

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09023

研究課題名(和文)オートファジーによる静止期大腸がん幹細胞の維持機構の解明

研究課題名(英文)Autophagy provides a quiescent state in colon cancer stem cells

研究代表者

大畑 広和 (Ohata, Hiromasa)

帝京大学・先端総合研究機構・講師

研究者番号：40570057

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)：大腸がん組織には、高い造腫瘍能や治療抵抗性を有するがん幹細胞が存在し、がんの発生や再発、転移に深く関与していると考えられている。これまでに我々は、ヒト原発大腸がんより樹立した大腸がん幹細胞を用いた種々の研究により、大腸がん幹細胞には増殖型と静止型のがん幹細胞が存在し、後者の細胞が強い治療抵抗性を示すことを見出した。

本研究により、オートファジー活性の高い大腸がん幹細胞は静止期にあり、大腸がんに対する既存の抗がん剤処方に抵抗性を示すことを明らかにした。また、抗がん剤とオートファジー阻害剤の同時処理により、培養大腸がん幹細胞(オルガノイド)の増殖を相乗的に抑制することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸がんの根治を目指すためには、治療抵抗性を担う大腸がん細胞を特定し、その細胞を標的とした新しい治療法の開発が強く望まれている。本研究により、静止期にあるがん幹細胞がオートファジー活性が高く、抗がん剤に強い抵抗性を示すことが明らかとなった。また、大腸がんに対する既存の抗がん剤とオートファジー阻害剤の併用により、相乗的に大腸がん細胞の増殖を抑制することがわかった。以上の研究成果は、大腸がんの治療抵抗性の克服、ひいては大腸がんの根治への道標となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Cancer tissue represent the intratumoral heterogeneity, and the resistance to anti-cancer therapy is often attributed to slow-cycling persister populations with cancer stem cell (CSC)-like features. We previously identified the heterogeneity in colon CSCs from patient-derived organoids and xenografted tumors and demonstrated that while the NOX1-mTORC1 pathway is responsible for proliferation of a fast-cycling population of cancer cells, PROX1 expression is required for a persister-like slow-cycling population of CSCs. Here we demonstrated that enhanced autophagic activity mediated by mTORC1 inhibition induced PROX1 expression. Induction of PROX1 in turn inhibited NOX1-mediated mTORC1 activation, thus providing the quiescent state via a feedback regulation. Inhibition of autophagy synergized with mTORC1 inhibition to block cancer proliferation.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：がん幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

国民の二人に一人が「がん」に罹患する現代において、がんを根治する革新的な治療法の開発は急務の課題である。種々の難治固形がん組織、とりわけ大腸がん組織において、「がん幹細胞」を頂点とした分化階層性が存在し、がん幹細胞が造腫瘍性、治療抵抗性の根源であり、がんの再発・転移に深く関与していると考えられている。それ故、大腸がんの治療抵抗性を克服する方法として、がん幹細胞を標的とした治療法の開発が強く望まれている。

これまでに、我々はヒト原発大腸がんより樹立した大腸がん幹細胞を用いた種々の研究により、大腸がん幹細胞には増殖型と静止型のがん幹細胞が存在し、後者の細胞が強い治療抵抗性を示すことを見出した。また、オートファジー抑制因子である mTOR の活性化が大腸がん幹細胞の増殖に必須である事を明らかにした。以上のことより、抗がん剤等に治療抵抗性を示すような静止型がん幹細胞では、mTOR 活性は抑制され、オートファジーが活性化していることが示唆されていた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、静止期にある大腸がん幹細胞とオートファジー活性化との相互関係を明らかにし、静止期大腸がん幹細胞をターゲットとした治療薬の開発に繋げることである。すなわち、増殖中のがん幹細胞を含む大部分のがん細胞を殺傷する既存の抗がん剤と、本研究により見出した静止期がん幹細胞を標的とした治療薬との併用により、大腸がんの根治を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) オートファジー活性と大腸がん細胞特性の相互関係性の解析

まず、オートファジーの活性化状態をモニタリングできる大腸がん幹細胞を樹立した。次に、オートファジー活性の異なる細胞をフローサイトメーターにより分取し、静止期マーカーや細胞周期マーカーの発現を網羅的な遺伝子発現解析 (RNA-seq 解析) 定量的 PCR やウエスタンブロット等により検証した。その結果、オートファジー活性の高い大腸がん幹細胞が静止期にあることが明らかとなった。

### (2) 増殖型と静止期がん幹細胞の相互関係性の解析

増殖期にある大腸がん幹細胞は、mTOR 活性が高く、オートファジーが抑制されている。一方で、静止期がん幹細胞においては、PROX1 の発現が高く、オートファジー活性が高い。そこで、増殖型と静止期がん幹細胞の相互関係性について解析を行った。

mTOR 経路の阻害によりオートファジーが活性化し、PROX1 の発現が上昇すること、PROX1 の発現誘導により、mTOR 活性が抑制され、細胞増殖が停止することを見出した。すなわち、増殖型と静止型のがん幹細胞は相互にフィードバックにより制御されていることがわかった。

また、大腸がんオルガノイドやマウス移植腫瘍を用いた免疫染色により、増殖型と静止型のがん幹細胞は相互排他的に存在していることが明らかとなった。

### (3) オートファジー阻害剤と既存の抗がん剤の併用による大腸がん抑制効果の検証

オートファジー経路の阻害は治療抵抗性が高い静止期大腸がん幹細胞を標的とすることが期待される。大腸がんに対する既存の抗がん剤とオートファジーの阻害剤の併用により、大腸がん細胞が死滅するかを検証した結果、相乗的に大腸がん細胞の増殖が抑制されることが明らかとなった。

## 4. 研究成果

本研究により、オートファジー活性の高い大腸がん幹細胞は静止期にあること、大腸がんに対する既存の抗がん剤処理により残存する治療抵抗性細胞はオートファジー活性が高い静止期大腸がん幹細胞であることがわかった。また、大腸がんに対する既存の抗がん剤とオートファジー阻害剤の同時処理により、培養大腸がん幹細胞の増殖を相乗的に抑制することを明らかにした。

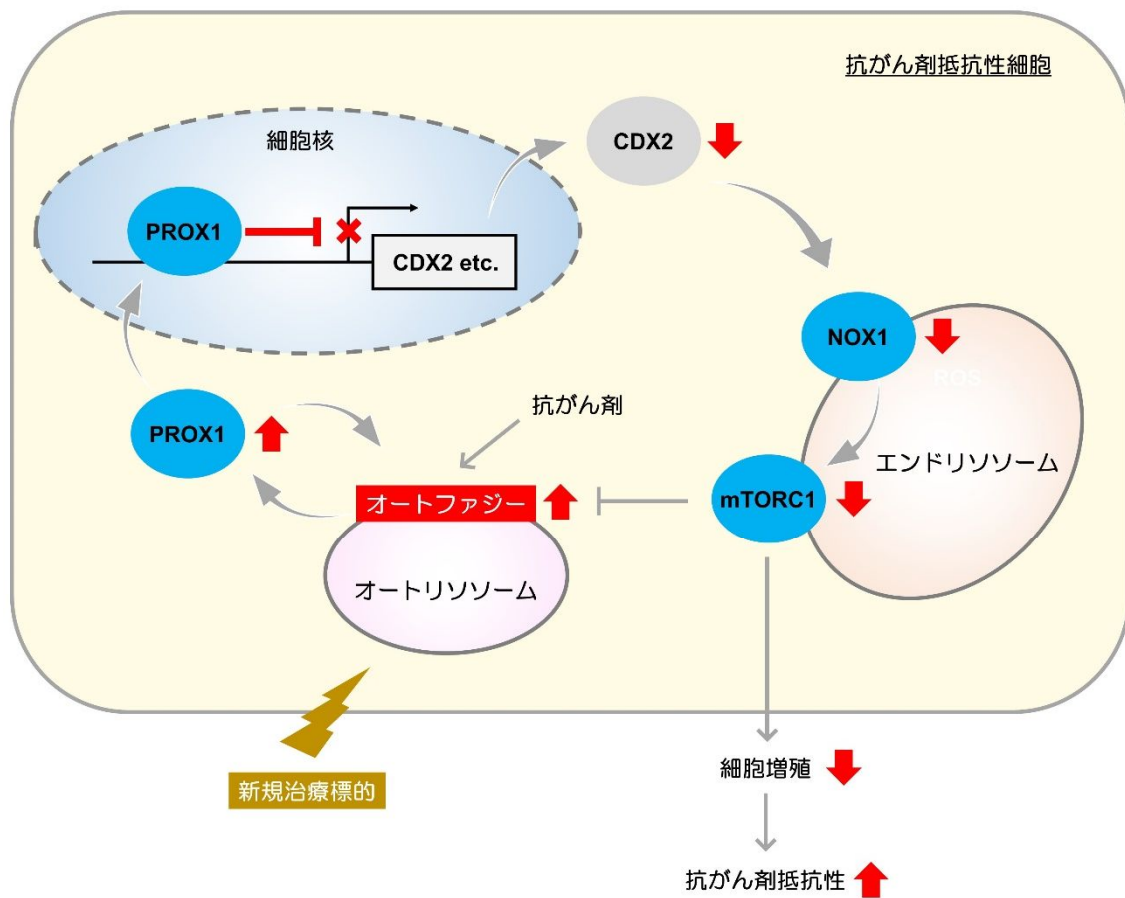


図1 抗がん剤抵抗性獲得の分子メカニズム

抗がん剤投与によるオートファジーの活性化により、PROX1の発現が誘導される。PROX1はNOX1-mTORC1経路を抑制し、がん細胞の増殖を停止させることにより、抗がん剤に対する抵抗性の獲得に寄与する。オートファジー経路の阻害剤と抗がん剤の併用により、がん細胞の増殖を相乗的に阻害できる。

## 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 1件）

1. 著者名 Kanda Yusuke, Ohata Hirokazu, Miyazaki Toshiaki, Sakai Hiroaki, Mori Yutaro, Shiokawa Daisuke, Yokoi Akira, Owa Takashi, Ochiai Atsushi, Okamoto Koji	4. 巻 586
2. 論文標題 NF- B suppression synergizes with E7386, an inhibitor of CBP/ -catenin interaction, to block proliferation of patient-derived colon cancer spheroids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 93 ~ 99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.11.063	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 Miyazaki Toshiaki, Chung Suyoun, Sakai Hiroaki, Ohata Hirokazu, Obata Yuuki, Shiokawa Daisuke, Mizoguchi Yukihiro, Kubo Takashi, Ichikawa Hitoshi, Taniguchi Hirokazu, Aoki Kazunori, Soga Tomoyoshi, Nakagama Hitoshi, Okamoto Koji	4. 巻 113
2. 論文標題 Stemness and immune evasion conferred by the TD02 AHR pathway are associated with liver metastasis of colon cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 170 ~ 181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15182	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 Shiokawa Daisuke, Sakai Hiroaki, Ohata Hirokazu, Miyazaki Toshiaki, Kanda Yusuke, Sekine Shigeki, Narushima Daichi, Hosokawa Masahito, Kato Mamoru, Suzuki Yutaka, Takeyama Haruko, Kambara Hideki, Nakagama Hitoshi, Okamoto Koji	4. 巻 80
2. 論文標題 Slow-Cycling Cancer Stem Cells Regulate Progression and Chemoresistance in Colon Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 4451 ~ 4464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-20-0378	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 Ueda Haruka, Mori Yutaro, Yamawaki Kaoru, Ishiguro Tatsuya, Ohata Hirokazu, Sato Ai, Sugino Kentaro, Yachida Nozomi, Yamaguchi Manako, Suda Kazuaki, Tamura Ryo, Yoshihara Kosuke, Okamoto Koji, Enomoto Takayuki	4. 巻 2
2. 論文標題 Establishment of in vitro 3D spheroid cell cultivation from human gynecologic cancer tissues	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100354 ~ 100354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2021.100354	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 大畑広和、塩川大介、岡本康司
2. 発表標題 PROX1 induction by autophagy provides a persister-like state via repression of NOX1-mTORC1 pathway in colon cancer cells
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大畑広和、宮崎利明、岡本康司	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 128
3. 書名 治療標的としてのがん幹細胞	

〔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
---------	---------