

令和 3 年 4 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08678

研究課題名(和文) Lgr5スプライシングバリエントに着目した大腸癌の新規治療開発のための基礎研究

研究課題名(英文) Development of novel treatments for colorectal cancer focusing on Lgr5 splicing variants

研究代表者

高橋 秀和 (Takahashi, Hidekazu)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10528508

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)：大腸癌細胞株SW480, SW620, HT29を用いて、Syntenin-1の抑制を行い、遺伝子発現の網羅的解析を行った結果、プロスタグランディングナルに変化を認めた。これはCOX2を阻害した時の挙動と同じであった。このことからSyntenin-1のCOX-2シグナルへの関与が示唆された。LGR5は幹細胞性を司ると言われるが、Syntenin-1の阻害はこの幹細胞性を裏付けるように抗がん剤耐性を低下させた。化学療法の感受性を増強させるためにCOX-2阻害剤との併用を行ったところ、著明な相乗効果を認めた。有用なコンビネーション療法としての可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌幹細胞表面分子である全長型LGR5、LGR5スプライシングバリエントの意義を解明すべく遺伝子ではなく、タンパク質の網羅的解析を行った。結果Syntenin-1が同定された。Syntenin-1はCOX-2シグナルの伝達に重要な役割を果たしており抗がん剤耐性に寄与した。この事実を臨床応用するに際し、現在施行されている化学療法の感受性を増強させるためにCOX-2阻害剤との併用を行ったところ、著明な相乗効果を認めた。現状の化学療法もCOX-2阻害剤も臨床応用が可能なため、COX-2阻害剤が抗がん剤としてのドラッグリポジショニングとしての可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：As a result of comprehensive analysis of gene expression by suppressing Syntenin-1 using colorectal cancer cell lines SW480, SW620, and HT29, changes in prostaglandin signal were observed. This was the same as the behavior when COX2 was inhibited. This suggests that Syntenin-1 is involved in the COX-2 signal. LGR5 is said to control stem cell nature, but inhibition of Syntenin-1 reduced anticancer drug resistance to support this stem cell nature. When used in combination with a COX-2 inhibitor to increase the sensitivity of chemotherapy, a significant synergistic effect was observed. The possibility as a useful combination therapy was suggested.

研究分野：消化器外科学

キーワード：進行再発大腸癌 抗がん剤耐性 COX-2阻害剤

1. 研究開始当初の背景

大腸癌の根治を念頭においた治療では、現状では手術治療が主な役割を果たし、薬物療法はあくまでの補助的役割にすぎないが、**高度進行下部直腸癌**の外科治療を念頭においた際には根治切除率を上げるために補助療法を術前に施行する事も一般化してきた。奏効例においては、腫瘍量の減少から外科切除が容易となり有用性が高いが、治療抵抗性の為に術前補助化学療法が奏功せず、切除ができなくなるような非奏効症例もありうる。本研究においては、この治療抵抗性を打破すべく、**癌幹細胞仮説に則った新しい治療開発**を目的とする。

我々は以前から癌幹細胞マーカーである LGR5 にスプライシングバリエントが存在し、その全長型 LGR5 陽性細胞が高度進行下部直腸癌の化学療法後に残存することを明らかにし、そのメカニズムの一部を報告してきた。本研究においてはメカニズム解析をさらに深めることで、druggable な新規分子発見のための基礎研究を行う。

2. 研究の目的

進行再発大腸癌に対する新規治療法の開発のための基礎研究を行うことを目的とした

3. 研究の方法

大腸癌細胞株 SW480, SW620, HT29 を用いて、Syntenin-1 の抑制を行い、遺伝子発現の網羅的解析を行った結果、プロスタグランジンシグナルに変化を認めた。これは COX2 を阻害した時の挙動と同じであった。このことから Syntenin-1 の COX-2 シグナルへの関与が示唆された。LGR5 は幹細胞性を司ると言われるが、Syntenin-1 の阻害はこの幹細胞性を裏付けるように抗がん剤耐性を低下させた。化学療法の感受性を増強させるために COX-2 阻害剤との併用を行ったところ、著明な相乗効果を認めた。有用なコンビネーション療法としての可能性が示唆された。

4. 研究成果

LC-MS/MS 解析の結果、全長型 Lgr5 に共役する分子として syntenin-1 を同定した。syntenin-1 の高発現が予後不良因子となる大腸癌についての報告はない。そのため syntenin-1 発現の臨床病理学的因子および予後との関連を検証し、その機能解析を行った。2006年から2009年までに当科で根治手術を施行した連続する139例の大腸癌症例を対象とし、切除標本における syntenin-1 の発現を免疫組織染色により2群に分類した。また3種類の microsatellite stable (MSS) 大腸癌細胞株に、syntenin-1 に対する shRNA を導入し増殖能・遊走能・抗癌剤感受性アッセイを行った。臨床病理学的因子での

比較においては高発現群で分化度 ($p=0.001$) の他に有意な因子を認めなかった。5年全生存率 (overall survival: OS) は低発現群:高発現群=97.8%:63.8% ($p=0.001$)、5年無再発生存率 (relapse free survival: RFS) は低発現群:高発現群=92.4%:61.7% ($p=0.001$) で、syntenin-1 高発現群で有意に再発率が高く生存率が低かった。多変量解析では OS においては CA19-9 値と並んで ($p<0.0001$)、RFS においては脈管侵襲と並んで ($p<0.0001$) 予後予測因子であった。さらに、L-OHP に対する感受性は有意差に上昇した ($p<0.05$)。大腸癌において syntenin-1 の高発現は OS・RFS の悪化に関与し、予後予測に有用なマーカーとなりうることが示唆された。また、syntenin-1 は遊走能と進行再発大腸癌治療における key drug である L-OHP に対する薬剤感受性に関与していた。

臨床大腸癌検体を用いたタンパク分析の結果、全長型 Lgr5 に共役する分子として、syntenin-1 を同定した。130 例の大腸癌切除検体の免疫染色を行った結果、syntenin-1 は単独で 5 年全生存率は低発現群:高発現群=97.8%:63.8% ($p=0.001$)、5 年無再発生存率は低発現群:高発現群=92.4%:61.7% ($p=0.001$) で、syntenin-1 高発現群で有意に再発率が高く生存率が低かった。大腸癌細胞株 sw480 を用い shRNA を用いて検討したところ、L-OHP に対する感受性は有意差に上昇した ($p<0.05$)。そこでこのメカニズムを解明するため、RNAseq を行った。IPA 解析にて PGE2 シグナルに強い影響があることが示唆された。PGE2 シグナルは抗炎症作用に強く関与する。既に COX-2 阻害薬であるセレコキシブが臨床で消炎鎮痛剤として使用できる。大腸癌細胞株 sw480, CaCO2 において、同薬剤と L-OHP の相乗効果を認め、これは三次元培養においても同様の結果であった。Lgr5 が syntenin-1 を介して PGE2 シグナルを活性化し、化学療法耐性に寄与している可能性が示唆されたものである。本研究の成果は British Journal of Cancer 誌に投稿し、アクセプトされた。Lgr5 の関連分子である DCLK1 についても同様に解析を並行して進めてきた。shDCLK1 を細胞株に導入し、下流のシグナルを解析したところ上皮間葉転換に非常に重要な役割を果たしていることが示唆され、また、臨床検体を用いた免疫染色の結果から強力なバイオマーカーである可能性が示唆された。本成果は Carcinogenesis 誌にアクセプトされた。癌幹細胞表面分子である全長型 LGR5、LGR5 スプライシングバリエーションの意義を解明すべく遺伝子ではなく、タンパク質の網羅的解析を行った。結果 Syntenin-1 が同定された。Syntenin-1 は COX-2 シグナルの伝達に重要な役割を果たしており抗がん剤耐性に寄与した。この事実を臨床応用するに際し、現在施行されている化学療法の感受性を増強させるために COX-2 阻害剤との併用を行ったところ、著明な相乗効果を認めた。現状の化学療法も COX-2 阻害剤も臨床応用が可能のため、COX-2 阻害剤が抗がん剤としてのドラッグリポジショニングとしての可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kazuya Iwamoto, Hidekazu Takahashi, Disuke Okuzaki, Hideki Osawa, Takayuki Ogino, Norikatsu Miyoshi, Mamoru Uemura, Chu Matsuda, Hirofumi Yamamoto, Tsunekazu Mizushima, Masaki Mori, Yuichiro Doki, and Hidetoshi Eguchi	4. 巻 -
2. 論文標題 Syntenin-1 promotes colorectal cancer stem cell expansion and chemoresistance by regulating prostaglandin E2 receptor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 -
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 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Makino S, Takahashi H, Okuzaki D, Miyoshi N, Haraguchi N, Hata T, Matsuda C, Yamamoto H, Mizushima T, Mori M, Doki Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 DCLK1 integrates induction of TRIB3, EMT, drug resistance and poor prognosis in colorectal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/carcin/bgaa016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hokonohara Kentaro, Nishida Naohiro, Miyoshi Norikatsu, Takahashi Hidekazu, Haraguchi Naotsugu, Hata Taishi, Matsuda Chu, Mizushima Tsunekazu, Doki Yuichiro, Mori Masaki	4. 巻 54
2. 論文標題 Involvement of MAF1 homolog, negative regulator of RNA polymeraseIII in colorectal cancer progression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 1001-1009
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2019.4678	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 牧野俊一郎, 高橋秀和, 三吉範克, 原口直紹, 畑泰司, 松田宙, 山本浩文, 水島恒和, 土岐祐一郎, 森正樹
2. 発表標題 大腸癌におけるDouble cortin-like kinase 1の発現の意義に関する基礎研究
3. 学会等名 第73回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩本和哉、高橋秀和、三吉範克、原口直紹、西田尚弘、畑泰司、松田宙、山本浩文、水島恒和、土岐祐一郎、森正樹
2. 発表標題 大腸癌におけるsyntenin-1の発現と機能解析
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋秀和、西村潤一、三吉範克、原口直紹、畑泰司、松田宙、山本浩文、水島恒和、土岐祐一郎、森正樹
2. 発表標題 大腸がんにおける全長LGR5の生物学的意義
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋秀和、西村潤一、三吉範克、原口直紹、畑泰司、松田宙、山本浩文、水島恒和、土岐祐一郎、森正樹
2. 発表標題 当院における局所進行直腸癌に対する術前補助化学療法の治療成績
3. 学会等名 第56回日本癌治療学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋秀和、西村潤一、関戸悠紀、野村雅俊、三吉範克、原口直紹、畑泰司、松田宙、山本浩文、水島恒和、土岐祐一郎、森正樹
2. 発表標題 当院におけるオキサリプラチンベースの術前化学療法後の側方郭清の手術手技と治療成績
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------