

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：72801

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07311

研究課題名（和文）がん-間質相互作用におけるがん幹細胞維持機構の解析と新規抗がん剤の探索及び開発

研究課題名（英文）Analysis of cancer stem cell maintenance mechanism and screening of inhibitors for cancer stem cell maintenance

研究代表者

立田 大輔（Tatsuda, Daisuke）

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・研究員

研究者番号：20442569

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：腫瘍はがん細胞と間質細胞をはじめとした正常細胞の混在によって成り立っている。我々は新しい抗がん剤の創生を目的として、不均一ながん細胞の中で腫瘍の進展に重要とされているがん幹細胞に着目し、間質細胞との相互作用について解析を行った。その結果、がん幹細胞性の維持・増殖に寄与する候補因子としてcollagen VIを見出した。また、がん幹細胞の特性の1つであるスフェロイド形成について間質細胞との共培養を抑制する化合物を化合物ライブラリーや放線菌やカビなどの微生物代謝産物からスクリーニングを行い、間質細胞との共培養の時のみ、がん細胞のスフェロイド形成を抑制する化合物を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果からがん幹細胞性を維持する可能性する因子として見出された間質細胞由来のcollagen VIはすい臓がんや肺がんで初めて見出された成果であり、今後の研究によってこれらのがんに対する治療薬開発へとつながり社会的意義が高い。また、間質細胞との共培養で特異的にがん細胞のスフェロイド形成を抑制する化合物は、そのメカニズムの解析から、がん幹細胞に与える影響を解析できることから学術的意義が高い。

研究成果の概要（英文）：Tumors are made up of a mixture of cancer cells and normal cells, including stromal cells. For the purpose of creating new anticancer drugs, we focused on cancer stem cells, which are important for tumor development among heterogeneous cancer cells, and analyzed their interaction with stromal cells. As a result, we found collagen VI as a candidate factor that contributes to the maintenance and proliferation of cancer stem cells. In addition, we screen compounds that specifically suppress cancer spheroid formation, which is one of the characteristics of cancer stem cells, in a co-culture with stromal cells using a compound library and microbial metabolites such as actinomycetes and molds, and found hit compounds.

研究分野：分子生物学

キーワード：がん幹細胞 collagen VI スフェロイド がん治療薬

## 1. 研究開始当初の背景

生活環境の改善によって寿命が延長する中、日本人の2人に1人ががんを発症する。がんはヒトの様々な部位に発症するため、その部特異的な治療が必要となり、世界中で新しいがん治療薬の開発が盛んに行われている。近年、免疫チェックポイント阻害薬と呼ばれる抗体医薬が注目を浴び、様々ながん種で単剤、併用の臨床試験が行われている。免疫チェックポイント阻害薬はがん細胞の染色体変異が抗原提示される免疫系の作用を増強すると考えられており、染色体変異の多いがんほど効きやすいと考えられている。しかしながら、免疫チェックポイント阻害薬の効きやすさの目安とされるがん細胞中の染色体変異の割合が低いがんや腫瘍関連マクロファージによる免疫反応の阻害等の理由によって、すい臓がんのように免疫チェックポイント阻害薬が効果を示さないがん種も存在する。また既存の抗がん剤と異なり自己免疫疾患に類似した副作用を示すため投与不可能な患者も存在する。このような背景から、現在の抗がん剤は全ての臓器に対するがん治療に対して圧倒的に不足している。特にすい臓がんは5年生存率が10%未満と非常に予後が悪く難治がんとして新しい治療薬が求められている。我々は、新しいがん治療薬の創製のため、これまでのがん治療薬とは作用機作が全く異なるタイプの治療薬の開発を目指している。生体に発症する腫瘍(がん)はそれ自身の細胞だけでなく線維芽細胞、免疫細胞や血管内皮細胞等が含まれる間質細胞は腫瘍組織でがん細胞を混在した組織像として観察される(図1)。従って、生体内では腫瘍組織と間質細胞のやりとり、『がん-間質相互作用』が腫瘍の増殖、転移、薬剤耐性などに影響を与えていると考えられている。一方でがん細胞自身は不均一な集団であることが知られており、その中でもがん幹細胞は高い造腫瘍能、自己複製能、多分化能を持っていることが明らかとなっており、また放射線や既存の抗がん剤に対する抵抗性が非常に高く(Nikki K. L., et al. Nat Reviews Cancer 2018)、治療後も抵抗性を持ったがん幹細胞は生体内に残っており、不均等分裂によってがん細胞が増殖を繰り返し、腫瘍が再度増大する(図2)。従って、がん幹細胞の増殖や生存を阻害することは腫瘍の縮小へと結びつくことから、次世代の抗がん剤治療の有望な標的となる。

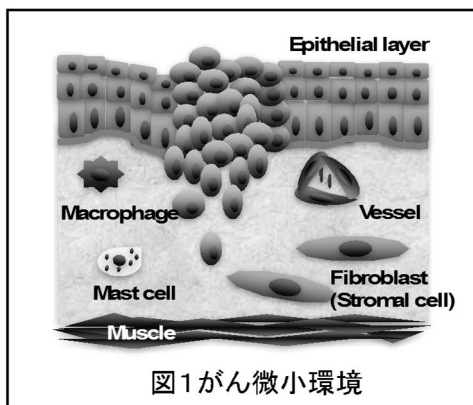


図1がん微小環境

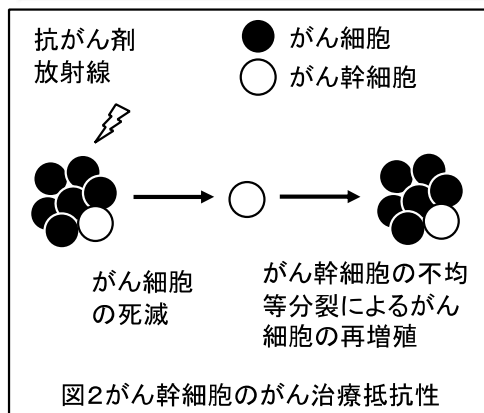


図2がん幹細胞のがん治療抵抗性

## 2. 研究の目的

免疫チェックポイント阻害薬の登場によって様々ながん種に対して臨床試験が行われ、メラノーマ、胃がんや一部の肺がんなどで承認されている。しかしながら免疫チェックポイント阻害薬は抗体医薬であるために治療費が高額になり、免疫チェックポイント阻害薬で治療効果が認められないがんが存在することから、依然として新しい抗がん剤の創製は必須である。本研究では、新しい抗がん剤の創製を目的として、『がん-間質相互作用』に着目した。腫瘍内のがん細胞は不均一な存在として明らかとなっており、中でも腫瘍の増殖、転移、薬剤耐性などに重要ながん幹細胞と間質細胞は腫瘍の進展、転移、薬剤耐性に重要であると考えられている。がん幹細胞と腫瘍内の正常細胞との相互作用については知見が乏しいことから、がん幹細胞の特性にどのような影響を与えているのかを解析していく。我々は肺の間質細胞由来の培養上清(conditioned medium: CM)が、がん細胞のスフェロイド形成や腫瘍の造腫瘍の亢進に影響を与えることを見出した(図1)。これらの結果はがん幹細胞の特性であり、CM中にごん幹細胞の維持・増殖に寄与する因子が存在することを意味している。我々はこのCM中の成分が

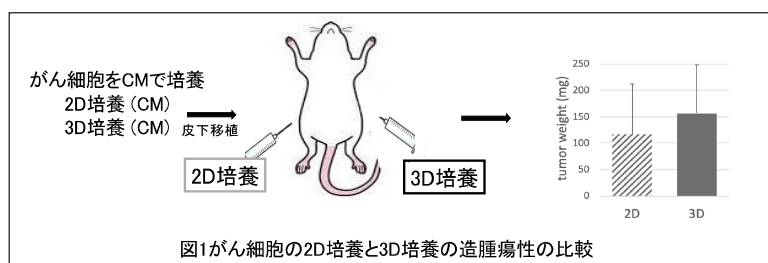


図1がん細胞の2D培養と3D培養の造腫瘍性の比較

ら候補因子を見出しており、この因子についてスフェロイド形成や幹細胞の特性の機能を *in vitro* で検証し、その機構を明らかにする。また、並行してがん細胞と間質細胞の共培養系を用いて、がん幹細胞の特性である足場非依存性増殖について、約 1000 の化合物ライブラリーや放線菌やカビなどの微生物代謝産物を添加してコントロール培地に比べて増殖が抑制されるヒットサンプルを見出す。対象とするがんは、間質細胞との混在が顕著に見られる肺がんとする。肺がんは国内外で罹患率が最も高く、既存薬に対して耐性化が頻繁に見られ、すい臓がんは 5 年生存率が 10% 未満と極めて予後が悪く最もアンメットメディカルニーズが高いがん種である。

### 3. 研究の方法

本研究では大きく分けて 間質細胞中に含まれるがん細胞のスフェロイド形成や腫瘍の造腫瘍の亢進に影響を与える因子の機能解析、 足場非依存性増殖を指標とした化合物ライブラリーや放線菌やカビなどの微生物代謝産物のスクリーニングの 2 つの研究を行う。

#### 間質細胞中に含まれるがん細胞のスフェロイド形成や腫瘍の造腫瘍の亢進に影響を与える因子の機能解析

間質細胞由来の CM が、がん細胞のスフェロイド形成や腫瘍の造腫瘍の亢進に影響を与える因子の候補として collagen VI を見出した。collagen VI がスフェロイド形成促進に寄与しているかを collagen VI の添加、また間質細胞の collagen VI の抑制によってスフェロイドの形成の変化を解析する。更に、3 つのサブユニットから構成される collagen VI のサブユニットの cDNA を PCR で増幅した後に、哺乳動物の発現ベクターに導入して、ヒトの細胞にトランスフェクションする。collagen VI のサブユニットのリコンビナントタンパク質が CM に発現することを確認して、がん細胞のスフェロイド形成を解析する。がん細胞のスフェロイド形成の際のがん幹細胞のマーカーの発現についてコントロール培地と間質細胞由来の CM で比較をする。

#### 足場非依存性増殖を指標とした化合物ライブラリーや放線菌やカビなどの微生物代謝産物のスクリーニング

すい臓がんや肺がん細胞についてがん幹細胞の特性の1つである足場非依存性増殖について、低接着プレートを用いて培養を行う(図1)。我々は、低接着プレートでがん細胞と間質細胞の共培養する際に、がん細胞の増殖のみを分泌型ルシフェラーゼの発言で評価する系を開発した。この評価系を用いて約1000の化合物ライブラリーや微生物の産生する代謝産物からスクリーニングを行う。

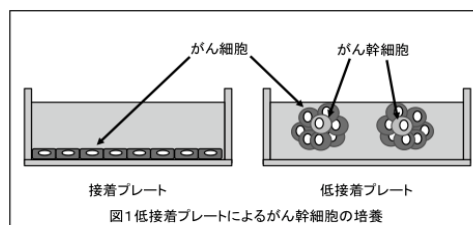


図1 低接着プレートによるがん幹細胞の培養

### 4. 研究成果

#### 間質細胞中に含まれるがん細胞のスフェロイド形成や腫瘍の造腫瘍の亢進に影響を与える因子の機能解析

がん細胞のスフェロイド形成や腫瘍の造腫瘍の亢進する候補因子として見出した間質細胞の CM 中に含まれる collagen VI について添加実験を行なった結果、低接着プレートを使用した肺がんやすい臓がん細胞株のスフェロイド形成(3D培養)が接着プレートを使用した培養(2D培養)での増殖に比べて増殖が促進されることが明らかとなった(図1)。肺由来の間

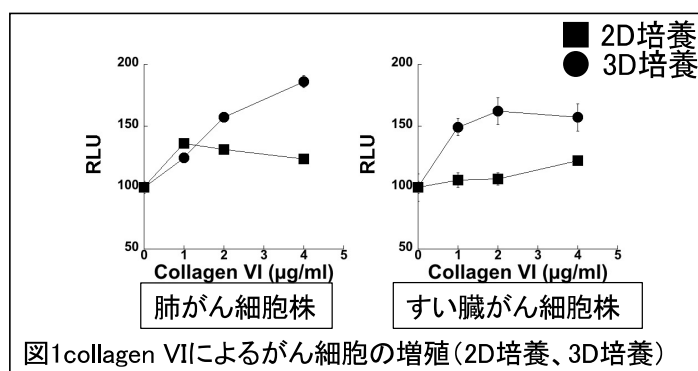


図1 collagen VIによるがん細胞の増殖(2D培養、3D培養)

質細胞について siRNA を用いて collagen VI のノックダウンした後に CM を調製した。この CM を使って低接着プレートで肺がん細胞を結果、コントロールの siRNA 処理した間質細胞の CM に比べてスフェロイド形成が抑制されることが明らかとなった。collagen VI は A1、A2、A3 の 3 つのサブユニットから構成されているが、これらのサブユニットのスフェロイド形成促進に対する役割を解析する目的で、HEK293 細胞に collagen VI の A1、A2、A3 を同

時に安定的に発現する細胞株を作成した。この細胞株から調製した CM によって肺がん細胞のスフェロイド形成が促進されることを見出した。がん細胞のスフェロイド形成時のがん幹細胞マーカータンパク質の発現についてコントロール培地と間質細胞由来の CM で比較検討した結果、CD44 タンパク質の発現が間質細胞由来の CM で上昇することが明らかとなった。

#### 足場非依存性増殖を指標とした化合物ライブラリーや放線菌やカビなどの微生物代謝産物のスクリーニング

低接着プレートを用いて肺がん細胞株やすい臓がん細胞株とそれぞれの臓器由来の間質細胞の共培養を行い、分泌型ルシフェラーゼの発光強度を測定する系で化合物ライブラリーや放線菌やカビの培養液からなる微生物代謝産物のスクリーニングを行なった。その結果、ミトコンドリア阻害剤ががん細胞の単独培養に比べて共培養で細胞毒性を示すことが明らかとなった。ミトコンドリア阻害剤は従来の接着プレートでは共培養で培地中の pH が酸性に傾くことが、がん細胞の生存に影響を与える。低接着プレートでも培地が酸性に傾くことからがん細胞のスフェロイド形成の抑制に接着プレートの場合と同様に作用していると考えられる。一方でイオノフォアとして知られる nigericin は低接着プレートでのみの単独培養に比べて共培養で細胞毒性を示すことが明らかとなった。この結果は、スフェロイド形成特異的に作用することを示唆しており、イオノフォア以外の標的が存在することが考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Tatsuda, D., Amemiya, M., Sawa, R. Momose, I., Kawada, M.	4. 巻 74
2. 論文標題 Quinofuracins F - I, new quinofuracin derivatives produced by Staphylotrichum boninense PF1444	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Antibiot.	6. 最初と最後の頁 758-762
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41429-021-00452-z	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Daisuke Tatsuda, Chisato Nosaka, Manabu Kawada
2. 発表標題 Identification of stromal cells-derived stimulating factors of spheroid formation of cancer cells.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 立田大輔、吉田潤次郎、川田学
2. 発表標題 すい臓がん細胞と間質細胞の共培養によるキナーゼ阻害剤耐性機構の解析
3. 学会等名 第25回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 立田大輔、吉田潤次郎、大石智一、川田学
2. 発表標題 すい臓癌細胞の3D増殖に与える間質細胞の役割
3. 学会等名 第24回 日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Daisuke Tatsuda, Junjiro Yoshida, Tomokazu Ohishi, Manabu Kawada
2. 発表標題 Analysis of pancreatic tumor-stromal cell interactions in 3D culture condition
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

公益財団法人微生物化学研究所 <a href="https://www.bikaken.or.jp">https://www.bikaken.or.jp</a>
---

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