

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293173

研究課題名(和文) 新たな癌幹細胞特異的因子をターゲットにした消化器癌治療戦略

研究課題名(英文) Anti-cancer therapies based on novel cancer stem cell-specific factors

研究代表者

妹尾 浩 (Seno, Hiroshi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90335266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、癌幹細胞の本態を学術的に探求するとともに、消化器癌幹細胞標的治療の開発を目指した。そのため、以下の検討を行った。1) 腸管においてDcl1k1を軸とした複数の幹細胞マーカーを利用して、癌幹細胞のトランスクリプトームを解析した。2) 胃癌、膵癌、胆嚢癌モデルで、Dcl1k1および新規の癌幹細胞特異的因子の意義を検討した。3) 癌モデルマウス、癌スフェロイド3次元培養系を用いて、癌幹細胞に発現するキナーゼ、細胞膜表面蛋白などの消化器癌治療標的としての可能性を検証した。これら1)～3)の検討により、癌幹細胞標的療法へ向けた基盤整備を行うことができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we explored the nature of cancer stem cells, and sought the possibility of anti-cancer stem cell-targeting therapies. For that purpose, we performed the experiments as follows. 1) In the intestine, transcriptome of cancer stem cells was analyzed based on the expression of various stem cell markers, especially Dcl1k1. 2) The roles of Dcl1k1 and novel cancer stem cell-specific markers were investigated in mouse gastric, pancreatic, and gall bladder cancer models. 3) Therapeutic potentials of kinases and cell surface proteins in cancer stem cells were examined in mouse cancer models and cancer spheroids. Based on these experiments, basis for the development of anti-cancer stem cell therapies was established.

研究分野：消化器内科学

キーワード：癌 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

近年の幹細胞研究の進捗により、正常組織幹細胞と同様に、癌組織にも癌幹細胞の存在が想定されている。「癌幹細胞を標的とする癌治療法」が注目を集める一方、研究開始当初には、解決すべき課題が多く残されていた。そのひとつに、既報の癌幹細胞マーカーの多くは正常組織幹細胞にも発現している点があげられていた。例えば、Lgr5は大腸癌幹細胞のマーカーとされるが、同時に代表的な正常大腸組織幹細胞マーカーでもある(Nature, 457, 608-, 2009)。このようなマーカーを用いて治療を行うと、癌は退縮しても正常組織に大きな副作用が予想された。したがって、正常組織幹細胞に発現せず、癌幹細胞特異的に発現するマーカーが必要とされていた。世界中の研究者らが、そのようなマーカーを特定すべく研究を行い、例えば胃癌におけるCD44バリエーションなど(Cancer Cell, 19, 387-, 2011)、少しずつ研究成果が挙がりつつあったものの、実用化への道のりは遠かった。

そこで申請者らは癌幹細胞に特異的なマーカーを検討し、大腸癌幹細胞の特異的なマーカーとしてDclk1を見いだした(Nat Genet, 45, 98-, 2013)。申請者らが独自に作製したDclk1-CreERT2ノックインマウスをApcMinマウスと交配してリニエージ・トレーシングを行ったところ、ApcMinマウスの腸腫瘍ではDclk1陽性細胞から腫瘍細胞が供給され、腫瘍全体がDclk1陽性細胞の子孫細胞で占められた。一方、正常腸組織ではDclk1は一部の分化した細胞にのみ発現していた。Dclk1陽性細胞のみをジフテリアトキシンで排除すると、腫瘍全体が劇的に退縮した。このように、Dclk1陽性細胞の選択的排除は、正常腸管を傷害せずに腫瘍のみを退縮させる、理想的な癌治療につながる可能性が考えられた。

Dclk1陽性細胞は、ヒト胃癌、膵癌、胆嚢癌でも、またそれらのモデルマウスでも癌組織中に存在している。そのため、Dclk1陽性細胞を標的とする「細胞標的療法」は、多くの消化器癌に応用できる可能性があると考えられた。しかし、Dclk1陽性細胞を含めた癌幹細胞の維持機構や治療の具体的方策については、研究開始当初は十分にわかっていなかった。本申請に先立って、申請者らはApcMinマウスのDclk1陽性腫瘍幹細胞特異的に発現する因子をcDNAマイクロアレイで絞り込み、複数のキナーゼや酵素(Fdps、Pib5pa、Ptpn6など)細胞膜表面蛋白(Lrmp、Tmem160、Tm4sf4など)を同定した。本研究では、これらの知見を発展させて、Dclk1を軸にすえて様々な幹細胞マーカーを複合的に利用したオミックス解析を展開し、癌幹細胞の特質に迫ることを考えた。さらに、新規の癌幹細胞特異的因子を同定し、癌幹細胞標的治療実現へ向けた具体的な治療シーズを得たいと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、開始当初に以下の目的を設定した。

(1) 腸管における新規の癌幹細胞特異的因子の網羅的同定:

Dclk1をはじめ、Lgr5、Sox9など複数の幹細胞マーカーも併用して、マウス腸腫瘍幹細胞のゲノム、エピゲノム、代謝に関する解析を追加し、新規の癌幹細胞特異的因子を同定する。これら包括的な解析によって、大腸癌幹細胞維持機構の本態に迫るとともに、新たな大腸癌幹細胞治療のシーズ獲得を目指す。

(2) 胃、膵臓、胆嚢など多臓器での癌幹細胞特異的因子の検証:

胃癌、膵癌、胆嚢癌モデルマウスでリニエージ・トレーシングを行い、癌幹細胞マーカーとしてのDclk1の臓器特異性を検証する。そのうえで、上記(1)で得られた新規因子の発現、意義を多臓器で検討し、臓器横断的な癌幹細胞特異的因子の検証と獲得を目指す。

(3) 消化器癌を横断する癌幹細胞標的治療の開発:

本研究開始までに得た治療シーズに加えて、本研究で新しく同定する治療標的候補について、1) 癌スフェロイド3次元培養系を用いて、Dclk1陽性癌幹細胞特異的に発現するキナーゼ、酵素類の阻害実験を行い、核酸医薬・小分子化合物開発を視野に入れた検討を行う。2) Dclk1陽性癌幹細胞特異的な細胞膜表面蛋白を標的とする治療法の効果を検証し、新規抗体医薬開発へ向けた知見を得る。

これらの研究を通じて、癌幹細胞の本態を学術的に探求するとともに、新規かつ普遍的な癌幹細胞標的治療開発へ向けた前臨床的研究を展開する。

3. 研究の方法

本研究では、以下の様な研究展開を予定した。

(1) 腸管における新規の癌幹細胞特異的因子の網羅的同定:

Dclk1を軸とした複数の幹細胞マーカーを利用して、癌幹細胞のゲノム、エピゲノム、代謝に関する解析を行う。

(2) 胃、膵臓、胆嚢など多臓器での癌幹細胞特異的因子の検証:

胃癌、膵癌、胆嚢癌モデルで、1) リニエージ・トレーシングによりDclk1の意義を検証し、2) 新規の癌幹細胞特異的因子の意義を検討する。

(3) 消化器癌を横断する癌幹細胞標的治療の開発:

癌モデルマウス、癌スフェロイド3次元培養系を用いて、1) キナーゼや酵素、2) 細胞膜表面蛋白など、新規癌幹細胞特異的因子の治療標的としての可能性を検討する。

これら(1)~(3)を同時並行的に展開し、癌幹細胞標的療法の具体的な戦略を探ることとした。

4. 研究成果

本研究の研究成果を年度別、方法別に記載する。

平成 26 年度：

(1) 腸管における新規の癌幹細胞特異的因子の網羅的同定：

Dclk1 の他、Lgr5 など代表的な幹細胞マーカー-GFP マウスと ApcMin マウスとを交配し、Dclk1 および他の幹細胞マーカーが高発現している腫瘍および正常組織幹細胞分画を FACS によって収集した。そのうえで、cDNA マイクロアレイ解析を行い、Dclk1 陽性癌幹細胞特異的因子を絞り込んだ。それらの因子については、免疫染色でも Dclk1 との共陽性を確認したことから、新たな大腸癌幹細胞特異的マーカーとしての可能性が示唆された。

(2) 胃、膵臓、胆嚢など多臓器での癌幹細胞特異的因子の検証：

胃癌 (K19-Wnt1/C2mE マウス)、膵癌 (Ptf1a-Cre; KrasG12D マウス)、胆嚢癌 (BK5.ErbB2 トランスジェニックマウス) など各種消化器癌のモデルマウスと、Dclk1-CreERT2 ノックインマウスとを交配し、リニエージ・トレーシングによって Dclk1 が癌幹細胞マーカーであるかを検証した。その結果、Dclk1 は膵においても腫瘍特異的幹細胞マーカーであることが示された。また、Dclk1 は胃においても腫瘍幹細胞の一部をマークすることが示され、Dclk1 のより普遍的な意義が示された。

(3) 消化器癌を横断する癌幹細胞標的治療の開発：

Dclk1 陽性癌幹細胞に特異的に発現するキナーゼや酵素類について、癌スフェロイド 3 次元培養系を用いて、阻害剤等による阻害実験を行った。その結果、Dclk1 陽性細胞に特異的に発現するキナーゼ類を 2 種類同定し、それらの阻害によって、癌スフェロイドの成長が阻害されることを見いだした。

平成 27 年度：

(1) 腸管における新規の癌幹細胞特異的因子の網羅的同定：

癌は TCA 回路以外に、グルタミンオリシスや低酸素環境に適応できる特異な代謝系を持つ。さらに幹細胞にも特有の代謝系が想定され、それらが癌幹細胞の治療抵抗性を含めた特異な性質に寄与している。平成 27 年度は、腸管において Dclk1 および他の幹細胞マーカーを用いて癌幹細胞分画を FACS によって収集した。cDNA マイクロアレイにより、Dclk1 陽性細胞特異的に発現する因子を解析し、脂質代謝、酸化ストレスを制御する因子等が高発現していることを見いだした。引き続き、薬剤耐性や酸化ストレスなどの関連を検討した。

(2) 胃、膵臓、胆嚢など多臓器での癌幹細胞特異的因子の検証：

平成 26 年度に作製した各臓器の癌モデルマウスと iDTR マウスとの交配を進めた。さら

に、平成 26 年度に同定した腸管における癌幹細胞特異的因子が、胃、膵臓、胆嚢など様々な消化器癌モデルマウスでどのような局在を示すかを免疫染色等で検討し、Dclk1 陽性細胞に発現する諸因子は、消化器臓器横断的に癌細胞に発現していることを見いだした。

(3) 消化器癌を横断する癌幹細胞標的治療の開発：

平成 26 年度に引き続き、癌幹細胞に特異的に発現するキナーゼや酵素類の意義を確認した。その結果、複数のキナーゼ、および低分子量 G タンパク質の阻害によって、ヒト大腸癌細胞株、および ApcMin マウス腸腫瘍の増殖抑制が生じることを見いだした。また、本研究を進める過程で得られた新たな癌幹細胞特異的膜表面蛋白候補を絞り込むことにも成功した。

平成 28 年度：

(1) 腸管における新規の癌幹細胞特異的因子の網羅的同定：

Dclk1 および他の幹細胞マーカーを用いて癌幹細胞分画を FACS によって収集し、これまでに同定した脂質代謝、酸化ストレスを制御する因子の意義を検討した。これにより、酸化ストレスのほか、薬剤耐性のメカニズムなど、癌幹細胞特有の代謝機構にも手掛かりを得ることができた。

(2) 胃、膵臓、胆嚢など多臓器での癌幹細胞特異的因子の検証：

各臓器の癌モデルマウスと iDTR マウスとの交配を完了し、解析を行った。ジフテリアトキシンによる Dclk1 陽性細胞の選択的排除が、腫瘍退縮をもたらすことを膵臓腫瘍モデルで検証した。さらに、ヒト胃癌、膵癌、胆嚢癌などの臨床検体でも、同様にそれら因子の発現を確認し、マウスとヒトとの整合性を検証したところ、とくに膵臓において、マウスとヒトの間で同様の Dclk1 発現パターンを認めることができた。

(3) 消化器癌を横断する癌幹細胞標的治療の開発：

ヒト大腸癌細胞株、および ApcMin マウス腸腫瘍の増殖抑制を確認しえた複数のキナーゼ、および低分子量 G タンパク質に関して、活性を阻害する小分子化合物のスクリーニングに取り組むことを企図した。さらに、消化器癌モデルマウスも用いて、「癌幹細胞特異的マーカー」を標的とする抗体医薬の可能性をより広く探ることも目的とした。その結果、低分子量 G タンパク質の活性を阻害する小分子化合物の効果をマウス生体内で検証し、有意ではないものの、腸腫瘍の減少傾向を認めた。さらに抗体医薬の標的候補として、マウスとヒトの間で同様の発現パターンを認める因子を同定し、それらの阻害により、一部の腫瘍が退縮する可能性を示すことができた。

以上、癌幹細胞特異的マーカー-Dclk1 を手掛かりとしたこれらの研究によって、癌幹細胞

胞の本態に迫るとともに、具体的な癌分子標的治療のシーズ発掘および検証を行うことができた。これらの検討により、消化器臓器における癌幹細胞の本態に迫り、臓器横断的な「正常組織幹細胞を傷害しない、癌幹細胞標的治療」の実現を目指す基盤を整備し得たものと考えらる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 19 件)

1. Kou T, Kanai M, Yamamoto Y, Kamada M, Nakatsui M, Sakuma T, Mochizuki H, Hiroshima A, Sugiyama A, Nakamura E, Miyake H, Minamiguchi S, Takaori K, Matsumoto S, Haga H, Seno H, Kosugi S, Okuno Y, Muto M. Clinical Sequencing Using a Next-Generation Sequencing-Based Multiplex Gene Assay in Patients with Advanced Solid Tumors. *Cancer Sci*. 査読有 (in press)
2. Takeda H, Ueda Y, Inuzuka T, Yamashita Y, Osaki Y, Nasu A, Umeda M, Takemura R, Seno H, Sekine A, Marusawa H. Evolution of multi-drug resistant HCV clones from pre-existing resistant-associated variants during direct-acting antiviral therapy determined by third-generation sequencing. *Sci Rep*. 査読有 2017 Mar 31;7:45605.
3. Matsumoto T, Takahashi K, Inuzuka T, Kim S, Kurosaki T, Kawakami S, Chiba T, Seno H, Marusawa H. Activation of TNF-alpha-AID axis and co-inhibitory signals in coordination with Th1-type immunity in a mouse model recapitulating hepatitis B. *Antiviral Res*. 査読有 2017 Mar;139:138-145.
4. Kimura Y, Ikuta K, Kimura T, Chiba T, Oshima H, Oshima M, Nishi E, Seno H. Nardilysin regulates inflammation, metaplasia, and tumors in murine stomach. *Sci Rep*. 査読有 2017 Feb 23;7:43052.
5. Basak O, Beumer J, Wiebrands K, Seno H, van Oudenaarden A, Clevers H. Induced Quiescence of Lgr5+ Stem Cells in Intestinal Organoids Enables Differentiation of Hormone-Producing Enteroendocrine Cells. *Cell Stem Cell*. 査読有 2017 Feb 2;20(2):177-190.e4.
6. Sakuma Y, Kodama Y, Sogabe Y, Nakai Y, Yamashita Y, Mikami S, Kajimura K, Ikeda K, Tamaki H, Iwamoto S, Matsuda F, Fujita K, Uza N, Kawamura T, Uemoto S, Seno H, Chiba T, Yazumi S; Kyoto Pancreatobiliary Study Group. Diagnostic performance of a new “endoscopic scraper” for malignant biliary strictures: A multicenter prospective study. *Gastrointest Endosc*. 査読有 2017 Feb;85(2):371-379.
7. Eso Y, Takai A, Takeda H, Matsumoto T, Lee M, Inuzuka T, Takahashi K, Ueda Y, Marusawa H, Seno H. Sonazoid-enhanced ultrasonography guidance improves the quality of pathological diagnosis in the biopsy of focal hepatic lesions. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 査読有 2016 Dec;28(12):1462-1467.
8. Takada Y, Fukuda A, Chiba T, Seno H. Brg1 plays an essential role in development and homeostasis of the duodenum through regulation of Notch signaling. *Development*. 査読有 2016 Oct 1;143(19):3532-39.
9. Shiokawa M, Kodama Y, Kuriyama K, Yoshimura K, Tomono T, Morita T, Kakiuchi N, Matsumori T, Mima A, Nishikawa Y, Ueda T, Tsuda M, Yamauchi Y, Minami R, Sakuma Y, Ota Y, Maruno T, Kurita A, Sawai Y, Tsuji Y, Uza N, Matsumura K, Watanabe T, Notohara K, Tsuruyama T, Seno H, Chiba T. Pathogenicity of IgG in patients with IgG4-related disease. *Gut*. 査読有 2016 Aug;65(8):1322-32.
10. Nakatsuji M, Minami M, Seno H, Yasui M, Komekado H, Higuchi S, Fujikawa R, Nakanishi Y, Fukuda A, Kawada K, Sakai Y, Kita T, Libby P, Ikeuchi H, Yokode M, Chiba T. EP4 receptor-associated protein in macrophages ameliorates colitis and colitis-associated tumorigenesis. *PLoS Genet*. 査読有 2015 Oct 6;11(10):e1005542.
11. Muta Y, Nishikawa Y, Watanabe K, Kawano K, Seno H, Chiba T, Yazumi S. Endoscopic intraluminal cutting technique for indwelling devices using a lithotripter handle and guidewire. *Endoscopy*. 査読有 2015 0;47(S 01):E251-E252.
12. Hiramatsu Y, Ida H, Seno H. Images of the Month: A polypoid lesion in the portal vein. *Am J Gastroenterol*. 査読有 2015 Jun;110(6):798.
13. Matsumoto Y, Matsukawa H, Seno H, Ono S. Education and Imaging.

- Gastrointestinal: breast cancer metastasis to the esophagus diagnosed using endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration. *J Gastroenterol Hepatol*. 査読有 2015 Feb;30(2):233.
14. Kimura Y, Seno H, Ono S. A case of acute necrotizing esophagitis. *Gastrointest Endosc*. 査読有 2014 Sep;80(3):525-6.
 15. Ishizu-Higashi S, Seno H, Nishi E, Matsumoto Y, Ikuta K, Tsuda M, Kimura Y, Takada Y, Kimura Y, Nakanishi Y, Kanda K, Komekado H, Chiba T. Deletion of nardilysin prevents the development of steatohepatitis and liver fibrosis. *PLoS One*. 査読有 2014 May 21;9(5):e98017.
 16. Ikuta K, Seno H, Chiba T. Molecular changes leading to gastric cancer: a suggestion from rare-type gastric tumors with GNAS mutations. *Gastroenterology*. 査読有 2014 May;146(5):1417-8.
 17. 後藤規弘、妹尾浩 腫瘍幹細胞を標的とした新規治療法の可能性 細胞 査読無 48: 414-417, 2016
 18. 妹尾浩、中西祐貴 癌幹細胞を標的とした大腸癌治療 *Medical Practice* 査読無 32: 1829-1831, 2015
 19. 妹尾浩、山賀雄一、中西祐貴、千葉勉 細胞系譜解析による大腸腫瘍幹細胞特異的な因子の同定 *日本臨床* 査読無 73, 850-854, 2015
- [学会発表](計 19 件)
1. 妹尾浩 下部消化管疾患における臨床と研究の融合 日本消化器病学会近畿支部教育講演会 2017.2.25 大阪 大阪国際交流センター
 2. 妹尾浩、丸野貴久、津田喬之、福田晃久 Hierarchy in mouse digestive organ tumors. 第 39 回日本分子生物学会年会 シンポジウム 幹細胞とがんの最前線 2016.12.1 横浜 パシフィコ横浜
 3. 妹尾浩 Cell of origin and tumor stem cells in mouse digestive organ tumors. 第 47 回高松宮妃癌研究基金国際シンポジウム 2016.11.10 東京 パレスホテル東京
 5. 妹尾浩 消化器癌はどこから来るのか～細胞系譜解析による可視化～ Scientific Exchange Meeting 2016 in Osaka 2016.10.19 大阪 リーガロイヤルホテル大阪
 6. 妹尾浩、丸野貴久、後藤規弘、福田晃久 消化器腫瘍における腫瘍幹細胞標的治療 第 75 回日本癌学会総会 腫瘍別シンポジウム 1「消化器癌領域における最新の医療研究開発」 2016.10.6 横浜 パシフィコ横浜
 7. Seno H, Maruno T, Fukuda A. Role of Dclk1-expressing cells in digestive organs. 第 41 回内藤コンファランス 2016.7.6 札幌 シャトレーゼガトーキングダムサッポロ
 8. 妹尾浩 消化器臓器における腫瘍幹細胞の役割 第 4 回 Cancer Stem Cell Symposium 2015.11.14 博多 ホテル日航福岡
 9. 妹尾浩、福田晃久、丸野貴久、後藤規弘、千葉勉 Cell of origin and complexity in digestive organ tumors. 第 74 回日本癌学会学術総会 コアシンポジウム 1 Complexity of cancer 2015.10.9 名古屋 名古屋国際会議
 10. Seno H. Tumor stem cells in digestive organs. 2nd IFOM-Kyoto University Joint Symposium. October 7, 2015, Kyoto, Japan.
 11. Yamaga Y, Seno H, Chiba T. Microarray analysis of Dclk1-positive tumor cells in ApcMin/+ mouse polyps. *Digestive Disease Week 2015* May, 16-19, 2015, Washington DC, USA
 12. Seno H, Yamaga Y, Matsumoto Y, Nakanishi Y, Fukuda A, Chiba T. Targeting tumor stem cells in the intestine. The 3rd JSGE International Topic Conference April, 25, 2015, Sendai, Japan.
 13. 妹尾浩 細胞系譜解析を用いた消化器腫瘍幹細胞の検討 第 14 回日本再生医療学会総会 2015.3.20 横浜 パシフィコ横浜
 14. 妹尾浩 消化器腫瘍モデルにおける DCLK1 陽性細胞の意義 平成 26 年度がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動冬期公開シンポジウム 2015.1.28 東京 一橋講堂
 15. Seno H. The role of Dclk1-positive cells in digestive organ tumors.
 16. 4th Global Cancer Genomics Consortium November, 14, 2014, Kyoto, Japan.
 17. 妹尾浩、丸野貴久、山賀雄一、吉岡拓人、中西祐貴、千葉勉 Role of Dclk1-expressing cells in digestive organ tumors. 第 73 回日本癌学会学術総会 コアシンポジウム 1 Reprogramming and transdifferentiation in cancer 2014.9.26 横浜 パシフィコ横浜
 18. 妹尾浩、中西祐貴、千葉勉 Dclk1, a specific marker for tumor stem cells in digestive organs. 癌治療の未来 消化器癌幹細胞研究と最新の知見 第 52 回日本癌治療学会学術集会 高松宮妃

癌研究基金共催国際シンポジウム
2014.8.28 横浜 パシフィコ横浜

19. Seno H. Dclk1, a specific marker for cancer stem cells that does not mark normal stem cells. iPS and Stem Cells in Cancer Research 2014.4.17
Kyoto, Japan

〔図書〕(計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕

該当なし

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~gastro/gastro.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

妹尾 浩 (SENO Hiroshi)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：90335266

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

福田 晃久 (FUKUDA Akihisa)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：70644897