

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08725

研究課題名(和文)胆管癌における休眠がん細胞のメカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of dormant cancer cells in cholangiocarcinoma

研究代表者

益田 邦洋(Kunihiro, Masuda)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：30569645

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)：Fbxw7による休眠がん細胞の制御メカニズムを解明し、治療標的にするという胆管癌の新たな治療戦略に発展させることを目的として実験を行った。休眠がん細胞は時間を経た再発転移機構であり、この仕組みに癌幹細胞(CSC)の関与が示されている。細胞周期の休止期に存在し、従来の化学療法に抵抗性を示す。Fbxw7は癌抑制遺伝子で、血液癌や固形癌でFBXW7を介したCSCの制御が報告されている。しかしながら、化学療法後の胆管癌切除検体におけるFBXW7の発現、CSC関連分子の発現を検討したが、治療効果とそれらの発現に相関は認めず、それらの関連を明らかにすることはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆管癌の転移再発や治療抵抗性に関与する休眠がん細胞を同定し、分子機構を関与を解明し、新規治療標的に発展させることである。

休眠がん細胞は時間を経た再発転移機構であり、この仕組みに癌幹細胞(CSC)の関与が示されている。細胞周期の休止期に存在し、従来の化学療法に抵抗性を示す。Fbxw7は多くの癌で不活性型変異を認める癌抑制遺伝子で、血液癌や固形癌でFBXW7を介したCSCの制御が報告された。

本研究はFbxw7による休眠がん細胞の制御メカニズムを解明し、治療標的にするという胆管癌の新たな治療戦略に発展させることを目的とする。しかしながら、免疫染色上両者の発現に相関はなく、関連性は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：We conducted experiments to elucidate the regulatory mechanism of dormant cancer cells by Fbxw7 and to develop a new therapeutic strategy for cholangiocarcinoma by targeting the dormant cancer cells as therapeutic targets. Dormant cancer cells are a time-course mechanism of recurrent metastasis, and cancer stem cells (CSCs) have been shown to be involved in this mechanism. Fbxw7 is a tumor suppressor gene, and FBXW7-mediated regulation of CSCs has been reported in hematological and solid tumors. We examined the expression of FBXW7 and CSC-related molecules in resected cholangiocarcinoma specimens after chemotherapy, and found no correlation between treatment efficacy and their expression, and could not clarify their association.

研究分野：外科

キーワード：胆道癌 Fbxw7 休眠がん細胞

### 1. 研究開始当初の背景

胆管癌の転移再発や治療抵抗性に関する休眠がん細胞を同定し、分子機構にFbxw7の関与を解明し、新規治療標的に発展させることである。

休眠がん細胞は時間を経た再発転移機構であり、この仕組みに癌幹細胞(CSC)の関与が示されている。細胞周期の休止期に存在し、従来の化学療法に抵抗性を示す。Fbxw7は癌抑制遺伝子で、多くの癌で不活性型変異を認める。我々はFBXW7低下が予後不良因子であること、細胞株で基質の蓄積が進展と化学療法抵抗性に関与することを示した。近年、血液癌や固形癌でFBXW7基質c-MYCを介したCSCの制御が報告され、FBXW7抑制によるCSC治療の可能性が示された。

本研究は術前治療後の胆管癌組織を用い、FBXW7発現上昇と治療抵抗性の関連性を検証し、細胞株、マウス実験でFbxw7による休眠がん細胞の制御メカニズムを解明し、治療標的にするという胆管癌の新たな治療戦略に発展させる。

### 2. 研究の目的

胆管癌の転移再発や治療抵抗性に関する休眠がん細胞を同定し、分子機構にFbxw7の関与を解明し、新規治療標的に発展させることである。

休眠がん細胞は時間を経た再発転移機構であり、この仕組みに癌幹細胞(CSC)の関与が示されている。細胞周期の休止期に存在し、従来の化学療法に抵抗性を示す。Fbxw7は癌抑制遺伝子で、多くの癌で不活性型変異を認める。我々はFBXW7低下が予後不良因子であること、細胞株で基質の蓄積が進展と化学療法抵抗性に関与することを示した。近年、血液癌や固形癌でFBXW7基質c-MYCを介したCSCの制御が報告され、FBXW7抑制によるCSC治療の可能性が示された。

本研究は術前治療後の胆管癌組織を用い、FBXW7発現上昇と治療抵抗性の関連性を検証し、細胞株、マウス実験でFbxw7による休眠がん細胞の制御メカニズムを解明し、治療標的にするという胆管癌の新たな治療戦略に発展させる。

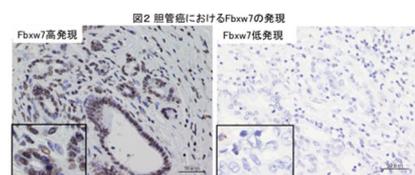
### 3. 研究の方法

切除病理検体を用いて、化学療法後および再発胆管癌において、FBXW7の発現が上昇するかを検証する。細胞株の実験で休眠がん細胞、CSCを同定しその維持にFbxw7、c-Mycが関与するかを検証する。マウス Xenograft の実験で、化学療法に加えFbxw7および基質MCL-1を抑制することで休眠がん細胞を標的とする新規治療法となりうるかを検証する。(図1)

#### (1) 切除病理標本における解析

##### 術前治療を施行した病理組織標本を用い、FBXW7、基質c-MYC、MCL-1の発現の解析、および臨床病理学的因子との相関を検討

臨床病理学情報、予後の明らかな臨床検体を用いる。胆管癌切除556例のうち、術前治療(化学療法、放射線化学療法)を施行後に切除した53例に対し、免疫組織染色でFBXW7、基質c-MYC、MCL-



1の発現量を解析する(図2)。術前治療なし群と比較し、FBXW7の発現が術前治療群より高発現しているかを測定する。また、基質であるc-MYC/MCL-1とFBXW7の発現に逆相関があるかを検証する。術前治療群の中で、FBXW7の発現量の高低で術前治療の病理学的治療効果判定に差があるか、再発や全生存期間に差を認めるかを検討する。

##### 異時性胆管癌、異時性再発・転移病変に対して切除術を施行した病理組織標本を用いたFBXW7、基質c-MYC、MCL-1の発現の解析

胆管癌は長期経過観察中に異時性に別の胆道に転移・再発を認める症例が存在する。また、長期間経

過観察中に緩徐に増大し、孤発性に肺転移・肝転移・リンパ節転移を認める症例があり、切除術を施行する例も存在する。それらの異時性胆管癌/異時性再発に対し、切除術を施行した症例で FBXW7, c-MYC, MCL-1 の免疫染色を行い、原発巣との発現を比較する。

## (2)細胞株およびマウスを用いた解析

### 抗癌剤曝露下の胆管癌細胞株における FBXW7, 基質 c-MYC, MCL-1 の発現, および CSC マーカーの発現の解析

胆管癌における CSC マーカーとして CD133・CD24・CD44・EpCAM・Sox2 などが報告されている<sup>(11)</sup>。胆管癌細胞株である RBE, HuCCT1, TFK-1 と、近年樹立された ZJU-0826(CD44 陽性), ZJU-1125(CD44, CD133 陽性)を使用する<sup>(12)</sup>。化学療法(GEM/CDDP/S-1)曝露により FBXW7 の発現が上昇するか、その際に基質 c-MYC, MCL-1 が低下するか、CSC マーカーが上昇するかを解析する。この解析によりどの細胞株に CSC が存在するかを確認し FBXW7 の関与を検証する。

### FBXW7 による細胞周期の制御、化学療法の治療効果を判定

休眠がん細胞の多くは細胞周期の G0/G1 に存在する。で同定した CSC を含む細胞株に対し FBXW7 を抑制または過剰発現を行う。Fbxw7 は / / の3つの splicing variant が存在、c-Myc/Mcl-1 と結合する Fbxw7 を過剰発現に使用する。細胞周期解析を行い FBXW7 低下させた細胞株は、c-MYC 蓄積により G0/G1 からの脱出を認めるか、化学療法の感受性の変化を解析する。我々は以前に FBXW7 抑制胆管癌細胞株は CDDP 投与で MCL-1 が蓄積し化学療法抵抗性になることを示したが<sup>(6)</sup>、FBXW7 抑制に加え、MCL-1 阻害で化学療法の効果が増強するかを検証する(図 1)。

### ヒト胆管癌 Patients-derived xenografts(PDX)の腫瘍における CSC の存在の確認

ヒト胆管癌 PDX の腫瘍を用いる。腫瘍細胞を分離し、フローサイトメリーにかけ CD133 陽性/CD44 陽性などの胆管癌 CSC マーカーを発現する細胞を回収する。CSC マーカーの有無で Fbxw7 mRNA の発現の増減があるかを解析する。

### 胆管癌 Xenograft マウスで Fbxw7 抑制, Mcl-1 抑制を併用する化学療法の相乗効果の検証

で用いた細胞株を用いて、FBXW7 正常発現細胞、発現抑制細胞を作成する。その細胞で皮下に移植し、マウス Xenograft モデルを作成する。それぞれに化学療法/化学療法 + MCL-1 阻害剤を投与する。FBXW7 発現低下に加え、化学療法 + MCL-1 阻害剤の相乗効果を検証する(図 1)。それらの解析により、胆管癌の休眠がん細胞、CSC を同定し、Fbxw7 および基質を標的とした新規治療法の可能性を検証できると考えられる。

## 4. 研究成果

### 術前治療を施行した病理組織標本を用い、FBXW7, 基質 c-MYC, MCL-1 の発現の解析, および臨床病理学的因子との相関を検討

上記を検討したが、FBXW7 の発現と基質分子の発現に相関は認めなかった。また、CSC 関連分子との免疫染色を行ったが、両者の関連は認めなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kashiwagi Ryosuke, Funayama Ryo, Aoki Shuichi, Matsui Aya, Klein Sebastian, Sato Yukihiro, Suzuki Tsubasa, Murakami Keigo, Inoue Koetsu, Iseki Masahiro, Masuda Kunihiro, Mizuma Masamichi, Naito Hisamichi, Duda Dan G., Unno Michiaki, Nakayama Keiko	4. 巻 114
2. 論文標題 Collagen <sc>XVII</sc> regulates tumor growth in pancreatic cancer through interaction with the tumor microenvironment	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4286 ~ 4298
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15952	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0件

〔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	川口 桂 (Kawaguchi Kei)  (10700164)	東北大学・高度教養教育・学生支援機構・助教  (11301)	
研究分担者	青木 修一 (Aoki Shuichi)  (30844451)	東北大学・大学病院・助教  (11301)	

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