

令和 6 年 5 月 8 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07251

研究課題名（和文）胃がんの初期薬剤抵抗性を司るがん細胞の可塑性および安定維持機構の解明

研究課題名（英文）Analysis on the mechanisms of plasticity and maintenance of gastric cancer drug-tolerant persister cells

研究代表者

馬島 哲夫（MASHIMA, Tetsuo）

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター 分子生物治療研究部・主任研究員

研究者番号：30311228

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）：アルデヒド脱水素酵素ファミリーの1つALDH1A3は、胃がん患者腫瘍由来細胞において抗がん剤処理後に発現上昇し、腫瘍増殖を促進することを見出した。術前化学療法を施行された胃がん組織ではALDH1A3が高い発現を示した。制がん剤投与後に残存した胃がん細胞では、ALDH1A3プロモーターにおけるヒストンH3リジン27アセチル化が亢進し、BETファミリータンパク質BRD4が、同プロモーターにリクルートされた。BET阻害剤は、ALDH1A3発現を抑制し、制がん剤との併用により、胃がんの腫瘍増殖を抑制した。以上から、BET阻害剤は治療抵抗性胃がんの抑制に有効であることが示唆された。（研究協力者：李珍）

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、BETタンパク質の働きを介した生存因子ALDH1A3の発現誘導が、胃がんの薬物療法において、薬物療法初期に生じる治療抵抗性に関与することが示された。本研究結果は、がん細胞の可塑性が薬剤耐性に関与することを立証するという観点で、病態生物学領域での基礎研究成果としての意義がある。また現在、内外で臨床開発が進められているBET阻害剤がどのような臨床の局面で有効性を示すかに関し、新たな基盤データを提示するものである。特に本研究は、胃がんの治療抵抗性克服のための新しい方法を示す成果としての意義を持つ。

研究成果の概要（英文）：We found that aldehyde dehydrogenase 1 family member A3 (ALDH1A3) was up-regulated by anticancer drugs in gastric cancer patient-derived cells and was involved in tumor growth. Gastric cancer tissues treated with neoadjuvant chemotherapy showed high ALDH1A3 expression. Histone H3K27acetylation increased in the ALDH1A3 promoter in gastric cancer chemotherapeutic drug-tolerant persister (DTP) cells. Among the BET proteins, BRD4 was specifically recruited to the ALDH1A3 promoter in the DTP cells. Importantly, combination therapy with anticancer drug and BET inhibitor significantly suppressed ALDH1A3 expression and inhibited tumor growth. These data suggest that BET inhibitors target DTP cells in gastric cancer. (Collaborator: Lee Jin)

研究分野：腫瘍薬物応答学

キーワード：ALDH 胃がん BET阻害剤 Persister細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

薬物療法後には強く安定な薬剤耐性細胞が出現する以前に、初期に Drug-tolerant persister(DTP)細胞と呼ばれる特有の性質を持つがん細胞が残存し、これが薬剤耐性の足場となることが共通認識となりつつある。この DTP 細胞については、高い自己複製能と分化能をもつがん幹細胞との関連性も示唆されるが、必ずしも統一的な見解は得られていない。また、DTP 細胞は、元のがん細胞集団から薬剤抵抗性の細胞分画が残存したのか、あるいは、薬剤ストレスにより誘導された細胞の形質であるのかについても明確でない。薬剤耐性の出現を抑え、より有効な薬物療法を確立するためには、こうした初期治療抵抗性がん細胞の性状、特にそのアキレス腱となる分子経路を見出し、これを抑制する方法を確立することが必須である。

2. 研究の目的

我々は、がん研究会所内倫理委員会の承認のもと患者同意を得て取得した胃がん腫瘍組織より、患者腫瘍由来がん細胞を樹立した (Mashima et al.Br J Cancer 2019)。また、同細胞を用いたシングルセル解析を行い、胃がんの初期治療抵抗性に寄与する残存がん細胞として、アルデヒド代謝に関わる酵素 ALDH の 19 個のアイソザイムの中で、ALDH1A3 を選択的に高発現するがん細胞分画を見出した (Kawakami, Mashima et al.Cancer Sci 2020)そこで本研究で我々は、CRISPR/Cas9 システムにより、ALDH1A3 遺伝子座に蛍光タンパク質 GFP をコードする遺伝子をノックインし、ALDH1A3 の発現を蛍光モニタリング可能な胃がん細胞を樹立する。これを用いた解析から、治療抵抗性の ALDH1A3 高発現細胞は、薬剤投与前よりがん細胞集団に存在し薬剤投与後に選択されるのか、あるいは、新たに同細胞が薬剤処理後に形質誘導されるのかを明らかにし、またその分子機序を解明する。こうした解析に基づき、治療抵抗性に寄与する ALDH1A3 高発現性の胃がん細胞が、どのような分子機序で維持されているのか、またその安定維持機構の抑制により薬物療法による治療効果を最大化できるか、を明らかにする。

3. 研究の方法

ALDH1A3 遺伝子座への GFP ノックイン細胞を樹立し、同細胞を用い、各種制がん剤投与後の ALDH1A3 発現細胞の挙動を、in vivo イメージングによりモニタする。これにより、同細胞分画の治療抵抗性への寄与を明確にする。また、制がん剤処理後に誘導される ALDH1A3 高発現細胞におけるゲノムレベルでのヒストン修飾の差異を、CHIP-PCR や ChIP-Seq 法により明らかにする。さらに、エピジェネティックな制御因子を阻害剤や RNAi により抑制し、ALDH1A3 高発現細胞の形質安定性への影響を検討する。これらの解析により、ALDH1A3 高/低発現細胞間の可塑性が、エピジェネティック制御により規定されているかを検証する。ALDH1A3 高/低発現細胞において、トランスクリプトーム解析などのオミクス解析を行う。得られたデータを用い、ALDH1A3 高発現細胞とリンクする分子経路を同定する。これらの解析により、薬剤抵抗性胃がん細胞分画の薬剤耐性等に寄与する因子を見出す。一方、術前化学療法 +/- の胃がん手術切除組織検体を用い、ALDH1A3 などの薬剤抵抗性残存がん細胞における生存維持分子の発現を免疫組織化学により検討する。また同分子の発現レベルを定量化し、各種臨床パラメーターと相関解析する。さらに、治療抵抗性の残存がん細胞に特徴的な生存分子経路を標的とする化合物を探索し、制がん剤との併用による腫瘍退縮効果を評価する。

4. 研究成果

本研究では、まず、ALDH1A3 遺伝子座への蛍光タンパク質 GFP をコードする遺伝子のノックインに成功した。これにより、制がん剤投与後における ALDH1A3 発現細胞の挙動を生きた状態でリアルタイムにモニタする解析システムを構築できた。この GFP ノックイン細胞を用いたリアルタイムイメージング、および、ハイコンテンツアナライザーによる化合物スクリーニングを実施した。その解析の結果、我々は、ALDH1A3 高発現胃がん細胞が、5-FU やシスプラチンなど、胃がんの一次治療に用いられる制がん剤処理後に形質誘導されることを見出した。また、ALDH1A3 分子が腫瘍増殖に寄与し、術前化学療法を施行された胃がん組織では、ALDH1A3 発現が高いことが確認された。制がん剤投与後に残存した胃がん細胞では、ALDH1A3 プロモーターにおいて、ヒストン H3 リジン 27 アセチル化が亢進しており、BET ファミリーメンバーの中で、BRD4 が ALDH1A3 プロモーターに選択的にリクルートされ、BRD4 の発現抑制は制がん剤による ALDH1A3 の発現誘導を低下した。BET 阻害剤は、ALDH1A3 発現を抑制し、制がん剤投与後に残存した胃がん細胞の増殖を選択的に阻害することを見出した。また重要なことに、制がん剤と BET 阻害剤の併用投与は、in vivo での胃がんの腫瘍増殖を抑制した。以上の結果から、BET タンパク質による生存因子 ALDH1A3 の発現制御が、胃がんの薬物療法において、治療抵抗性細胞の生存を有効に抑制する

ための標的となることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Mashima T, Wakatsuki T, Kawata N, Jang MK, Nagamori A, Yoshida H, Nakamura K, Migita T, Seimiya H, Yamaguchi K	4. 巻 11
2. 論文標題 Neutralization of the induced VEGF-A potentiates the therapeutic effect of an anti-VEGFR2 antibody on gastric cancer in vivo.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-94584-9.	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 Lee Jin, Mashima Tetsuo, Kawata Naomi, Yamamoto Noriko, Morino Shun, Inaba Saori, Nakamura Ayane, Kumagai Koshi, Wakatsuki Takeru, Takeuchi Kengo, Yamaguchi Kensei, Seimiya Hiroyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Pharmacological targeting of histone H3K27 acetylation/BRD4-dependent induction of ALDH1A3 for early-phase drug tolerance of gastric cancer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cancer Research Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/2767-9764.CRC-23-0639	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 Hirose Shiho, Mashima Tetsuo, Yuan Xunmei, Yamashita Makiko, Kitano Shigehisa, Torii Shinichi, Migita Toshiro, Seimiya Hiroyuki	4. 巻 115
2. 論文標題 Interleukin 4 induced 1 mediated resistance to an immune checkpoint inhibitor through suppression of CD8+ T cell infiltration in melanoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 791 ~ 803
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.16073	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 Morino Shun, Mashima Tetsuo, Shirai Fumiyuki, Nagayama Satoshi, Katayama Ryohei, Seimiya Hiroyuki	4. 巻 584
2. 論文標題 BET protein-dependent E2F pathway activity confers bell-shaped type resistance to tankyrase inhibitors in APC-mutated colorectal cancer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 216632 ~ 216632
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.canlet.2024.216632	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 -

1. 著者名 Chen Mingjue, Mashima Tetsuo, Oishi Taichi, et al.	4. 巻 130
2. 論文標題 APC/PIK3CA mutations and -catenin status predict tankyrase inhibitor sensitivity of patient-derived colorectal cancer cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 151 ~ 162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-023-02484-8	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

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 李 珍、馬島哲夫、清宮啓之
2. 発表標題 制がん剤処理後の残存胃がん細胞における治療抵抗性因子ALDH1A3発現のエピゲノム制御
3. 学会等名 第26回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mashima T, Migita T, Seimiya H, Yamaguchi K.
2. 発表標題 VEGF-A induction after anti-VEGFR2 antibody therapy is involved in the therapy resistance in gastric cancer.
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Lee J, Mashima T, Seimiya H
2. 発表標題 Epigenetic regulation of ALDH1A3 expression in anticancer drug-tolerant gastric cancer persister cells.
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 馬島哲夫、清宮啓之
2. 発表標題 胃がんにおける抗VEGFR2抗体投与後の幹細胞関連因子発現と治療抵抗性 には宿主由来のVEGF-A誘導が寄与する
3. 学会等名 第26回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森野峻、馬島哲夫、鈴木穰、白井文幸、長山聡、片山量平、清宮啓之
2. 発表標題 シングルセル系譜解析に よる大腸がん患者由来drug-tolerant persister細胞の追跡
3. 学会等名 日本バイオインフォマティクス学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 馬島哲夫、清宮啓之
2. 発表標題 胃がん細胞集団に存在するALDH1A3高発現がん細胞の薬剤抵抗性への寄与
3. 学会等名 第25回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tetsuo Mashima, Ryuhei Kawakami, Koshi Kumagai, Takeshi Sano, Kensei Yamaguchi, Hiroyuki Seimiya
2. 発表標題 Innate drug resistance of ALDH1A3-enriched cancer cell subpopulation and its plasticity in gastric cancer
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 馬島哲夫、李 珍、中村彩音、川田直美、熊谷厚志、山口研成、清宮啓之
2. 発表標題 アルデヒド脱水素酵素ALDH1A3の胃がん腫瘍増殖への寄与と小分子阻害剤による制がん剤の効果増強
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 李珍、馬島哲夫、川田直美、熊谷厚志、山口研成、清宮啓之
2. 発表標題 BET阻害剤によるALDH1A3陽性drug-tolerant persister胃がん細胞の抑制
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 馬島哲夫、李 珍、中村彩音、清宮啓之
2. 発表標題 アルデヒド脱水素酵素ALDH1A3による胃がん細胞のin vivo腫瘍増殖と小分子阻害剤によるターゲティング
3. 学会等名 第27回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 李 珍、馬島哲夫、清宮啓之
2. 発表標題 BET阻害剤による胃がんALDH1A3陽性drug-tolerant persister細胞の標的化
3. 学会等名 第27回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 馬島哲夫
2. 発表標題 消化器がん患者腫瘍由来細胞を用いた薬剤感受性規定因子および耐性応答機序の解明
3. 学会等名 日本患者由来がんモデル学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村彩音、馬島哲夫、李 珍、川田直美、熊谷厚志、山口研成、清宮啓之
2. 発表標題 胃がんにおける初期薬剤耐性drug-tolerant persister細胞の生成・維持過程における二層性の遺伝子発現応答
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 馬島哲夫, 清宮啓之	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 220
3. 書名 がん微小環境に1細胞レベルで挑む～技術革新で見えてきた腫瘍内の細胞と免疫応答の多様性、がん悪性化・治療抵抗性の鍵(がん幹細胞を支えるがん微小環境の多様性 3. 薬剤耐性胃がん細胞のがん幹細胞性とその生存分子経路)	

1. 著者名 室井誠, 馬島哲夫, 牛嶋大, 松浦正明	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 320
3. 書名 マウス・ラットモデル作製・解析プロフェッショナル(オミックス解析: 表現型・薬物活性とリンクする分子経路の探索)	

〔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
研究協力者	李 珍 (LEE Jin)		

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