

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16448

研究課題名（和文）独自に誘導した食道癌幹細胞様細胞を用いた食道癌治療抵抗性の解析

研究課題名（英文）Analysis of anti-tumor drug resistance of esophageal cancer derived cancer stem-like cells

研究代表者

渡邊 裕策（Watanabe, Yusaku）

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80799437

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、食道癌より樹立したYES1-6にKYSE30と KYSE70を加えた8種類の食道癌細胞株からcancer stem-like cell (CSLC) の誘導を行った。KYSE70及びYES2をCSLC形成株、KYSE30をCSLC非形成株として以後の解析に用いた。CSLC非形成株であるKYSE30ではsphere誘導培地（SIM）培養下での抗癌剤耐性化は認められなかったが、CSLC形成株である抗癌剤耐性化を認めた。さらに、RAB遺伝子発現/エクソソーム/Sphere形成能/抗癌剤耐性能における相関が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、ヒト食道癌細胞株より抗がん剤耐性の亢進するcancer stem-like sphere cells (CSLCs) を誘導することができた。この食道癌CSLCの誘導にはRAB4Bやエクソソームが関与していることが示唆され、食道癌に対する新たな治療標的につながる成果が得られた。

研究成果の概要（英文）：In this study, cancer stem-like cells (CSLC) were induced from eight human esophageal cancer cell lines, including KYSE30 and KYSE70. non-sphere-forming KYSE30 cells did not become resistant to anti-cancer drugs under sphere induction medium (SIM) culture, whereas the shpere-forming KYSE70 and YES2 cells became resistant to anti-cancer drugs, such as 5-FU, irinotecan, and cisplatin. Furthermore, an interesting correlation was observed between RAB gene expression/exosomes/Sphere-forming ability/anti-cancer drug resistance.

研究分野：消化器外科

キーワード：癌

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌根治に向けては、治療抵抗性、再発・転移の原因となる Cancer stem cell (CSC) を標的とすることが必要である。CSC は癌組織中に極少数含まれ、転移能、抗癌剤耐性や放射線治療抵抗性を有し、消化器癌の術後再発や遠隔転移に関与している。研究代表者らは、膵癌及び肝癌由来の細胞株から癌幹細胞誘導用培地を用いて、CSC の表現型を伴う Cancer stem-like cell (CSLC) の誘導に成功している (Watanabe Y et al. Int J Oncol, 2014、Hashimoto N, Watanabe Y et al., BMC Cancer. 2014, 特許 6090735)。誘導した CSLC は、CSC 関連表面抗原を表出し、高い腫瘍原性と肝転移能を有し、stemness 遺伝子および Epithelial-Mesenchymal transition (EMT) 関連遺伝子の高発現も確認された。さらに細胞周期の休止、薬剤排出に関連する ABC transporter の発現亢進といった抗癌剤耐性も有していた (Watanabe Y, et al. Int J Oncol, 2014; Hashimoto N, et al. BMC Cancer, 2014; Nishiyama M, et al. Cancer Sci, 2018)。このように、我々の誘導した細胞は CSC の性格を有しており、この誘導方法は、癌組織中に極少量しか存在しない CSC を大量に誘導することが出来た。

2. 研究の目的

本研究は、癌幹細胞 (Cancer stem cell: CSC) を標的とした予後不良な食道癌に対する新規治療法開発を目的とする。我々の CSLC 誘導技術を用いて、食道癌細胞株からの CSLC を調製する。食道癌 CSLC に特異的に発現する分子を解析し、CSLC が持つ抗癌剤耐性や、現在注目されている免疫チェックポイント阻害薬からの免疫逃避機構を明らかにする。

3. 研究の方法

細胞株

ヒト食道癌細胞株として YES1-6 および KYSE30 と KYSE70 を用いた。細胞は 10%FBS 含有 DMEM 培地にて 37℃, 5%CO₂、湿潤条件下にて培養した。

CSLC 誘導

既報に従って (Hashimoto N, et al. BMC Cancer. 2014; Nishiyama M, et al. Cancer Sci. 2018)、Sphere 誘導培地によって 1 週間培養して得られた浮遊 Sphere 細胞を回収した。

抗がん剤感受性解析

テトラゾリウム化合物 (MTS) を含む CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (プロメガ) を用いて cell viability を測定した。培養液中の細胞を、5-フルオロウラシル (Sigma-Aldrich) またはドセタキセル (Sigma-Aldrich) のいずれかを含んだ 10% FBS 含有 DMEM 培地にて 37℃, 5%CO₂、湿潤条件下にて 24 時間培養した。MTS 試薬添加 2 時間後の O.D. 492 および O.D. 650 を、EnVision プレートリーダー (PerkinElmer) を用いて測定した。抗がん剤で処理した細胞の生存率は、抗がん剤非存在下での生存率に対する比率として計算した。

RNA sequencing (RNA-seq)

細胞を QIAzol (Qiagen) により溶解し、miRNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて total RNA を単離した。RNA の品質は、Bioanalyzer 分析 (Agilent Technologies) により確認した。TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Gold LT Sample Prep kit (Illumina) を用いて、シーケンスライブラリを構築した。ライブラリーは、Bioanalyzer 分析による定量、および Qubit dsDNA HS Assay キットと Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) を用いた蛍光法による定量後にプールされた。ペアエンド断片 (75 bp x 2) の塩基配列 (fastq 形式) を NextSeq 500 (Illumina) を用いて得た。データは、cutadapt と cmpfastq_pe.pl を用いてリードのクリーニングを行った。クリーニングされたショートリードは、STAR (version 2.5.1b) を用いて参照ゲノム (hg38) にマッピングされ、各サンプルの鎖特異的なカウントは、RSEM (version 1.3.3) を用いて取得した後に、TCC パッケージを用いた Trimmed Mean of M values 法で正規化した。EdgeR (version 3.28.1) を用いて、q 値 < 0.05 で 2 倍以上の変化を示した遺伝子を差次的発現とみなした。Gene set enrichment analysis (GSEA) は、Java コマンドラインプログラム GSEA2 (バージョン 4.3.2) を用いて実施した。

エクソソーム定量

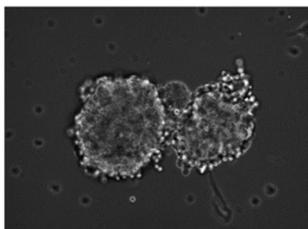
細胞を 24 時間培養した後、新鮮な培養液に交換した。同時に、MTS アッセイを用いて複製プレートから細胞生存率を測定し、エクソソームの定量の正規化に使用した。エクソソームの定量には、回収した培養液を CD9/CD63 Exosome ELISA Kit, Human (Cosmo Bio) を用いて分析した。Envision プレートリーダー (PerkinElmer) を用いてシグナルを検出した。必要に応じて、細胞

播種の翌日にエクソソーム阻害剤として GW4869 塩酸塩水和物 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) を添加した。

4. 研究成果

本研究では、食道癌より独自に樹立した YES1-6 と購入した KYSE30 及び KYSE70 を加えた 8 種類の食道癌細胞株から CSLC の誘導を行った。CSLC の誘導には独自の sphere 誘導培地 (SIM) を用い、形態的に sphere 誘導能を評価した結果、KYSE70 及び YES2 を sphere 形成株、KYSE30 を sphere 非形成株として以後の解析に用いた (図 1)。

KYSE70-sphere



YES2-sphere

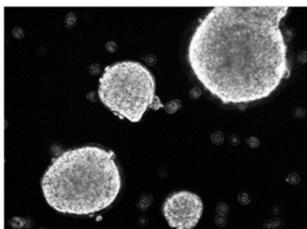


図 1. ヒト食道癌細胞株より誘導した cancer stem-like cells

これら細胞株の DMEM with 10% FBS を用いた通常培養下と SIM での培養下での抗癌剤耐性 (5-FU, ドセタキセル, シスプラチン) を評価した。Sphere 非形成株である KYSE30 では SIM 培養下での抗癌剤耐性化は認められなかったが、Sphere 形成株である KYSE70 は SIM 培養下において 5-FU およびドセタキセルに対する耐性化を認め、YES2 は同様にシスプラチンに対する耐性化を認めた (図 2)。

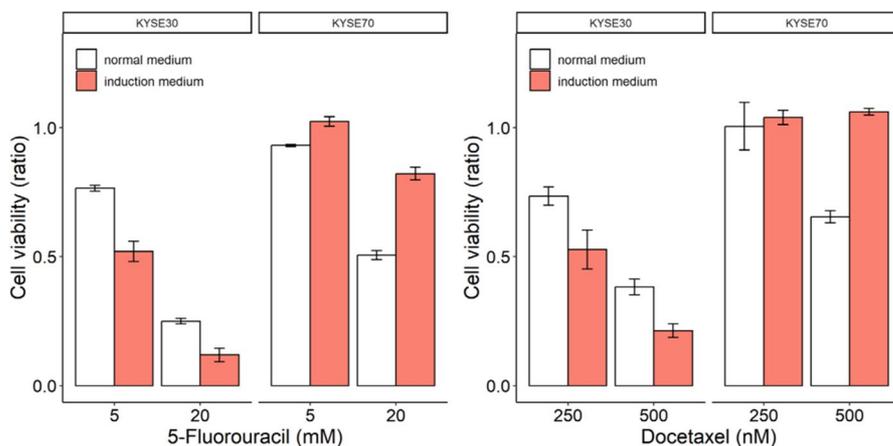


図 2. Sphere 形成株及び Sphere 非形成株における抗がん剤感受性

RNA-seq と続く Gene Set Enrichment Analysis を行った結果、KYSE70 と YES2 に共通して、通常培養下と比較して SIM 培養下での低酸素や ABC トランスポーターの正の enrichment や細胞周期の負の Enrichment が確認された (図 3)。

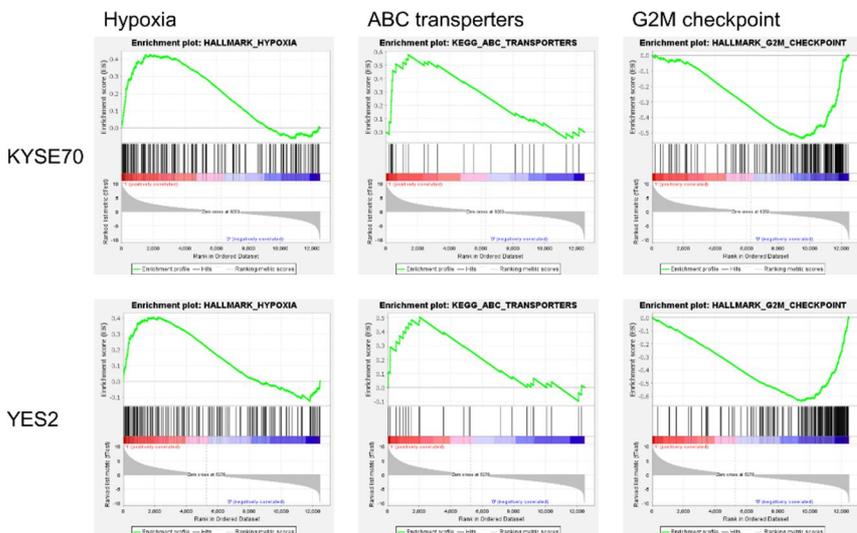


図 3. Gene set enrichment analysis

さらに、肝癌での sphere 誘導には細胞外分泌小胞エクソソームが関与していると示されたことから (Tsunedomi R, et al. BMC Cancer, 2022)、エクソソームについても解析を行った。食道癌細胞株 sphere における抗癌剤耐性はエクソソーム阻害剤によって減弱が認められ、sphere 形成株でのエクソソーム量の増加も観察された (図 4)。さらに、エクソソーム放出量は RAB4B 遺伝子ノックダウンによって増加することも示された。

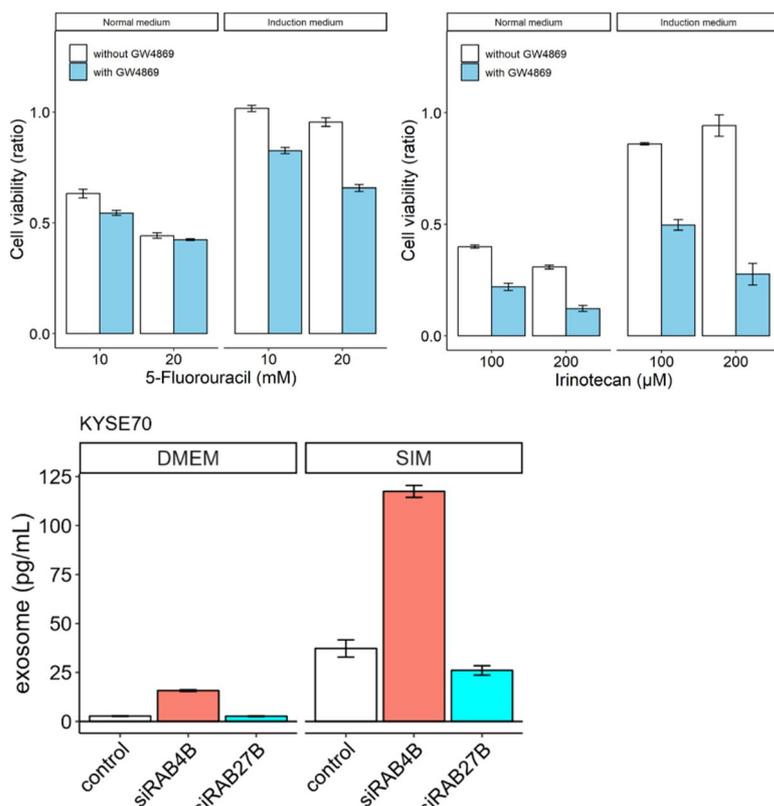


図 4. エクソソーム阻害剤による抗がん剤感受性への影響および CSLC におけるエクソソーム量

通常培地と SIM 培地のどちらにおいても KYSE70 細胞は、RAB4B ノックダウン細胞コントロールと比較して、5-FU 存在下での生存率が著しく減少していた (図 5)。Docetaxel 存在下においても同様の結果であった。また、sphere 誘導条件下において KYSE70 細胞における RAB4B ノックダウンでの sphere サイズの減少も観察された。

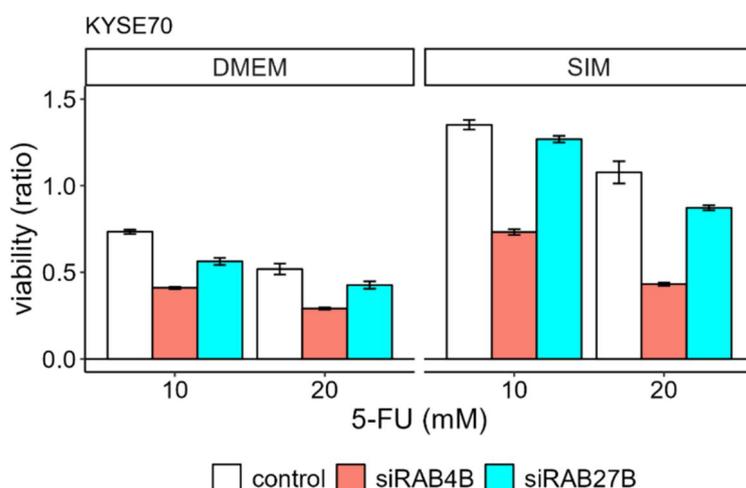


図 5. RAB4B ノックダウンによる抗がん剤感受性への影響

本研究において、食道癌細胞株より誘導された CSLC では、RAB4B ノックダウンによってエクソソーム分泌量の増加が確認されたが、抗がん剤耐性は減少していた。また、スフィア誘導条件下において、RAB4B ノックダウンによってスフィアサイズが小さくなっており、RAB4B ノックダウンがスフィア形成能に及ぼす影響も観察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Furuya Kei, Nakajima Masao, Tsunedomi Ryouichi, Nakagami Yuki, Xu Ming, Matsui Hiroto, Tokumitsu Yukio, Shindo Yoshitaro, Watanabe Yusaku, Tomochika Shinobu, Maeda Noriko, Iida Michihisa, Suzuki Nobuaki, Takeda Shigeru, Hazama Shoichi, Ioka Tatsuya, Hoshii Yoshinobu, Ueno Tomio, Nagano Hiroaki	4. 巻 24
2. 論文標題 High serum proteinase-3 levels predict poor progression-free survival and lower efficacy of bevacizumab in metastatic colorectal cancer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 165
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-024-11924-4	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 KONDO JUNYA, YOSHINO SHIGEFUMI, IIDA MICHIHISA, TAKEDA SHIGERU, NAKASHIMA CHIYO, WATANABE YUSAKU, NISHIYAMA MITSUO, TOKUMITSU YUKIO, SHINDO YOSHITARO, NISHIMURA TAKU, SUZUKI NOBUAKI, HOSHII YOSHINOBU, ITOH HIROSHI, NAGANO HIROAKI	4. 巻 44
2. 論文標題 Effects of Extended Fixation on Advanced Gastric Cancer HER2 Status Assessment Using IHC and FISH	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 621 ~ 630
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancer.16851	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 Yamamoto Tsunenori, Tsunedomi Ryouichi, Nakajima Masao, Suzuki Nobuaki, Yoshida Shin, Tomochika Shinobu, Xu Ming, Nakagami Yuki, Matsui Hiroto, Tokumitsu Yukio, Shindo Yoshitaro, Watanabe Yusaku, Iida Michihisa, Takeda Shigeru, Hazama Shoichi, Tanabe Tsuyoshi, Ioka Tatsuya, Hoshii Yoshinobu, Kiyota Akifumi, et al.	4. 巻 30
2. 論文標題 IL-6 Levels Correlate with Prognosis and Immunosuppressive Stromal Cells in Patients with Colorectal Cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 5267 ~ 5277
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-023-13527-y	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 Nakagami Yuki, Hazama Shoichi, Suzuki Nobuaki, Yoshida Shin, Tomochika Shinobu, Matsui Hiroto, Shindo Yoshitaro, Tokumitsu Yukio, Matsukuma Satoshi, Watanabe Yusaku, Iida Michihisa, Tsunedomi Ryouichi, Takeda Shigeru, Fujita Tomonobu, Kawakami Yutaka, Ogihara Hiroyuki, Hamamoto Yoshihiko, Ioka Tatsuya, et al	4. 巻 22
2. 論文標題 CD4 and FOXP3 as predictive markers for the recurrence of T3/T4a stage II colorectal cancer: applying a novel discrete Bayes decision rule	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 1071
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-022-10181-7	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 Tsunedomi Ryouichi, Yoshimura Kiyoshi, Kimura Yuta, Nishiyama Mitsuo, Fujiwara Nobuyuki, Matsukuma Satoshi, Kanekiyo Shinsuke, Matsui Hiroto, Shindo Yoshitaro, Watanabe Yusaku, Tokumitsu Yukio, Yoshida Shin, Iida Michihisa, Suzuki Nobuaki, Takeda Shigeru, Ioka Tatsuya, Hazama Shoichi, Nagano Hiroaki	4. 巻 22
2. 論文標題 Elevated expression of RAB3B plays important roles in chemoresistance and metastatic potential of hepatoma cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-022-09370-1	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15件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 渡邊裕策、武田茂、飯田通久、西山光郎、中島千代、山本常則、新藤芳太郎、徳光幸生、友近忍、鈴木申明、井岡達也、永野浩昭
2. 発表標題 BIA 法を用いた食道癌周術期患者の体組成評価
3. 学会等名 第123回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 渡邊裕策、武田茂、西山光郎、飯田通久、山本常則、中島千代、井岡達也、永野浩昭
2. 発表標題 当科における術前 DCF 療法の成績
3. 学会等名 第77回日本食道学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 武田茂、飯田通久、渡邊裕策、西山光郎、新藤芳太郎、徳光幸生、友近忍、鈴木伸明、井岡達也、永野浩昭
2. 発表標題 食道癌患者に対する術前化学療法中の栄養介入の有効性
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 渡邊裕策、武田茂、飯田通久、西山光郎、中島千代、山本常則、新藤芳太郎、鈴木伸明、井岡達也、永野浩昭
2. 発表標題 当科における高齢者食道癌の手術治療成績
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 恒富亮一、吉村清、中島正夫、木村祐太、松井洋人、新藤芳太郎、徳光幸生、渡邊裕策、友近忍、飯田通久、鈴木伸明、武田茂、井岡達也、永野浩昭
2. 発表標題 ヒト肝癌細胞株より誘導した癌幹細胞様細胞の特性
3. 学会等名 第166回日本獣医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中島正夫、恒富亮一、徳光幸生、新藤芳太郎、松井洋人、中上裕有樹、玉田耕治、宇高恵子、坂元亨宇、齋藤 彰、渡邊裕策、友近 忍、吉田 晋、飯田通久、鈴木伸明、武田 茂、井岡達也、裕 彰一、永野浩昭
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害剤の治療限界を克服しうる新規がんペプチドワクチンによる腫瘍免疫原性の向上
3. 学会等名 第35回日本バイオセラピー学会学術集会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 恒富亮一、吉村 清、木村祐太、西山光朗、松隈 聡、渡邊裕策、徳光幸生、友近 忍、吉田 晋、飯田通久、鈴木伸明、武田 茂、井岡達也、碓 彰一、永野浩昭
2. 発表標題 がんの進展・浸潤に關与する肝癌幹細胞様Sphere細胞におけるRAB3Bの役割
3. 学会等名 第60回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊裕策、武田 茂、飯田通久、西山光郎、中島千代、徳光幸生、友近 忍、吉田 晋、鈴木伸明、永野浩昭
2. 発表標題 特発性食道破裂9例の検討
3. 学会等名 第76回日本食道学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 恒富亮一、吉村 清、木村祐太、西山光郎、松井洋人、新藤芳太郎、徳光幸生、渡邊裕策、友近 忍、吉田 晋、飯田通久、鈴木伸明、武田 茂、井岡達也、永野浩昭
2. 発表標題 肝癌幹細胞における自然免疫系からの逃避
3. 学会等名 第31回日本転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊裕策、武田 茂、西山光郎、飯田通久、中島千代、徳光幸生、新藤芳太郎、松隈 聡、松井洋人、友近 忍、吉田 晋、鈴木伸明、井岡達也、永野浩昭
2. 発表標題 食道癌術後胃管再建における再建経路別による検討
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊裕策、武田 茂、永野浩昭
2. 発表標題 食道癌根治術後のサーベイランス～再発，異時性重複癌の検討～
3. 学会等名 第29回日本消化器関連学会週間
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊裕策、飯田通久、武田 茂、中島千代、西山光郎、松井洋人、徳光幸生、新藤芳太郎、吉田 晋、鈴木伸明、井岡達也、永野浩昭
2. 発表標題 高齢者胃癌に対する胃切除後長期予後の予測因子
3. 学会等名 第59回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊裕策、武田 茂、飯田通久、西山光郎、中島千代、山本常則、永野浩昭
2. 発表標題 当教室における食道癌周術期の取り組み
3. 学会等名 第75回日本食道学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊裕策、武田 茂、西山光郎、飯田通久、中島千代、徳光幸生、吉田 晋、鈴木伸明、井岡達也、永野浩昭
2. 発表標題 食道癌周術期の取り組み
3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村祐太、恒富亮一、松隈 聡、松井洋人、新藤芳太郎、徳光幸生、渡邊裕策、友近 忍、前田訓子、吉田 晋、飯田通久、鈴木伸明、武田茂、井岡達也、裕 彰一、上野富雄、永野浩昭
2. 発表標題 肝癌細胞株から誘導したがん幹細胞様細胞の免疫逃避能に関する研究
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021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