

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06948

研究課題名（和文）マウスモデルと臨床材料を用いた大腸がん幹細胞の転移機構の解析

研究課題名（英文）Studies on metastasis of colorectal cancer stem cells using clinical materials and mouse models

研究代表者

柿崎 文彦（Fumihiko, Kakizaki）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：00609076

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）：TR10(pY2681)陽性予後不良大腸がん患者由来のがん幹細胞株を用いた転移機構の解析とTR10シグナル伝達へのクロストーク機構の探索を行った。これらの解析により、予後不良大腸がん患者由来のがん幹細胞の代表的な遺伝子発現プロファイルと、患者生存に関わるマーカー遺伝子群が得られると共に、肝転移を抑制する4つの転移機能マーカーの候補が同定された。この転移機能マーカーはタンパク修飾酵素ではないため、TR10シグナル伝達に直接影響する可能性は低く、これらを標的として転移阻害薬を見出すことは難しかった。今後は代替案で同定した転移阻害薬の解析を進めたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は学術的に十分には解明されていない大腸がん転移機序の一部を、患者由来がん幹細胞を用いて明らかにするだけでなく、治療方針を決めるバイオマーカーや転移阻害薬の候補を同定している点において臨床医学的に重要性が高い。このように転移機構を明らかにしていくことで、再発リスクの高いがん患者に対する個別化補助化学療法等への応用に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We conducted an analysis of metastasis mechanisms and an exploration of crosstalk mechanisms with TR10 signaling using cancer stem cell lines derived from TR10(pY2681)-positive colorectal cancer patients with poor prognosis. These analyses provided representative gene expression profiles of cancer stem cells derived from these patients, as well as marker genes associated with patient survival. Additionally, four candidate metastasis markers that may suppress liver metastasis were identified. Since these metastasis markers were not protein-modifying enzymes, they were unlikely to directly affect TR10 signaling, making it challenging to discover metastasis inhibitors targeting them. Moving forward, we intend to advance the analysis of metastasis inhibitor candidates identified through an alternative strategy.

研究分野：実験病理学

キーワード：がん幹細胞 TR10 予後不良 大腸がん がん転移

1. 研究開始当初の背景

大腸がんは最も死亡率が高いがんの一つであり、治療法の確立が急務である。本研究では、近年大腸がんの転移促進機能が見出されていた NOTCH-DAB1-TRIO シグナル伝達経路の更なる機能解析を患者由来大腸がん幹細胞を用いて進めることで、治療標的を同定することを目的とした。

患者由来大腸がん幹細胞は個々の患者腫瘍に特有の遺伝子変異と発現や抗がん薬感受性を示す。我々はこの PDS で試験することで個々の患者に最適な抗がん薬を選択する個別化医療への応用を目指している。

2. 研究の目的

本研究では患者由来の大腸がん幹細胞を用いて分子的な解析を進めることで、臨床例での機序の解明と治療標的の同定を目的とした。具体的には、予後不良 TRIO(pY2681)陽性患者由来の大腸がん幹細胞の遺伝子変異・発現とそれらの機能解析から新規マーカータンパクを同定すること、またそれらを用いて上記 NOTCH-DAB1-TRIO シグナル伝達経路へ直接関与する分子を同定すること、そして転移阻害薬を同定することを目標とした。

3. 研究の方法

これまでに本研究の分担者らは世界に先駆けてタンパクリン酸化マーカーの1つである TRIO(pY2681)を病理診断に用いて予後不良患者を層別化する診断キットを開発してきた(特許番号 WO2014185550A1)。TRIO(pY2681)の発見当初はポリクローナル抗 TRIO(pY2681)抗体を用いて検出したが、上記の新しい診断キットは安定で比活性(力価)の高いモノクローナル抗体により組織内の TRIO(pY2681)を検出できる (Aoyama et al., manuscript in preparation)。本研究の前半部分において予後不良患者由来がん幹細胞の選択にこの独自の検出系を用いた。

研究に用いる臨床検体・大腸がん幹細胞は本研究の分担者と協力者が適切に管理した。TRIO(pY2681)陽性大腸がん患者由来のがん幹細胞株を9割含む50株を用い、がん遺伝子パネルによる遺伝子変異解析・RNA-sequencing とマイクロアレイによる RNA 発現解析・免疫不全マウスへの異種移植の表現型解析を行った。解析進度に応じて、次に示す3つのレベルを設けた。「特性レベル1: 転移と関連するマーカー遺伝子の同定」、「特性レベル2: 転移に機能するマーカータンパクの同定」、「特性レベル3: 転移阻害薬の同定」とした。

また「特性レベル2: 転移に機能するマーカータンパク」による NOTCH-DAB1-TRIO 経路へのクロストークの有無を調べた。

4. 研究成果

予後不良 TRIO(pY2681)陽性大腸がん患者由来がん幹細胞株を用いて、がん幹細胞が有する転移機構の解析と、TRIO 経路シグナル伝達へのクロストーク機構の解析を行った。本研究では大きく6つの実験を計画し、それらを予定通りに遂行した。(1) 大腸がん患者由

来のがん幹細胞株ライブラリーの樹立。(2) 予後不良大腸がん患者由来のがん幹細胞株の選択。(3) 予後不良大腸がん患者由来の大腸がん幹細胞のトランスクリプトーム解析。(4) 転移関連マーカーの同定。(5) 転移機能マーカーの同定。(6) 転移阻害薬の同定。

上記(1)と(2)に関してはこれまでに研究分担者・研究協力者と連携して蓄積した臨床材料とそれに関わる予備実験データを既に所有していたので (Miyoshi et al., *Oncotarget*. 2018;9:21950-64, Aoyama et al., manuscript in preparation)、比較的短期間で終了した。想定範囲内であるが、時間・労力・費用を要したのは(3)のトランスクリプトーム解析であった。この解析により、予後不良大腸がん患者由来のがん幹細胞株の代表的な遺伝子発現プロファイルと、患者生存に関わるマーカー遺伝子群が得られた。このトランスクリプトーム解析の中で、現行のスフェロイド培養法における遺伝子発現の均一性を確認する作業と、大腸がん幹細胞の発現プロファイルの生物学的な基準となるレファレンス細胞を決定する必要性が生じたので、次に示す解析を追加した：Single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) を用いた一細胞発現解析を行なった結果、ヒト正常大腸上皮幹細胞スフェロイド株の細胞群はおおよそ単一な細胞集団であり、各細胞において遺伝子発現の種類が周期的に統制された均一な状態であることが予想された。それは Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) 解析において、クラスタリングの高度変動遺伝子群のパスウェイが主に G1/S 関連遺伝子群や G2/M 関連遺伝子群等の細胞周期に関わるものであったことから導かれた。またレフェレンス細胞としての性能を解析するため、5 症例のヒト正常大腸上皮幹細胞株をトランスクリプトーム解析した結果、X 染色体上にコードされる *X-inactive specific transcript/XIST* と Y 染色体上にコードされる遺伝子・RNA 群 (*RPS4Y1*, *DDX3Y*, *TTY14* 等) を除けば、それら 5 症例の間で遺伝子発現プロファイルに大きな違いが無い、言い換えれば個体間での変動の少ない、極めて近い様相を呈した。

それと矛盾なく、5 症例の患者由来大腸がん幹細胞株 と 同じ 5 症例の患者由来正常大腸上皮幹細胞株 のトランスクリプトーム解析により、各遺伝子発現における個体間の標準偏差 (\log_2 縮尺)の中央値は 前者が 0.46 で後者が 0.22 を示し、正常大腸上皮幹細胞よりも大腸がん幹細胞で mRNA の変動が統計的に有意に誘導されていることが示された (Mann Whitney U test, $P < 0.0001$)。これらの解析からヒト大腸がん幹細胞の遺伝子発現解析において、ヒト正常大腸上皮幹細胞を対照やベースラインとして用いることの生物学的意義が確認された。

次の段階「(4) 転移関連マーカーの解析」では、上記の通り 50 症例のヒト大腸がん幹細胞株を用いた発見コホートの解析結果から、転移関連マーカー遺伝子群の候補を同定した。その後、国際的に頻用される公共のデータベースを検証コホートとして活用した。すなわち、2 つの大規模試験 The Cancer Genome Atlas の Colon and Rectal Adenocarcinoma (TCGA Network, *Nature*. 2012;487:330-7) と Gene Expression Omnibus/GEO の GSE39582 (Marisa et al., *PLoS Med*. 2013;10:e1001453) の約 600 症例 x 2 セットの遺伝子発現プロファイルを用いて生存解析を行ない、大腸がん患者の全生存期間・無再発/無増悪生存期間・疾患特異的生存期間と負もしくは正の相関を示す予後マーカー遺伝子群/転移関連マーカー遺伝子群とそれらが示す亜型(サブタイプ)を同定した。言い換えると、大腸がん幹細胞亜型(サブタイプ)の固有の性質が がん患者の予後に影響を与えている可能性が示された。この知見は臨床的に重要であることが明らかであったため、これらのマーカーを用いた予後診断と化学療法を選択に関する特許を出願した (出願番号 2024-017258「大腸がん患者の予後予測方法」2024年2月7日) 更にこの結果を国際学会で発表するとともに (Kakizaki

and Taketo, The 8th JCA-AACR, Kyoto, 2024)、それを論文としてまとめて原稿を投稿した (Kakizaki et al., “Colorectal cancer stem cell transcriptome can affect patient outcome” 査読中)。

「(5) 転移機能マーカーの解析」では、「(3)トランスクリプトーム解析」と担がんマウスの肝臓転移の表現型解析を組み合わせることで、肝転移を抑制する 4 つの候補遺伝子を同定した。これら 4 つの遺伝子をそれぞれ単独で転移性大腸がん幹細胞に強制発現させ、それを免疫不全マウスの大腸に移植した。予備実験結果では、コントロールと比較して、肝転移巣形成が抑制された。転移機能マーカーによる NOTCH-DAB1-TRIO 経路へのクロストーク解析に関して、転移機能マーカータンパクがカイネース等のタンパク修飾酵素ではなかったので、TRIO(Y2681)に対する直接的な制御は期待できない。よって、今後は転移機能マーカーの関連タンパクを解析することにより、間接的に影響を及ぼす可能性を調べる。

また上記の患者由来大腸がん幹細胞同所移植法を用いたモデルマウスの解析において、形成された原発巣が示すがんの増悪・再発を定量的に評価する方法、また病理像を高精度に定量化する方法が次回の基盤研究の課題として持ち越された。

最後の項目「(6) 転移阻害薬の同定」に関して、同定された「(5)転移機能マーカー」がタンパク修飾活性を持つものではなかったため、転移に関わるカスケードの阻害薬の同定には至らなかった。その一方で、異なる方面から解析を進めていた TRIO(pY2681)経路の下流の阻害薬は同定しており、今後はこの代替の阻害薬の解析を進めたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Matsubara H, Miyoshi H, Kakizaki F, Morimoto T, Kawada K, Yamamoto T, Obama K, Sakai Y, Taketo MM	4. 巻 22
2. 論文標題 Efficacious Combination Drug Treatment for Colorectal Cancer that Overcomes Resistance to KRAS G12C Inhibitors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Therapeutics	6. 最初と最後の頁 529-538
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1535-7163.MCT-22-0411	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 Morimoto T, Takemura Y, Miura T, Yamamoto T, Kakizaki F, An H, Maekawa H, Yamaura T, Kawada K, Sakai Y, Yuba Y, Terajima H, Obama K, Taketo MM, Miyoshi H	4. 巻 114
2. 論文標題 Novel and efficient method for culturing patient-derived gastric cancer stem cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3259-3269
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15840	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Taketo MM, Miyoshi H, Kakizaki F, Yamaura T, Maekawa H, Yamamoto T, Kitano S, Matsubara H, Morimoto T, Kawada K, Obama K, Sakai Y
2. 発表標題 New horizons of precision medicine opened by colorectal cancer stem cell spheroids
3. 学会等名 The 2nd JCA-AACR Precision Cancer Medicine International Conference（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kakizaki F and Taketo MM
2. 発表標題 Colorectal Cancer Stem Cell Transcriptome Can Affect Patient Prognostic Outcome
3. 学会等名 The Eighth JCA-AACR Special Joint Conference（国際学会）
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 「大腸がん患者の予後予測方法」	発明者 武藤誠、柿崎文彦、 三好弘之、河田健 二、小瀨和貴	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2022-139428	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 「大腸がん患者の予後予測方法」（再出願）	発明者 武藤誠、柿崎文彦、 三好弘之、河田健 二、小瀨和貴	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2024-017258	出願年 2024年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	武藤 誠 (Taketo Makoto) (70281714)	公益財団法人田附興風会・医学研究所・所長 (74314)	

	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 協力者	三好 弘之 (Miyoshi Hiroyuki) (30362479)	京都大学・医学研究科・准教授 (14301)	
研究 協力者	青山 太郎 (Aoyama Taro)	京都大学・医学研究科 (14301)	

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