

令和 6 年 9 月 9 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17687

研究課題名（和文）内分泌細胞由来大腸癌に対する新規治療法の探索

研究課題名（英文）Development of novel therapies for endocrine cell originated colorectal cancer

研究代表者

向山 順子（Mukohyama, Jyunko）

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：70734987

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：CDX2低発現大腸癌は術後再発が多い予後が不良な大腸癌のサブタイプである。申請者はCDX2低発現大腸癌のライブ・シングルセルRNA-Seq.解析を確立することで、同大腸癌がAPC遺伝子非依存性の発癌機構や内分泌系細胞などの特有の細胞系譜をもつことを明らかにした。また、動物モデルと臨床検体のオミックス解析により、CDX2低発現大腸癌の発癌に慢性炎症が関与する可能性を見出した。血液腫瘍では細胞由来による疾患分類や治療選択が標準化されており、本研究の成果は固形癌では初となる細胞系譜に基づく最適化治療の確立につながる可能性を持つ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦における大腸癌による死亡数はこの20年間で2.5倍と増加の一途にあり、現在では年間5万人を超えている。死因の大半は転移や再発によるものであり、これらの制御機構の解明は、大腸癌の予後改善のための重要課題である。

本研究では根治切除後の転移再発が多い大腸癌のサブタイプであるCDX2低発現大腸癌の細胞起源に着目した解析をおこなった。血液腫瘍では細胞由来による疾患分類や治療選択が標準化されており、本研究の成果も大腸癌の予後改善に貢献できる可能性を持つ。

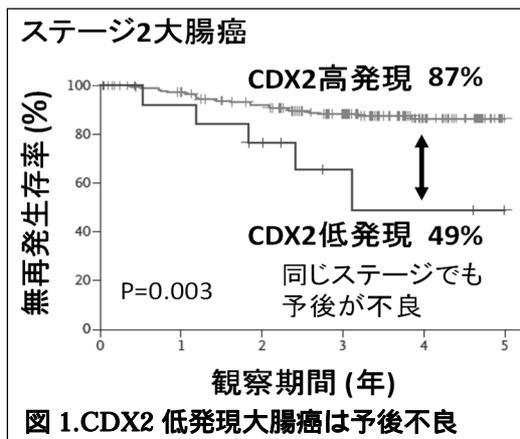
研究成果の概要（英文）：CDX2Low colorectal cancer (CRC) is a subtype of colorectal cancer with a poor prognosis with frequent postoperative recurrence. By establishing live single-cell RNA-Seq. analysis of CDX2Low CRC, the applicant has shown that this colorectal cancer has a unique cell lineage, including an APC gene-independent oncogenic mechanism and endocrine cells. Omics analysis of animal models and clinical specimens also revealed a possible involvement of chronic inflammation in the carcinogenesis of CDX2LowCRC. Disease classification and treatment selection based on cellular origin has been established in hematological malignancies, and the results of this study may lead to the establishment of optimized treatment based on cell lineage for the first time in solid tumor.

研究分野：消化器外科

キーワード：大腸癌 最適化治療

### 1. 研究開始当初の背景

大腸癌の予後不良なサブタイプとして、腸管の発生や維持に不可欠なマスター遺伝子であるホメオボックス転写因子 CDX2 の発現が低下した大腸癌が注目されている。CDX2 低発現大腸癌は通常は根治切除のみで経過が良好であるステージ2の病期でも極めて予後が悪く転移再発率が高い(Dalerba P et al. N Engl J Med 2016) (図 1)。一つの大腸癌組織にも多数のサブクローンが存在し、転移や治療抵抗性などの性質の決定に関わることが示されつつあり(McGranahan N et al. Cell 2017)、CDX2 低発現大腸癌の高い転移再発能の根幹にある分子機構の解明のためには、同大腸癌を構成する癌細胞の単細胞レベルでの解析が必要となる。



### 2. 研究の目的

CDX2 低発現大腸癌の細胞系譜解析により、固形癌では初となる細胞系譜に基づく最適化治療の確立を行う。

### 3. 研究の方法

本研究計画は、申請者が 2017 年度から Columbia 大学 Dalerba 研究室で進めた解析に、機能評価や薬効試験など臨床応用を目指した解析を取り入れた発展的研究である。以下の全ての研究を 2020 年度からの 3 年間に申請者が神戸大学大学院医学研究科で行う。

#### 2020 年度 (1 年目)

**(1)CDX2 低発現大腸癌臨床検体の細胞系譜解析:** 腸陰窩に LGR5 陽性幹細胞と交互に存在する Paneth 細胞は小腸特異的な少数の内分泌系細胞で、リゾチームなどの抗菌成分を分泌し腸管免疫の恒常性を維持する。また、WNT3 や EGF、Notch シグナルのリガンドである DLL4 などの幹細胞維持蛋白質を発現し、腸管上皮幹細胞のニッチとしても重要な役割を担う。申請者らは CDX2 低発現大腸癌異種移植マウスの腫瘍をシングルセル RNA-Seq. 解析することで、LYZ や DEFA などの Paneth 細胞の遺伝子特性をもつ細胞が多くを占めることを明らかにした(図 2)。一方で CDX2 の発現が高い通常の大腸癌では、Paneth 細胞の増殖は認めなかった。TCGA のデータ解析でも、CDX2 低発現大腸癌では Paneth 細胞関連遺伝子 (LYZ, DEFA) の発現が高い傾向にあった。申請者らはすでに大腸癌臨床検体でも同様の解析を進め、ヒトの CDX2 低発現大腸癌でも Paneth 細胞の特徴的な増殖を認めることを明らかにしており、本研究ではさらに症例数を重ねた詳細な解析を行う。CDX2 低発現大腸癌における Paneth 細胞の特徴的な増加は、早期転移など臨床学的特徴の背景にある分子機構の一つである可能性が示唆される。

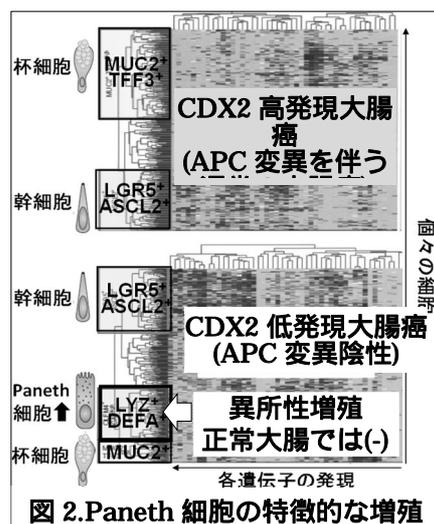


図 2. Paneth 細胞の特徴的な増殖

**(2)腸管内分泌系細胞の細胞表面マーカーの同定:** 小腸上皮は吸収上皮細胞と内分泌系

細胞（上皮内分泌細胞，杯細胞、Paneth細胞）前駆細胞、幹細胞から構成される。しかし、現在広く用いられている細胞表面マーカーCD44 や CD24 による標識では複数の細胞集団の分離は可能であるが、高い純度で各細胞を特異的に分離する手法は確立されていない。そこで本研究では、各内分泌系細胞の細胞表面マーカーの同定のためにヒト正常小腸のシングルセル RNA-Seq.解析を行う。具体的には、右側結腸癌摘出術で合併切除した正常小腸を単細胞に分離し、セルソーターにて腸管の上皮細胞の大半を占める吸収上皮細胞 (EpCAM<sup>+</sup>/CD66<sup>high</sup>/CD44<sup>low</sup>) を除去した細胞集団 (EpCAM<sup>+</sup>/CD66<sup>low</sup>/CD44<sup>high</sup>) の解析を行う。マウス小腸を用いた予備解析では、Paneth 細胞に特徴的な細胞表面マーカーとして MUC1, ALCAM を見出しており、特にこれらの発現に着目した解析を行う。

## 2021 年度 (2 年目)

**(3)CDX2 低発現大腸癌組織中の各細胞集団の分離:**申請者のこれまでの検討により、CDX2 低発現大腸癌は慢性炎症による大腸の「小腸上皮化生」を発癌母地とし(「2.本研究の着想に至った経緯など」参照)、Paneth 細胞をはじめとした小腸内分泌系の細胞系譜をもつ細胞が特徴的に増加することが明らかになりつつある。そこで本研究では、CDX2 低発現大腸癌手術検体中の各細胞系譜を(2)で同定した細胞表面マーカーを用いて分離する。さらに各細胞集団のバルク RNA-Seq.解析を行うことで、正常と比較し発現が変化する遺伝子を同定し、正常の小腸内分泌系細胞が大腸で異所性に増殖し癌化する分子機構を解明する。CDX2 低発現大腸癌細胞株 HT29 を用いた予備解析では、レンチウイルスを用いた CDX2 遺伝子の強制発現により腫瘍増殖が抑制された。また、これらの細胞では小腸内分泌系細胞マーカー (LYZ, REG4) や上皮増殖因子受容体 (ERBB3, FGFR4) の発現が有意に低下しており(図 3)、CDX2 が CDX2 低発現大腸癌組織内に存在する小腸内分泌系細胞の分化や増殖の制御において決定的な役割を果たすことが示唆された。現在はさらに CRISPR-Cas9 システムを用いて CDX2 遺伝子をノックダウンしたヒト大腸癌異種移植マウスモデルでこれらの遺伝子の解析を進めている。

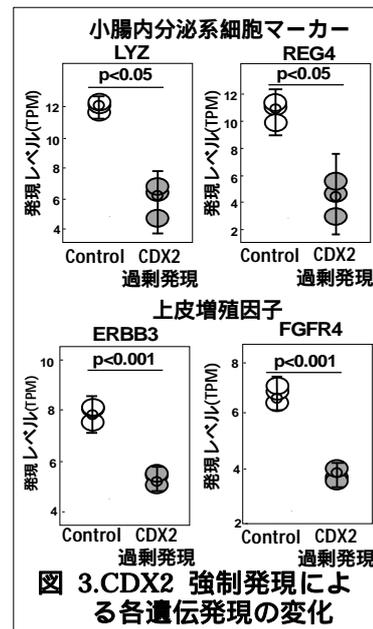


図 3. CDX2 強制発現による各遺伝子発現の変化

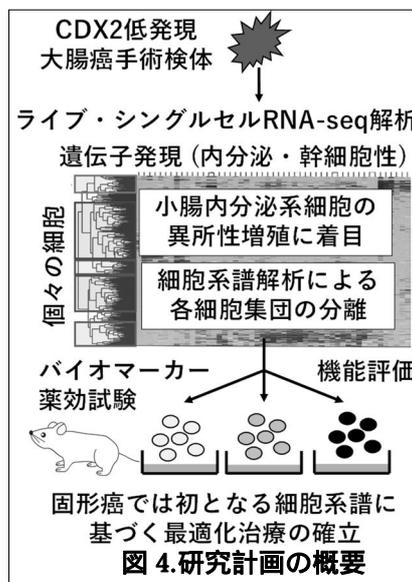
**(4)CDX2 低発現大腸癌組織中の各細胞集団の機能評価:**(3)で分離した各細胞集団の腫瘍形成能を 3 次元器官培養であるオルガノイド培養と免疫不全マウスへの移植実験により評価する。さらに、腫瘍形成能が高い細胞集団をマウスの直腸へ同所性に移植し、遠隔臓器転移の有無を解析する。大腸癌臨床検体から十分な細胞数が得られない場合は、すでに患者検体より樹立している 6 種類の CDX2 低発現大腸癌異種移植マウスの腫瘍を用いて同様の解析をすることで、(5)の実験に必要な細胞数を得る。

## 2022 年度 (3 年目)

**(5)CDX2 低発現大腸癌に対する薬剤スクリーニング:**(3)で同定した CDX2 低発現大腸癌組織の各細胞集団に対して、大腸癌では未承認の薬剤も含めた抗癌剤、分子標的薬、免疫チェックポイント阻害薬を網羅的に付加し薬効試験を行う。予備解析の結果、CDX2 低発現大腸癌は標準治療薬の L-OHP や CPT-11 の効果が乏しく、また KRAS 野生型でも抗 EGFR 抗体治療の効果が低いなど通常の大腸癌とは異なる薬剤抵抗性を示した。異種移植マウスのシングルセル RNA-Seq.解析の結果では、CDX2 低発現大腸癌では多剤排出トランスポーター ABCB1 の発現が通常の大腸癌と比較し高く、特に同遺伝子に着目しこれらの薬剤に対する抵抗性の根幹にある分子機構の解明を目指す。また、申請者が行ったヒト大腸癌異種移植マウスを用いた解析では、通常の大腸癌と比較し CDX2 低発現大腸癌では *Fusobacterium n.*が高頻度で検出された。大腸癌関連腸内細菌として注目される *Fusobacterium n.*が存在する大腸癌異種移植マウスに抗生物質 metronidazole を

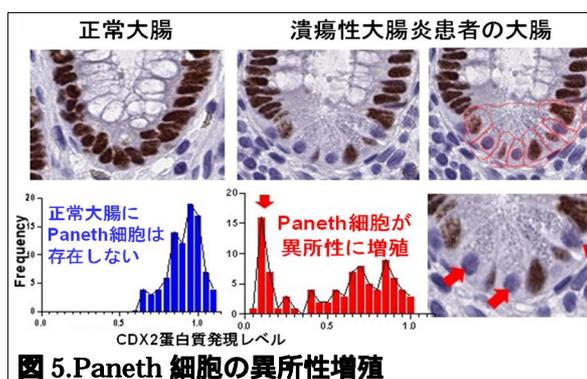
投与し腫瘍縮小効果が得られたという報告が注目されており(Bullman S et al, Science 2017)、本研究でも**抗生剤を併用した独自の薬剤スクリーニング**を展開する。以上の検討により、CDX2 低発現大腸癌に対する治療効果の高い薬剤の同定と、**転移再発の抑制のための早期の化学療法導入**に向けた知見を得る。

**(6)異種移植マウスによる最適化治療の確立とバイオマーカーの探索:**(5)で高い抑制効果がみられた薬剤の組み合わせを異種移植マウスに投与し、生体内での治療効果や毒性の評価を行う。また、同モデルの血中のヒト由来遊離 DNA を解析し CDX2 低発現大腸癌の新規バイオマーカーの探索を行う。CDX2 低発現大腸癌は未分化型が多く、大腸癌の腫瘍マーカーである **CEA の上昇が再発時にも見られない**ことが多く臨床上的大きな問題となっている。申請者が Paneth 細胞マーカーとして予測する膜結合型ムチン MUC1 は、臨床診療で乳癌などの腫瘍マーカーとして用いられる CA15-3 としても知られており、特に MUC1(CA15-3)に着目した解析を行う。その他にも(3)で同定した腸管内分泌系細胞で癌化に伴い発現が変化する遺伝子に着目した解析を行う。これらの研究により、CDX2 低発現大腸癌の最適化治療の確立とバイオマーカーの同定を行う(図 4)。



#### 4. 研究成果

**慢性腸炎モデルにおける CDX2 発現と小腸上皮化生:** 潰瘍性大腸炎は大腸癌発症リスクの高い炎症性腸疾患である。申請者らは同疾患のマウスモデルの大腸陰窩において CDX2 の発現が低下した細胞が増殖することを明らかにした(図 2)。これらの細胞は LYZ 高発現など Paneth 細胞特有の遺伝子特性を示しており(後述、図 6)、正常大腸には本来存在しない **Paneth 細胞が慢性炎症により異所性に増殖**する可能性が示唆された。また、患者臨床検体の解析でも同様に Paneth 細胞の異所性増殖を認め、大腸が炎症を契機に小腸上皮様に変質することが示唆された。このことから、申請者は**慢性炎症による CDX2 の発現低下が大腸の小腸上皮化生を誘導**し、CDX2 低発現大腸癌の発生につながるという仮説を立てた。そこで、同仮説を実証するために、*Cdx2* 条件的欠失(cKO)マウスを用いて、Paneth 細胞特異的に *Cdx2* の発現を欠失させ、大腸癌の発生の有無を観察する。発癌に至らない場合は、デキストラン硫酸誘導大腸炎モデルや *Fusobacterium n.*感染を組み合わせると同様に大腸癌の発生を観察する。



**CDX2 低発現大腸癌の内在的薬剤感受性:** CDX2 低発現大腸癌は通常は化学療法の対象とならない早期のステージでもアジュバント療法が有効であることが示唆されているが、その生物学的背景にある分子機構は不明である。予備解析の結果、通常の大腸癌と比較して CDX2 低発現大腸癌では**多剤排出トランスポーター-ABCB1 の発現が低く**、細胞株を用いた検討でも、CDX2 低発現大腸癌細胞株において CDX2 を過剰発現させると ABCB1 の発現

も誘導された(図6)。また Paneth 細胞では内在的に CDX2 ならびに ABCB1 の発現が低いことが判明している。さらに、CDX2 低発現大腸癌は標準治療薬の L-OHP や CPT-11 の効果が乏しく、KRAS 野生型でも抗 EGFR 抗体治療の効果が低いなど、**通常の大腸癌とは異なる薬剤感受性**を示した。従って、CDX2 低発現大腸癌における ABCB1 の基質となる抗癌剤の効果効果を検証する価値がある。一方、申請者が行ったヒト大腸癌 PDX モデルを用いた解析では、通常の大腸癌と比較し CDX2 低発現大腸癌では**大腸癌関連腸内細菌 *Fusobacterium n.* が高頻度で検出された**。*Fusobacterium n.*が存在するヒト大腸癌 PDX モデルに抗生物質 metronidazole を投与し腫瘍縮小効果が得られたという報告が注目されており(Bullman S et al, Science 2017)、本研究でも将来的には**抗癌剤と抗生剤を併用した独自の薬剤スクリーニング**を展開する。

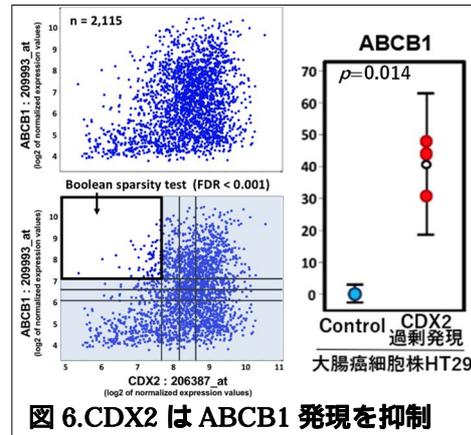


図 6. CDX2 は ABCB1 発現を抑制

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 1. Junko Mukohyama, Kyosuke Agawa, Kimihiro Yamashita, Takeru Matsuda, Masahiro Shinoda, Osamu Itano, Yoshihiro Kakej (*corresponding).	4. 巻 43(8)
2. 論文標題 CDX2 Is a Prognostic Biomarker for Unresectable Metastatic Colorectal Cancer.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 3763-3767
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.16561.	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 Shigeo Hisamori, Junko Mukohyama, Koul Sanjay, Takanori Hayashi, Michael E. Rothenberg, Masao Maeda, Taichi Isobe, Luis E. Valencia Salazar, Xin Qian, Darius M. Johnston, Dalong Qian, Kaiqin Lao, Naoya Asai, Yoshihiro Kakeji, Vincenzo A. Gennarino, Debashis Sahoo Piero Dalerba, Yohei Shimono	4. 巻 57
2. 論文標題 Upregulation of BMI1-suppressor miRNAs (miR-200c, miR-203) during terminal differentiation of colon epithelial cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 407-422
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00535-022-01865-9	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 該当する
1. 著者名 De Munck S, Provost M, Kurikawa M, Omori I, Mukohyama J, Felix J, Bloch Y, Abdel-Wahab O, Bazan JF, Yoshimi A, Savvides SN	4. 巻 600
2. 論文標題 Structural basis of cytokine-mediated activation of ALK family receptors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 143-147
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-021-03959-5	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 該当する
1. 著者名 Shigeo Hisamori, Junko Mukohyama, Koul Sanjay, Takanori Hayashi, Michael E. Rothenberg, Masao Maeda, Taichi Isobe, Luis E. Valencia Salazar, Xin Qian, Darius M. Johnston, Dalong Qian, Kaiqin Lao, Naoya Asai, Yoshihiro Kakeji, Vincenzo A. Gennarino, Debashis Sahoo Piero Dalerba, Yohei Shimono	4. 巻 in print
2. 論文標題 Upregulation of BMI1-suppressor miRNAs (miR-200c, miR-203) during terminal differentiation of colon epithelial cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 in print
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 無
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 該当する

1. 著者名 Agawa K, Yamashita K, Nakagawa A, Yamada K, Watanabe A, Mukohyama J, Saito M, Fujita M, Takiguchi G, Urakawa N, Hasegawa H, Kanaji S, Matsuda T, Oshikiri T, Nakamura T, Suzuki S, Kakeji Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 Simple Cancer Stem Cell Markers Predict Neoadjuvant Chemotherapy Resistance of Esophageal Squamous Cell Carcinoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4117-4126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.15214.	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8件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 向山順子, 篠田昌宏, 吉見昭秀, 板野理, 掛地吉弘, Piero Dalerba, 下野洋平
2. 発表標題 手術検体を活用した癌関連マイクロRNA-221による大腸癌幹細胞制御機構の解析
3. 学会等名 第78回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 向山順子, 山下公大, 掛地吉弘, Piero Dalerba
2. 発表標題 CDX2低発現大腸癌の臨床学的予後と腫瘍生物学的特性についての解析
3. 学会等名 第34回日本消化器癌発生学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 向山順子, 篠田昌宏, 掛地吉弘, 板野理
2. 発表標題 三刀流ママ外科医、Surgeon-scientistとして「外科的治療だけでは治癒が難しい癌」を研究する
3. 学会等名 第123回日本外科学会定期学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 向山順子、Piero Dalerba
2. 発表標題 Dissection of transcriptional heterogeneity and optimized therapy for colorectal cancer
3. 学会等名 第110回日本消化器病学会総会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 向山 順子, 篠田 昌宏, 板野 理, 掛地 吉弘, Piero Dalerba
2. 発表標題 CDX2低発現大腸癌の腫瘍生物学的特徴の検討
3. 学会等名 第77回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 向山順子, Piero Dalerba
2. 発表標題 DX2低発現大腸癌に対する最適化治療の確立に向けた研究
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会, 外科学再興シンポジウム13（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Junko Mukohyama, Osamu Itano, Yoshihiro Kakej, Yohei Shimono.
2. 発表標題 miR-221 targets QK15 and enhances functional behaviors of cancer stem cells in human colon cancers.
3. 学会等名 International Colorectal Research Summit (ICRS) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Junko Mukohyama, Piero Dalerba
2. 発表標題 CDX2 as a prognostic and predictive biomarker in colon cancer.
3. 学会等名 第79回日本癌学会総会（招待講演）
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

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