胞作製】

大腸がん細胞株を用いて行った我々の研究の方法を参考にして臨床検体からの人工大腸癌幹細胞作製の試みを行ったところ、因子導入については安定して高効率に行える系を確立することが出来たものの、目的の特性を有する細胞の樹立成功には至らなかった。何らかの、幹細胞化抑制機構の存在が示唆された。

以上、当初計画未達であった項目もあるが、最も重要な項目であった VPA の有効性に関する非臨床 POC の取得に至ることができた。現在、論文作成を進めているところである。今後はこの成果を基盤とした臨床試験の実施に向けた取り組みを進めてゆく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 青井貴之
2. 発表標題 細胞運命の転換技術を応用したがん研究の展開
3. 学会等名 第5回DIA再生医療製品・遺伝子治療用製品シンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 青井貴之
2. 発表標題 幹細胞操作技術を用いた細胞と組織の科学
3. 学会等名 第60回日本組織細胞化学総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazumasa Horie; Manabu Horikawa; Michiyo Koyanagi-Aoi; Takashi Aoi
2. 発表標題 Valproic acid suppresses the tissue-reconstructing ability of colorectal cancer stem cells by inhibition of GSK3
3. 学会等名 ISSCR/JSRM 2021 Tokyo International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀江 和正, 堀川 学, 小柳 三千代, 青井 貴之, 松田 武, 掛地 吉弘
2. 発表標題 患者由来大腸癌オルガノイドを用いたバルプロ酸の新規治療薬としての有用性の検討
3. 学会等名 第63回日本消化器病学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担者	掛地 吉弘 (Kakeji Yoshihiro) (80284488)	神戸大学・医学研究科・教授 (14501)	
研究 分担者	青井 三千代(小柳) (Koyanagi-Aoi Michiyo) (90432327)	神戸大学・医学部附属病院・特命助教 (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------