

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07959

研究課題名(和文) 治療抵抗性解除による食道扁平上皮癌新規治療法の開発

研究課題名(英文) A novel treatment targeting cancer stem-like cells in esophageal squamous cell carcinoma

研究代表者

夏井坂 光輝 (Natsuzaka, Mitsuteru)

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：80642446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：多くの固形癌において癌幹細胞が同定され、治療抵抗性、再発、転移に深く関与していることが明らかとなった。申請者らは食道扁平上皮癌(ESCC)においてCD24Low/CD44High細胞が癌幹細胞であることを同定し、fibroblast growth factor-2(FGF-2)を介したFGFR/Erk経路が癌幹細胞の維持に重要であることを報告してきた。本研究ではFGFR/Erk経路を阻害し、腫瘍中のCD24Low/CD44High癌幹細胞を抑制することで治療抵抗性を解除し、抗癌剤、放射線に対する治療効果が向上することを食道扁平上皮癌オーガノイド、3次元培養法、動物モデルを用いて明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの癌において分子標的薬が実用化されている中、進行食道扁平上皮癌(ESCC)においては有効な分子標的薬が未だ無いのが現状である。本研究は進行ESCC症例に対する集学的な新規治療法開発の萌芽となる可能性がある。また、本研究で用いた食道扁平上皮癌3次元培養、オーガノイド、動物モデルは生体内に近い形での癌細胞の培養がin vitroで可能であり、通常培養法では困難な癌研究を飛躍的に向上させてきた。これらの研究手法により今後のESCC研究のさらなる向上が期待される。

研究成果の概要(英文)：The authors have identified CD24Low/CD44High cells as cancer stem-like cells (CSCs) in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). Furthermore, the authors have reported that FGF-2/FGFR/Erk pathway has critical roles in regulating CSCs in ESCC. In the present study, they have shown that FGFR/Erk inhibitors decrease CSCs in ESCC and restore sensitivity to anticancer drugs and radiation in experiments using organoid culture system, organotypic 3D culture system and xenograft experiments. FGFR/Erk inhibitors could be used as a novel therapy targeting CSCs in ESCC.

研究分野：消化器内科学、腫瘍学

キーワード：癌幹細胞 食道扁平上皮癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) 食道扁平上皮癌 (ESCC) における癌幹細胞

癌幹細胞の表面マーカーとして CD24、CD44、CD90、CD133、EpCAM、ALDH1 活性等が用いられているが (Cancer Cell. 21;283:2012)、申請者らは複数の ESCC 細胞株を用いて、CD24Low/CD44High 細胞が ESCC における癌幹細胞であることを見出した。CD24Low/CD44High 細胞は間葉系細胞の形態、性質を有し、各種抗癌剤 (5FU、CDDP) に対し有意に治療抵抗性であった。ヌードマウス、ESCC 細胞株を用いた連続腫瘍移植実験では、わずか 10 個の CD24Low/CD44High 細胞で腫瘍形成が認められた。重要なことに、連続腫瘍移植実験で CD24Low/CD44High 細胞は親腫瘍と同性質 (分化度) の腫瘍を再形成した。これらの結果は ESCC において間葉系の性質を持った CD24Low/CD44High 細胞が癌幹細胞であることを示している。

#### (2) ESCC における癌幹細胞維持・増幅機構

申請者らは ESCC において上皮系癌細胞が上皮間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) により間葉系の癌幹細胞 (CD24Low/CD44High 細胞) になることを見出した。さらに、EMT のプロセスにおいては TGF- $\beta$ 、Notch1、EGFR が重要な役割を担っており、これらの阻害剤を用いることで EMT が抑制され、CD24Low/CD44High 細胞が減少することを報告してきた。EMT を抑制する TGF- $\beta$  阻害剤、Notch1 阻害剤、EGFR 阻害剤は既存の CD24Low/CD44High 癌幹細胞に対しては治療効果が無いことが問題であったが、FGFR/Erk 経路が CD24Low/CD44High 癌幹細胞の維持に重要であり、FGFR/Erk 経路を阻害することで既存の CD24Low/CD44High 癌幹細胞を抑制できることを見出した。

#### (3) FGFR/Erk 経路阻害による治療抵抗性解除の可能性

癌幹細胞は抗癌剤、放射線治療に対する治療抵抗性に深く関与していることが多くの癌において報告されている (Battlle E. et al. Nat Med. 2017. )。申請者らも ESCC において CD24Low/CD44High 癌幹細胞が、進行 ESCC 症例において現在主に使用されている抗癌剤である CDDP、5FU に対して強い治療抵抗性を有していることを見出している。前述の学術的背景より FGFR/Erk 経路を阻害することで腫瘍中の CD24Low/CD44High 癌幹細胞を抑制し、抗癌剤及び放射線治療に対する治療抵抗性を解除できる可能性が考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究は EGFR 阻害剤、MEK 阻害剤による CD24Low/CD44High 癌幹細胞抑制作用が抗癌剤、放射線治療抵抗性に及ぼす影響を食道扁平上皮癌 3 次元培養、オーガノイド、動物モデルを用いて検証することを目的に遂行される。

申請者らは食道扁平上皮細胞、ESCC 細胞を用いたオーガノイド培養法を樹立した。オーガノイドおよび ESCC3 次元培養法は生体内に近い形での癌細胞の培養が in vitro で可能であり、通常培養法では困難な癌研究を飛躍的に向上させてきた。特にオーガノイドは 3 次元培養法よりも簡便であり、食道オーガノイドにより今後の ESCC 研究の向上が期待される。オーガノイド、3 次元培養法を用いた治療抵抗性解析は本研究の特色の一つである。また、多くの癌に対する様々な分子標的薬が臨床応用されている中、ESCC に対する確立された治療法は未だに CDDP、5FU を中心とした抗癌剤治療、放射線治療、外科的治療 (含内視鏡治療) のみである。高度進行 ESCC 症例に対する有効な治療法は無く、ESCC に対する新規治療法の開発が切に待たれている。本研究は食道扁平上皮癌の治療抵抗性解除を狙った新規治療法の開発を目指すものであり、非常に重要な研究課題に位置づけられると考える。

### 3. 研究の方法

#### (1) FGFR 阻害剤、MEK 阻害剤が抗癌剤、放射線治療感受性に及ぼす影響の検討

ESCC 細胞株 (TE8、TE11、HCE4、T-TeRAS) を用いてオーガノイドを作成する。オーガノイドに FGFR 阻害剤、MEK 阻害剤を添加し、5FU、CDDP 及び放射線治療感受性を Ki67 染色 (腫瘍増殖能)、Tunel 染色 (アポトーシス) により評価する。また、オーガノイド中に含まれる CD24Low/CD44High 細胞の割合を FACS により測定する。

上述の ESCC 細胞株を用いて 3 次元培養を行う。腫瘍細胞をフィーダーの線維芽細胞、 $\alpha$  型コラーゲン、マトリジェル等から形成されるマトリックス上に蒔いた 1 週間後より FGFR 阻害剤、MEK 阻害剤を添加する。5FU、CDDP 及び放射線治療感受性を Ki67 染色 (腫瘍増殖能)、Tunel 染色 (アポトーシス) により評価する。また、CD24Low/CD44High 細胞の割合を FACS により解析する。

#### (2) 動物モデルを用いた FGFR 阻害剤、MEK 阻害剤の治療抵抗性に及ぼす影響の検討

ESCC 細胞株 TE8、TE11、T-TeRAS 細胞をヌードマウスへ皮下移植する。腫瘍体積が 200mm<sup>3</sup> を越えた時点で FGFR 阻害剤、MEK 阻害剤を投与し、5FU、CDDP、放射線治療に対する感受性を以下の項目により評価する。

腫瘍サイズの経時的変化を測定。

腫瘍増殖能、アポトーシスを Ki67 染色、Tunel 染色にて評価。

腫瘍細胞を分離し（マウス由来の細胞は抗 H2k[d] 抗体、死細胞は 7AAD を用いて除外する）、CD24Low/CD44High 細胞の割合を FACS により測定する。

#### 4. 研究成果

##### (1) FGFR 阻害剤が CD24Low/CD44High 癌幹細胞に及ぼす影響

FGF 阻害剤は AZD4547、BGJ398、SU5402 を用いた。何れの阻害剤も TE8、HCE4 において CD24Low/CD44High 癌幹細胞を有意に抑制した。この際、FGFR 経路下流の ERK 活性は TE8、HCE4 細胞ともに抑制されていたが、Akt 活性は TE8 のみで抑制されていた。

##### (2) CD24Low/CD44High 癌幹細胞における RAS/MEK/ERK 経路の重要性

FGFR 阻害剤は TE8、HCE4 細胞において癌幹細胞を有意に抑制したが、RAS 変異体である T-TeRAS 細胞には無効であった（図 1）。この結果から FGF シグナルの下流において RAS/MEK/ERK 経路が CD24Low/CD44High 癌幹細胞の制御において重要であることが示唆された。MEK 阻害剤を用いることで T-TeRAS 細胞においても CD24Low/CD44High 癌幹細胞は有意に抑制された（図 2）。逆に、EGF 経路の下流である AKT 経路を阻害しても、何れの細胞株においても CD24Low/CD44High 癌幹細胞は抑制されなかった。

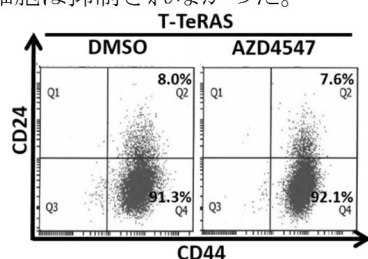


図 1 FGFR 阻害剤は T-TeRAS 細胞に無効

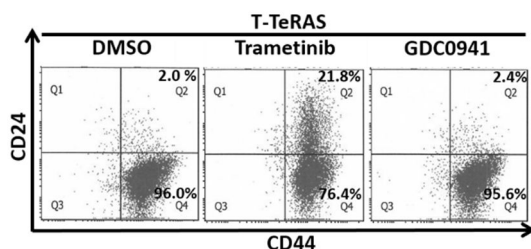


図 2 MEK 阻害剤は T-TeRAS 細胞に有効

これらの結果から CD24Low/CD44High 癌幹細胞は FGFR/RAS/MEK/ERK 経路により制御されていることが明らかになった。

##### (3) In vivo における FGFR 阻害剤及び MEK 阻害剤の効果の検討

ヌードマウスを用いた腫瘍移植実験においても FGFR 阻害剤 (AZD4547) は FGFR のリン酸化、MEK 阻害剤 (trametinib) は ERK のリン酸化を十分に抑制していた。AZD4547 は TE8 細胞の腫瘍増殖を抑制したが、RAS に変異のある T-TeRAS 細胞には無効であった。一方で、MEK 阻害剤である trametinib は TE8 細胞および T-TeRAS 細胞何れの腫瘍増殖も有意に抑制した（図 3）。重要なことに、trametinib により腫瘍細胞の上皮系マーカーである E-cadherin の発現が増強し、間葉系マーカーである vimentin の発現は抑制されていた。

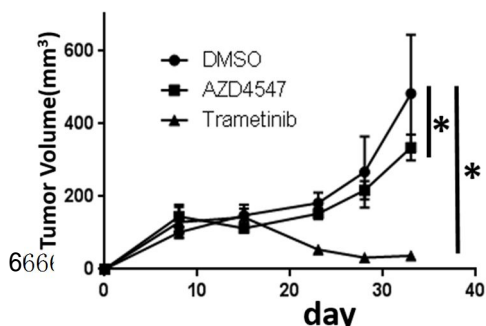


図 3 FGFR 阻害剤、MEK 阻害剤による腫瘍抑制効果 (T-TeRAS 細胞)

In vitro での結果と同様に、動物実験においても CD24Low/CD44High 癌幹細胞は抑制され、MET (mesenchymal-epithelial transition) が生じることで腫瘍増殖が抑制された。さらに、抗癌剤、放射線に対する感受性も回復した。動物実験においても FGFR/RAS/MEK/ERK 経路が

CD24<sup>Low</sup>/CD44<sup>High</sup> 癌幹細胞の制御に重要であることが示され、同経路を阻害することで癌幹細胞を抑制し、既存の抗癌剤、放射線治療に対する感受性を回復する新規治療法となる可能性が示唆された。

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 Maehara Osamu, Ohnishi Shunsuke, Asano Ayaka, Suda Goki, Natsuzaka Mitsuteru, Nakagawa Koji, Kobayashi Masanobu, Sakamoto Naoya, Takeda Hiroshi	4. 巻 21
2. 論文標題 Metformin Regulates the Expression of CD133 Through the AMPK-CEBP Pathway in Hepatocellular Carcinoma Cell Lines	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neoplasia	6. 最初と最後の頁 545 ~ 556
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neo.2019.03.007	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 Kawagishi Naoki, Suda Goki, Kimura Megumi, Maehara Osamu, Shimazaki Tomoe, Yamada Ren, Kitagataya Takashi, Shigesawa Taku, Suzuki Kazuharu, Nakamura Akihisa, Ohara Masatsugu, Umemura Machiko, Nakai Masato, Sho Takuya, Natsuzaka Mitsuteru, Morikawa Kenichi, Ogawa Koji, Kudo Yusuke, Nishida Mutsumi, Sakamoto Naoya	4. 巻 50
2. 論文標題 High serum angiopoietin 2 level predicts non regression of liver stiffness measurement based liver fibrosis stage after direct acting antiviral therapy for hepatitis C	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 671 ~ 678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13490	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前原経、夏井坂光輝、武田宏司
2. 発表標題 FGFR阻害剤およびMEK阻害剤は食道扁平上皮癌(ESCC)がん幹細胞を減少させる
3. 学会等名 第16回日本消化管学会総会学術集会
4. 発表年 2020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
---------	---------