

令和 6 年 5 月 1 日現在

機関番号：81303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K08430

研究課題名（和文）肝細胞癌における新規静止期がん幹細胞の同定および治療応用

研究課題名（英文）Development of a new therapy to target the dormant cancer stem cell in patients with hepatocellular carcinoma

研究代表者

玉井 恵一（Tamai, Keiichi）

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター（研究所）・がん幹細胞研究部・部長

研究者番号：40509262

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）：近年、癌組織の中に「癌幹細胞」の存在が報告されている。癌幹細胞は静止期（G0期）に存在するため、抗癌剤や放射線照射に対して強い耐性を持ち、治療抵抗性の主因を担っている。従って、静止期に存在する癌幹細胞を通常の細胞周期に誘導できれば、効果的な癌治療に結びつく。私たちは、肝臓がんにおいてBEX2が静止期維持に重要であることを見出した。さらにBEX2発現を低下させる化合物を同定し、これによって抗癌剤感受性を増加させることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの固形がんは、抗癌剤の効果に乏しく難治性である。私たちの研究は肝臓がんにおいて、新しい治療標的を確立できると可能性を見出した。肝臓がんの中にある一部の静止期にとどまるがん細胞にとって重要なタンパクを同定し、このタンパク発現を変化させれば治療効果が増大する可能性を明らかにした。臨床応用のためにはさらなる知見の蓄積が必要である。

研究成果の概要（英文）：In recent times, "cancer stem cells" have been identified. Because cancer stem cells are believed to exist in the dormant phase (G0 phase), they are highly resistant to anticancer drugs and irradiation and are the primary cause of treatment resistance. Thus, the induction of quiescent cancer stem cells into the normal cell cycle will result in effective cancer therapy. We discovered that BEX2 plays a vital role in maintaining quiescence in liver cancer. We have also identified a compound that reduces BEX2 expression, leading to increased sensitivity to anticancer drugs.

研究分野：がん生物学

キーワード：肝細胞癌

1. 研究開始当初の背景

近年、癌組織の中に「癌幹細胞」の存在が報告されている。癌幹細胞は静止期(G0期)に存在するため、抗癌剤や放射線照射に対して強い耐性を持ち、治療抵抗性の主因を担っている。従って、静止期に存在する癌幹細胞を通常の細胞周期に誘導できれば、効果的な癌治療に結びつく。血液癌においてはFbw7分子が静止期の維持に重要であることが示されている。しかし、固形癌における静止期の維持に関しては、多くの点が未解明のままである。私たちは、癌幹細胞関連遺伝子を同定するために、免疫不全マウスでの造腫瘍能を指標にスクリーニングを行った(申請書後半に詳述)。その結果、BEX2遺伝子が候補として挙がった。癌細胞株を用いた解析の結果、BEX2はミトコンドリア機能を抑制することで、代謝を低エネルギー状態に移行させ静止期に留まることで、抗癌剤耐性や異種移植に対する生存率の高さ(造腫瘍能)が発揮されると考えられた(日本癌学会で発表、投稿準備中)。実際の臨床検体を用いてこの現象をスクリーニングしたところ、肝細胞癌の免疫染色では、BEX2陽性細胞はほぼ完全にKi67陽性細胞と排他的であり、肝細胞癌においてBEX2陽性細胞は静止期幹細胞であると考えられた。

2. 研究の目的

上記の知見により、BEX2依存性経路を障害することができれば、癌幹細胞を非癌幹細胞に誘導できる。そこに従来の抗癌剤を併用する。これにより、肝細胞癌の完全な駆逐が可能になると考える。本課題では、ミトコンドリアを標的とした新たな「癌幹細胞駆逐治療」を実現するためのproof of conceptを取得する。BEX2ノックアウトマウスが健康であることから、癌のみで機能していると考えられるBEX2を標的とすることで、「ミトコンドリアを介した静止期細胞制御」という、学術的にも新たな知見を加えられると考える。

3. 研究の方法

BEX2レポーター細胞による内因性BEX2のモニター

BEX2は細胞内に局在するため、生細胞を抗BEX2抗体で染めて分離することができない。これまでの検討はノックダウンあるいは強制発現系を用いていたが、詳細な解析を行うためには内因性BEX2のモニター系が必要である。ゲノム上のBEX2配列の下流にIRES-GFP-T2A-LucをCRISPR-Cas9を用いて挿入し、BEX2タンパク発現と同時にGFPが発現する系を樹立する。樹立出来れば、癌幹細胞形質(造腫瘍能・抗癌剤感受性・ALDH活性・ROS活性・細胞周期)を検討し、GFP発現の有無で差異があるか解析する。

BEX2ノックアウトマウスを用いた肝細胞癌発癌モデルの解析

BEX2ノックアウトマウスは紙谷博士から分与済である。ジエチルニトロソアミンで肝細胞癌を発がんさせる。発がんの頻度・腫瘍の大きさを野生型とノックアウトマウスで比較する。また、BEX2免疫染色(GFPでラベルされている)を行い、腫瘍内のBEX2陽性細胞の局在を検討する。また、Ki67との共局在を評価し、BEX2陽性細胞が非増殖期であることを確認する。

BEX2阻害剤の探索

私たちは既に、BEX2と会合するミトコンドリアタンパクXを同定済である。この両者の結合を阻害できれば、ミトコンドリア機能の抑制を解除することができ、癌幹細胞形質を消失させることができる。この会合阻害剤をスクリーニングするためのアッセイ系を確立する。それぞれのリコンビナントタンパクを作成し、蛍光タンパク(mClover, mRuby2)と融合させる。片方をプレートに附着させ、もう片方を作用させる。この時に、化合物ライブラリを同時投与し、会合を阻害させる。会合阻害の有無は、蛍光タンパクのFRETで計測する。化合物は東京大学創薬機構・東北大学薬学部から提供を受ける。

4. 研究成果

BEX2レポーター細胞による内因性BEX2のモニター

293T細胞にCRISPR-Cas9システムを用いて、BEX2プロモーター領域の下流にEGFPを挿入した。作製した細胞を用いて、EGFPの発光強度でソーティングした結果、EGFP高発現細胞ではBEX2 mRNAが高発現していることがわかった。この系を用いて、胆管癌あるいは肝細胞癌細胞株で同様の細胞を作成しようと試みたが、導入効率が低く、またプロモーター活性も低いことから、レポーター細胞の作成は困難であった。

BEX2ノックアウトマウスを用いた肝細胞癌発癌モデルの解析

ジエチルニトロソアミンによる発がんは長期間に渡ることから、hydrodynamic 法を用いて、肝細胞にがん遺伝子発現プラスミドを導入させて発がんさせる系を確立した。肝細胞癌のおおきさをコントロールとノックアウトマウスで比較したところ、ノックアウトマウスでは腫瘍が小さくなる傾向にあったが有意ではなかった。

BEX2 阻害剤の探索

BEX2 と会合するタンパクとの複合体を阻害する化合物探索の前に、BEX2 タンパクそのものの発現を低下させる化合物探索を行った。BEX2 タンパクをルシフェラーゼでモニターできる細胞を樹立した。これを用いて、東京大学創薬機構から供与された 9600 化合物をスクリーニングした。その結果、BEX2 タンパクを減少させる化合物を 2 種同定した。そのうちのひとつは、胆管がん細胞株・肝細胞癌細胞株でも BEX2 タンパクを減少させることができ、さらに化合物投与下ではシスプラチン感受性が増加した。

以上から、BEX2 を阻害することで治療効果が得られることを予想させる結果を得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Tamai Keiichi, Nakamura-Shima Mao, Shibuya-Takahashi Rie, Kanno Shin-Ichiro, Yasui Akira, Mochizuki Mai, Iwai Wataru, Wakui Yuta, Abue Makoto, Yamamoto Kuniharu, Miura Koh, Mizuma Masamichi, Unno Michiaki, Kawamura Sadafumi, Sato Ikuro, Yasuda Jun, Yamaguchi Kazunori, Sugamura Kazuo, Satoh Kennichi	4. 巻 10
2. 論文標題 BEX2 suppresses mitochondrial activity and is required for dormant cancer stem cell maintenance in intrahepatic cholangiocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-78539-0	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 Morita Shinkichi, Mochizuki Mai, Shibuya-Takahashi Rie, Nakamura-Shima Mao, Yamazaki Tomoko, Imai Takayuki, Asada Yukinori, Matsuura Kazuto, Kawamura Sadafumi, Yamaguchi Kazunori, Yasuda Jun, Sugamura Kazuo, Katori Yukio, Satoh Kennichi, Tamai Keiichi	4. 巻 39
2. 論文標題 Establishment of a Monoclonal Antibody That Recognizes Cysteine-Rich Domain 1 of Human CD271	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 6~11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/mab.2019.0040	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 Hatsuzawa Yuuri, Yamaguchi Kazunori, Takanashi Tomoka, Sato Ikuro, Tamai Keiichi, Mochizuki Mai, Iwai Wataru, Wakui Yuta, Abue Makoto, Yamamoto Kuniharu, Yasuda Jun, Mizuma Masamichi, Unno Michiaki, Sugamura Kazuo	4. 巻 20
2. 論文標題 CD109 promotes the tumorigenic ability and metastatic motility of pancreatic ductal adenocarcinoma cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pancreatology	6. 最初と最後の頁 493~500
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pan.2020.01.013	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 Fukushi Daisuke, Shibuya Takahashi Rie, Mochizuki Mai, Fujimori Haruna, Kogure Takayuki, Sugai Takahiro, Iwai Wataru, Wakui Yuta, Abue Makoto, Murakami Kazuhiro, Nakamura Yasuhiro, Yasuda Jun, Yamaguchi Kazunori, Sugamura Kazuo, Shibata Chikashi, Katayose Yu, Satoh Kennichi, Tamai Keiichi	4. 巻 112
2. 論文標題 BEX2 is required for maintaining dormant cancer stem cell in hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4580 ~ 4592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15115	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0件

〔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
---------	---------