

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03756

研究課題名（和文）胆管癌における、静止期癌幹細胞維持を破綻させる治療開発

研究課題名（英文）Dormant cancer stem cell-targeting therapy for cholangiocarcinoma

研究代表者

片寄 友（Kayayose, Yu）

東北医科薬科大学・医学部・教授

研究者番号：20302151

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：胆管がんは治療法に乏しい難治がんである。私たちは新しい治療標的を同定するために、がん幹細胞に着目して研究を始めた。スクリーニングの結果、BEX2遺伝子が静止期がん幹細胞を維持するために必要であることがわかった。この分子は、胆管がんだけでなく、肝細胞がん・胃がんにおいても悪性度を亢進させる分子であることがわかった。小分子化合物スクリーニングの結果、BEX2タンパクを分解する化合物を同定し、この化合物によって静止期細胞が減少し、抗癌剤感受性が増加することがわかった。以上のことから、BEX2は治療標的として有効であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、幾多の抗癌剤が臨床の現場で使用されてきたが、抗癌剤によって癌を完治させることはほぼ不可能であった。この原因として考えられている癌幹細胞の存在であり、今回私たちは新しい治療標的をみつけ、これまで不可能であった静止期の癌幹細胞を標的とした治療が可能となった。この分子は、胆管がんばかりでなく肝細胞がん、胃がんにおいても同様な効果が得られ、幅広い癌腫に対する臨床応用の可能性に期待できる。

研究成果の概要（英文）：Cholangiocarcinoma is a refractory cancer with few treatment options. We focused on cancer stem cells to identify novel therapeutic targets in cholangiocarcinoma. We found that the BEX2 gene is required for the maintenance of dormant cancer stem cells. This molecule also increased malignancy not only in cholangiocarcinoma but also in hepatocellular carcinoma and gastric cancer. Small molecule screening identified a hit compound that degraded the BEX2 protein, and this compound reduced dormant cells and increased sensitivity to chemotherapy. Based on these findings, BEX2 may be an effective therapeutic target.

研究分野：消化器外科

キーワード：がん幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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 (G_0 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非癌幹細胞に、すなわち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、胆管癌における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。その結果、BEX2 遺伝子が候補として挙がった。BEX2 をノックダウンすると造腫瘍能が著しく低下し、抗癌剤感受性が上昇した。興味深いことに、この BEX2 は G_0 期 (静止期) の細胞に高発現していることが判明し、実際、BEX2 をノックダウンすると静止期の細胞が著しく減少することが分かった。

BEX2 は、これまで乳癌やグリオーマで癌の悪性度に関わる報告がみられるが、正確な機能は不明であった。申請者は、BEX2 の機能を解析するために、会合タンパクの同定を pull down アッセイで行った。その結果、ミトコンドリアタンパク TUFM との会合を見いだした。BEX2 がミトコンドリアに影響するかをフラックスアナライザーにて検討したところ、ミトコンドリアの酸化的リン酸化に伴う酸素消費速度 (OCR) は BEX2 をノックダウンすると有意に上昇した。

以上のことから、BEX2 は TUFM を介してミトコンドリア機能を抑制し、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、抗癌剤耐性が発揮されると考えられた。

2. 研究の目的

・ BEX2 はこれまでほとんど報告のない分子である。BEX2 が胆管がん以外でも重要な役割を果たすかどうか、癌種を広げて検討する。

・ BEX2 からのシグナルを阻害できれば、治療抵抗性細胞が減少して従来の抗がん剤や放射線治療に対する感受性が亢進することが予測される。BEX2 シグナルを阻害する小分子化合物を同定する。

3. 研究の方法

・ 肝細胞がん・胃がんを対象に研究を進めた。それぞれの細胞株および臨床検体を用いて検討を進めた。BEX2 の機能性検討のために、siRNA、過剰発現の系を用いた。がん幹細胞性の検討のために、スフェア形成能・ALDH 活性・細胞周期・抗癌剤耐性などを調べた。公共データベースである TCGA, GEO から肝細胞がん・胃がんの解析データをダウンロードし、BEX2 に着目して再解析した。

・ BEX2 タンパクを分解する化合物を同定するために、スクリーニング系を構築した。BEX2 タンパクにルシフェラーゼを融合させ、分解に従って発光が減少することを確認した。東京大学創薬機構から 9600 化合物の提供を受け、スクリーニングを行った。ルシフェラーゼ活性を指標に、候補化合物を絞り込んだ。候補化合物の検証を行うために、細胞株 (HuCCT1, HLE, Huh7) を用いて、ウェスタンブロット・細胞周期・ATP 活性・抗癌剤耐性を調べた。

4. 研究成果

・ 肝細胞がんに関しては以下のことが明らかになった。肝細胞がん手術症例において、BEX2 高発現症例は予後不良であった。手術組織において、BEX2 陽性細胞は Ki67 陽性細胞と排他的に存在した。細胞株において、BEX2 をノックダウンするとがん幹細胞形質 (スフェア形成能・ALDH 活性) が減弱し、BEX2 過剰発現細胞ではその逆であった。BEX2 をノックダウンすると、シスプラチン感受性が亢進した。

・ 胃がんに関しては以下のことが明らかになった。胃がん症例において、BEX2 高発現症例は予後不良であった。細胞株を用いてスフェア形成させると、BEX2 発現は更新した。BEX2 をノックダウンすると、ALDH 活性が低下し、シスプラチン感受性が亢進した。網羅的解析の結果、BEX2 と CHRN2 (cholinergic receptor nicotinic beta 2 subunit) が共発現することがわかった。BEX2 によって CHRN2 の転写量が増えることがわかり、CHRN2 をノックダウンすると ALDH 活性が低下することがわかった。

・ 小分子化合物スクリーニングに関しては以下の結果を得た。ルシフェラーゼを用いた BEX2 分解料をモニターする系を樹立し、9600 化合物のスクリーニングを行った。その結果、一つの化合物を同定した。同化合物で細胞株を処理すると、BEX2 mRNA は変化なく、BEX2 タンパクが減少

し、静止期細胞が減少し、細胞内 ATP が増加し、抗癌剤感受性が増加した。

以上のことから、BEX2 は胆管がんに加え肝細胞がん・胃がんでも悪性度を亢進させる分子であることがわかった。小分子化合物スクリーニングの結果、BEX2 を標的とした治療が可能であることを細胞株で示すことができた。今後は *in vivo* の検討を増やし、臨床応用に向けた研究を進める必要がある。

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 Saijoh S, Nakamura-Shima M, Shibuya-Takahashi R, Ito R, Sugawara A, Yamazaki T, Imai T, Asada Y, Matsuura K, Iwai W, Wakui Y, Abue M, Kawamura S, Katayose Y, Fujimori H, Mochizuki M, Yasuda J, Yamaguchi K, Sugamura K, Satoh K, Katori Y, Tamai K	4. 巻 537
2. 論文標題 Discovery of a chemical compound that suppresses expression of BEX2, a dormant cancer stem cell-related protein	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 132 ~ 139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.11.022	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 -

1. 著者名 Yasumoto Akihiro, Fujimori Haruna, Mochizuki Mai, Shibuya-Takahashi Rie, Nakamura-Shima Mao, Shindo Norihisa, Yamaguchi Kazunori, Fukushi Daisuke, Wakui Yuta, Sugai Takahiro, Iwai Wataru, Abue Makoto, Sato Ikuro, Satoh Kennichi, Katayose Yu, Yasuda Jun, Shibata Chikashi, Tamai Keiichi	4. 巻 655
2. 論文標題 BEX2 is poor prognostic factor and required for cancer stemness in gastric cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 59 ~ 67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.03.025	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福士大介、玉井恵一、小暮高之、片寄友、佐藤賢一
2. 発表標題 BEX2は肝臓癌における静止期癌幹細胞維持分子である
3. 学会等名 第56回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2020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	山本 久仁治 (Yamamoto Kuniharu) (00375073)	東北医科薬科大学・医学部・准教授 (31305)	
研究分担者	高見 一弘 (Takami Kazuhiro) (30823728)	東北医科薬科大学・医学部・講師 (31305)	
研究分担者	玉井 恵一 (Tamai Keiichi) (40509262)	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 (81303)	

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