

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15491

研究課題名(和文) 癌幹細胞可視化メカニズムに基づく生体内ニッチ解析と特異的治療開発

研究課題名(英文) Analysis of in vivo niches and therapeutic targets for cancer stem cells based on the visualization mechanism

研究代表者

田中 真二 (Tanaka, Shinji)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：30253420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：膵腫瘍から幹細胞分画を抽出し、その特異的高発現分子としてCD73を同定した。CD73阻害剤APCPは癌幹細胞の自己複製能、浸潤能、造腫瘍性を有意に抑制した。膵腫瘍の臨床検体ではCD73高発現は腫瘍浸潤と有意な相関を認めた。

さらにヒト膵腫瘍細胞の幹細胞性・造腫瘍性は、癌抑制遺伝子Xの欠失により獲得されることをゲノム編集法で明らかにした。癌抑制遺伝子Xが制御する遺伝子Yを同定し、臨床検体ではX低発現かつY高発現症例で有意に高い再発率を認めた。

CD73には免疫チェックポイント阻害分子PD-1を発現誘導する機能が報告されている。CD73およびYに対する標的治療の有効性を示唆する画期的な成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Identification and purification of cancer stem cells (CSCs) lead to the discovery of novel therapeutic molecules of pancreatic neuroendocrine tumor (pNET). In this study, we identified CD73 overexpressed in pNET CSCs. The CD73-inhibitor APCP significantly attenuated in vitro sphere formation and cell motility, as well as in vivo tumorigenicity of pNET CSCs. Immunohistochemical analysis of clinical samples demonstrated CD73 expression was significantly correlated with the tumor invasion. In addition, our genome editing studies revealed that pNET can acquire CSC potentials with tumorigenicity by knockout of tumor suppressor gene X. We identified "Y" as one of the direct targets of tumor suppressor X. In clinical samples, significantly frequent recurrence was recognized in pNETs with low X and high Y expression.

Recently, CD73 was reported as a potential inducer of PD-1 immune checkpoint factor. As a result of our studies, CD73 and Y might be promising therapeutic targets for pNET.

研究分野：分子腫瘍医学、消化器外科学

キーワード：癌 幹細胞 膵腫瘍 免疫チェックポイント ゲノム編集 分子標的剤 トランスレーショナルリサーチ 癌抑制遺伝子

1. 研究開始当初の背景

膵癌、肝癌、胆道癌、スキルス胃癌、食道癌などの難治性消化器癌は、切除不能例は勿論切除可能な症例でも予後不良であり、新たな治療戦略の開発は喫緊の課題である。癌難治性の原因の1つは、その多様性 (heterogeneity)にある。正常組織の多様性は自己複製能と多分化能 (非対称性分裂) を持つ幹細胞が担っているが、近年、癌にも幹細胞性を示す細胞群が内在し、癌の多様性と難治性の根源となることが報告されている。現在、様々な幹細胞マーカーを用いて、癌幹細胞を単離する試みがなされ、新しい治療法の実現が強く期待されている。申請者は難治性消化器癌の臨床解析から、幹細胞性を可視化するシステムを構築した[基盤研究(A)平成22-24年度(研究代表者)、新学術領域研究(研究領域提案型)平成22-26年度(研究代表者)]。本研究ではこれらの成果に基づき、癌幹細胞と宿主の相互作用・ニッチ環境を解析して、特異的治療開発を推進する。

2. 研究の目的

本研究は幹細胞システムによる難治性癌の生体内微小環境の分子の基盤解析と、臨床応用を目指した特異的治療開発の二点を特徴とする。激しい国際競争の中、本邦における独創的な研究戦略としてのインパクトは高く、難治性消化器癌を克服する臨床開発へと直結する研究課題である。

本研究は、幹細胞システムによる難治性癌の生体内ニッチ制御分子の基礎解析と、その臨床応用を目指した特異的治療開発という二つの視点を特徴とする。

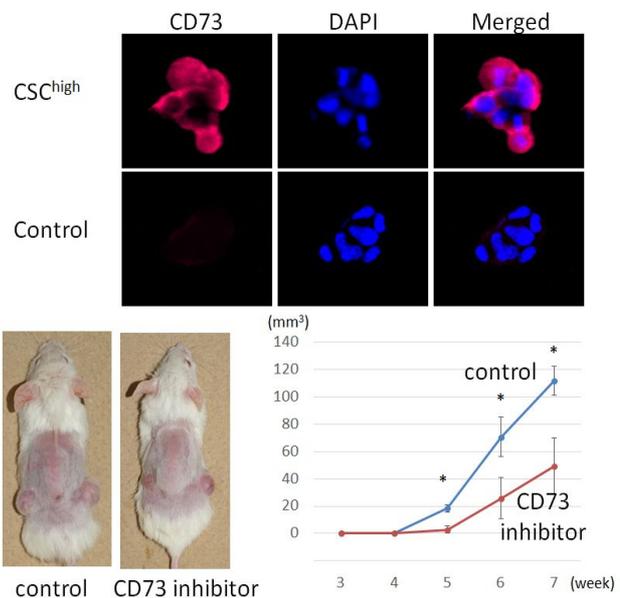
3. 研究の方法

膵腫瘍の臨床検体および培養細胞を用いて2つの幹細胞システムを基盤として難治性規定分子群を同定し、生体内ニッチ制御メカニズムおよび治療標的分子を解明する。

4. 研究成果

膵腫瘍臨床検体およびヒト膵腫瘍細胞を解析した結果、約1%の癌幹細胞分画を検出した。ヒト膵腫瘍細胞から癌幹細胞分画を抽出して、高い自己複製能と浸潤能を持つことを確認した。マウス生体内では顕著な造腫瘍性および転移能を示し、その特異的高発現分子として細胞外アデノシン産生酵素 CD73 を同定した。CD73 は制御性T細胞に高発現していることが知られており、アデノシンレセプター $A_{2A}AR$ を介して宿主免疫を抑制し生体内ニッチを制御するメカニズムが示唆された。また CD73 阻害剤 adenosine 5'-(γ -methylene) diphosphate (APCP) は癌幹細胞の自己複製能、浸潤能を強力に阻害すること、APCP を投与したマウスモデルでは癌幹細胞の造腫瘍性が抑制されることを証明した。膵腫瘍の臨床検体を解析した結果、CD73 高発現を確認し、周囲組織への腫瘍浸潤と有意な相関を認めることを明らかにしており、新たな治療標的として有望であることが示唆された(Katsuta, Tanaka et al. *Int J Oncol* 2016)。

CD73 は免疫チェックポイント分子 PD-1 を発現亢進させる機能が報告されており、現在幹細胞性トランスジェニックマウスを用いて免疫システムにおける新たな解析を展開している。



膵腫瘍特異的な癌抑制遺伝子 X がコードする蛋白は特異的ヒストン・シャペロン分子であり、ヒストン H3 と複合体を形成して Lys9 メチル化を促すことが知られているが (H3K9me3)、幹細胞性制御における意義は不明である。本研究ではゲノム編集法 (CRISPR/Cas9 システム) によって、癌抑制遺伝子 X をノックアウト (KO) したヒト膵腫瘍細胞を新たに作成して解析した。X-KO ヒト膵腫瘍細胞はスフェア形成能など幹細胞性を獲得し、NOD-SCID マウスにおいて高い造腫瘍性を呈することが明らかになった。

H3K9me3 経路は遺伝子発現を抑制することが知られている。マイクロアレイ解析によって遺伝子発現抑制群を抽出し、X 蛋白に対する免疫沈降法 (chromatin immunoprecipitation; ChIP) を用いて直接転写制御される 13 標的遺伝子を同定した。さらに H3K9me3 に対する ChIP 解析によって 5 遺伝子を抽出し、siRNA 解析によって X-KO 膵腫瘍細胞のスフェア形成能を制御する 1 遺伝子を同定した。この遺伝子 Y は間葉性幹細胞や癌細胞で高発現すること、酸化ストレスや抗癌剤への抵抗性を促進することが報告されている。マウス膵腫瘍細胞でも X-KD による Y 発現亢進を確認した。膵腫瘍臨床検体を用いた解析では、X 蛋白低発現症例は有意に Ki67 指数が高く、その 33% に遺伝子変異を検出した。さらに X 低発現かつ Y 高発現症例では有意に再発率が高いことが証明された ($p=0.018$)。

本研究によって、癌抑制遺伝子 X がエピゲノム修飾により幹細胞性遺伝子 Y を直接制御する新規癌化メカニズムが明らかとなり、臨床診断に有用なバイオマーカーとなる可能性が示唆された。幹細胞性遺伝子 Y は腫瘍特異的に発現しており、治療標的としても臨床応用への展開が期待できる画期的な成果が得られた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件) 全て査読有り

1. Oba A, Shimada S, Akiyama Y, Nishikawaji T, Mogushi K, Ito H, Matsumura S, Aihara A, Mitsunori Y, Ban D, Ochiai T, Kudo A, Asahara H, Kaida A, Miura M, Tanabe M, Tanaka S. ARID2 modulates DNA damage response in human hepatocellular carcinoma cells. *Journal of Hepatology*, in press doi: 10.1016/j.jhep.2016.12.026
2. Ohata Y, Akiyama Y, Shimada S, Mogushi K, Nakao K, Matsumura S, Aihara A, Mitsunori Y, Ban D, Ochiai T, Kudo A, Tanabe M, Tanaka S. Acquired resistance with epigenetic alterations under long-term anti-angiogenic therapy for hepatocellular carcinoma. *Molecular Cancer Therapeutics*, in press doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0728.
3. Munakata K, Uemura M, Tanaka S, Kawai K, Kitahara T, Miyo M, Kano Y, Nishikawa S, Fukusumi T, Takahashi Y, Hata T, Nishimura J, Takemasa I, Mizushima T, Ikenaga M, Kato T, Murata K, Carethers JM, Yamamoto H, Doki Y, Mori M. Cancer stem-like properties in colorectal cancer cells with low proteasome activity. *Clinical Cancer Research*, 2016;22:5277-86. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1945
4. Katsuta E, Tanaka S, Mogushi K, Shimada S, Akiyama Y, Aihara A, Matsumura S, Mitsunori Y, Ban D, Ochiai T, Kudo A, Fukamachi H, Tanaka H, Nakayama K, Arii S, Tanabe M. CD73 as a therapeutic target for pancreatic neuroendocrine tumor stem cells. *International Journal of Oncology*, 2016; 48:657-69. doi: 10.3892/ijo.2015.3299.
5. Akahoshi K, Tanaka S, Mogushi K, Shimada S, Matsumura S, Akiyama Y, Aihara A, Mitsunori Y, Ban D, Ochiai T, Kudo A, Arii S, Tanabe M. Expression of connective tissue growth factor in the livers of non-viral hepatocellular carcinoma patients with metabolic risk factors. *Journal of Gastroenterology*, 2016; 51:910-22. doi: 10.1007/s00535-015-1159-8.
6. Watanabe Y, Honda S, Konishi A, Satoko Arakawa S, Murohashi M, Yamaguchi H, Torii S, Tanabe M, Tanaka S, Warabi E, Shimizu S. Autophagy controls centrosome number by degrading Cep63. *Nature Communications*, 2016; 7:13508. doi: 10.1038/ncomms13508.

7. Furuyama T, Tanaka S, Shimada S, Akiyama Y, Matsumura S, Mitsunori Y, Aihara A, Ban D, Ochiai T, Kudo A, Fukamachi H, Arie S, Kawaguchi Y, Tanabe M. Proteasome activity is required for the initiation of precancerous pancreatic lesions. *Scientific Reports*, 2016 ;6:27044. doi: 10.1038/srep27044.

8. Ito H, Tanaka S, Akiyama Y, Shimada S, Adikrisna R, Matsumura S, Aihara A, Mitsunori Y, Ban D, Ochiai T, Kudo A, Arie S, Yamaoka S, Tanabe M. Dominant expression of DCLK1 in human pancreatic cancer stem cells accelerates tumor invasion and metastasis. *PlosOne*, 2016 ;11:e0146564. doi: 10.1371/journal.pone.0146564.

9. Tanaka S. Molecular pathogenesis and targeted therapy of pancreatic cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 2016 ;23: 197-205. doi: 10.1245/s10434-015-4463-x.

10. Nakao K, Tanaka S, Miura T, Sato K, Matsumura S, Aihara A, Mitsunori Y, Ban D, Ochiai T, Kudo A, Arie S, Tanabe M. A novel Aurora/VEGFR dual kinase inhibitor as treatment for hepatocellular carcinoma. *Cancer Science*, 2015;106(8):1016-22. doi: 10.1111/cas.12701.

11. Matsunaga H, Tanaka S, Aihara A, Ogawa K, Matsumura S, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Arie S, Tanabe M. A novel therapeutic combination targeting sequentially Aurora B and Bcl-xL in hepatocellular carcinoma. *Annals of Surgical Oncology*, 2015;22(9):3079-86. doi: 10.1245/s10434-014-4292-3.

12. Tanaka S. Cancer stem cells as therapeutic targets of hepato-biliary-pancreatic cancers. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*, 2015;22(7):531-7. doi: 10.1002/jhbp.248.

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 田中真二、大島慶映、田邊稔 .ワークショップ: 肝癌分子標的薬の生体内感受性バイオマーカー探索と臨床展開 . 第14回日本消化器外科学会大会、2016年11月4日、神戸ポートピアホテル (兵庫県、神戸市)

2. 田中真二 . シンポジウム: 外科腫瘍学を基盤とした難治性癌の新規分子標的の同定 . 第75回日本癌学会総会、2016年10月9日、名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

3. 田中真二、藍原有弘、田邊稔 . シンポジウム: Molecular pathogenesis and targeted therapy for major vascular invasiveness of hepatocellular carcinoma. 第14回日本消化器外科学会大会、2016年10月8日、グランドプリンスホテル新高輪 (東京都・港区)

4. 田中真二、島田周、秋山好光 . 癌幹細胞のエピ. ジェネティック変化と転移性および治療抵抗性獲得機序 . 第75回日本癌学会総会、2016年10月6日、パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市)

5. 田中真二、伊藤浩光、古山貴基、藍原有弘、松村聡、光法雄介、伴大輔、落合高德、工藤篤、田邊稔 . シンポジウム: 肝胆臓がん個別化分類に基づいた癌幹細胞の治療抵抗性機序の解明と治療展開 . 第72回日本消化器外科学会総会、2016年7月15日、あわぎんホール (徳島県、徳島市)

6. 田中真二 . 基調講演パネルディスカッション: がん分子サブタイプと臨床情報に基づく個別化治療戦略 . 第52回日本肝癌研究会、2016年7月1日、虎ノ門ヒルズフォーラム (東京都・港区)

7. 田中真二 . 指定演者シンポジウム・基礎研究から臨床応用への展望 . 第14回日本肝がん分子標的治療研究会、2016年6月11日、梅田スカイビルタワー (大阪府・大阪市)

8. 田中真二、佐藤公太、田邊稔 . シンポジウム: 肝がん個別化分類に基づいた生体内バイオマーカーの同定による新規分子標的治療の開発と臨床展開 . 第52回日本肝臓学会総会、2016年5月19日、ホテルニューオータニ幕張 (千葉県、幕張市)

9. 田中真二、藍原有弘、田邊稔 . シンポジウム: 肝癌の幹細胞性解析とゲノム編集技術を用いた治療応用 . 第102回日本消化器病学会総会、2016年4月23日、京王プラザホテル (東京都、新宿区)

10. 田中真二、島田周、古山貴基、大庭篤志、茂柳薫、秋山好光、水野裕貴、小川康介、深町博史、伊藤浩光、光法雄介、松村聡、藍原有弘、伴大輔、落合高德、工藤篤、川口義弥、田邊稔 . シンポジウム: 臨床検体のゲノム解析に基づいた遺伝子改変およびゲノム編集技術の臨床応用 . 第116回日本外科学会定期学術集会、2016年4月16日、リーガロイヤルホテル大阪 (大阪府、大阪市)

11. 田中真二、島田周、伊藤浩光、古山隆貴、藍原有弘、松村聡、伴大輔、落合高德、工藤篤、田邊稔 . シンポジウム: 難治性消化器癌

の幹細胞性解析を基盤とした標的治療の前臨床試験 . 第 71 回日本消化器外科学会総会、2015 年 7 月 15 日、アクトシティ浜松 (静岡県・浜松市)

12. 田中真二、古山隆貴、田邊稔 . シンポジウム : 幹細胞特性の機能的解析に基づいた肝癌標的治療の前臨床試験 . 第 51 回日本肝臓学会総会、2015 年 5 月 21 日、ホテル日航熊本 (熊本県・熊本市)

13. 田中真二、伊藤浩光、茂櫛薫、小川康介、藍原有弘、松村聡、伴大輔、落合高德、入江工、工藤篤、田中博、有井滋樹、田邊稔 . パネルディスカッション : 高度脈管侵襲肝細胞癌に対する術後補助療法の意義と分子生物学的解析 . 第 115 回日本外科学会定期学術集会、2015 年 4 月 17 日、名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

〔図書〕(計 2 件)

1. Tanaka S. Molecular analysis for therapeutic targets of pancreatic cancer. in *Molecular diagnosis and targeting for thoracic and gastrointestinal malignancy*, eds. Shimada Y, Yanaga K. (Springer) in press.

2. Tanaka S. Cancer stem cells as therapeutic targets. in *Human Stem Cell Toxicity* (ed. Sherley JL) **Royal Society of Chemistry** (London), 299 (280-294), 2016.
doi:10.1039/9781782626787-00280

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/grad/monc/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田中 真二 (TANAKA, Shinji)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号 : 30253420

(2)研究分担者

中山 恒 (NAKAYAMA, Ko)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号 : 10451923

(3)藍原 有弘 (AIHARA, Arihiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号 : 90451939