

令和元年5月16日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06257

研究課題名(和文) 癌幹細胞性維持に關する腫瘍間質由来ニッチ因子の同定と新規治療戦略の確立

研究課題名(英文) Identification of the novel niche factor implicated in cancer stem cell maintenance in tumor stroma.

研究代表者

石本 崇胤 (ISHIMOTO, Takatsugu)

熊本大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：00594889

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,500,000円

研究成果の概要(和文)：癌の再発・転移に深くかかわる癌幹細胞は腫瘍微小環境のニッチ因子を介して癌幹細胞性を維持していると考えられていたが、癌幹細胞ニッチの全貌は明らかになっていなかった。本研究では、癌進展に深く関わるCancer associated fibroblasts(CAFs)を介した、胃癌の新しい浸潤・転移機構を明らかにした。さらに、胃癌CAFsの網羅的遺伝子発現解析の結果、胃癌浸潤を促進するCAFs特異的遺伝子としてロンボイドファミリーメンバーのRHBDF2を同定し、その機能を解明した。今後、RHBDF2に対する阻害剤を用いた胃癌浸潤・転移抑制に向けた研究の展開が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで癌細胞の性質に依ると考えられていた浸潤・転移が、腫瘍微小環境に存在する線維芽細胞(CAFs)の働きによって引き起こされることを明らかにした。さらにはCAFsを用いた網羅的な遺伝子発現解析によって、胃がん細胞とCAFsの相互作用を介した浸潤・転移機構に重要な新規遺伝子(RHBDF2)を見出し、胃癌浸潤の新たな分子メカニズムの解明に繋がった。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cell (CSC) have been implicated in chemo-resistance and tumor relapse, and the stem cell-like properties are regulated by CSC niche. However, the CSC niche in solid tumor is totally unknown. In the current study, we identified RHBDF2 as a gene overexpressed in cancer associated fibroblasts (CAF), and showed that this molecule enhances gastric cancer (GC) cell invasion through oncogenic and non-canonical TGF β 1 signaling. Further analysis using specific inhibitor of RHBDF2 may lead to the inhibition of GC invasion and metastasis.

研究分野：腫瘍生物学、消化器外科学

キーワード：胃癌 癌関連線維芽細胞 腫瘍間質 慢性炎症 癌幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌の再発・転移に深くかかわる癌幹細胞は、腫瘍微小環境のニッチ因子を介して癌幹細胞性を維持していると考えられていたが、癌幹細胞ニッチの全貌は明らかになっていなかった。Cancer associated fibroblast (CAFs)は癌幹細胞ニッチとしての働きを有することが予測されていたが、具体的な機能的役割については不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は網羅的ゲノム解析に基づいて diffuse-type 胃癌の癌幹細胞性維持に関わる CAFs からの治療標的ニッチ因子を同定する事であった。癌進展に深く関わる CAFs からの、癌幹細胞性を制御する因子を同定し新たな分子標的を見出すことは、腫瘍間質を標的にした治療戦略を構築する礎になると考えられる。

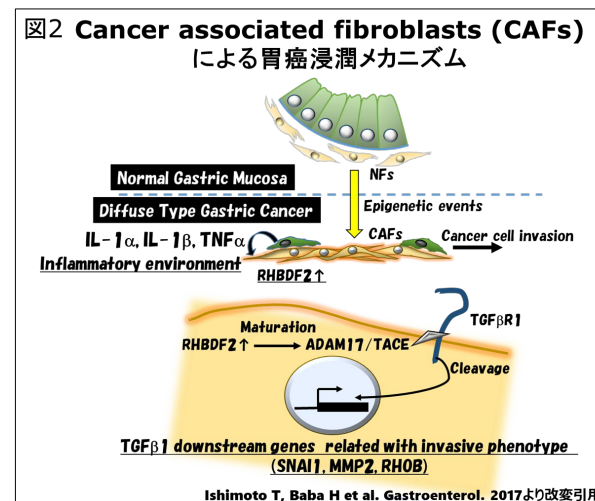
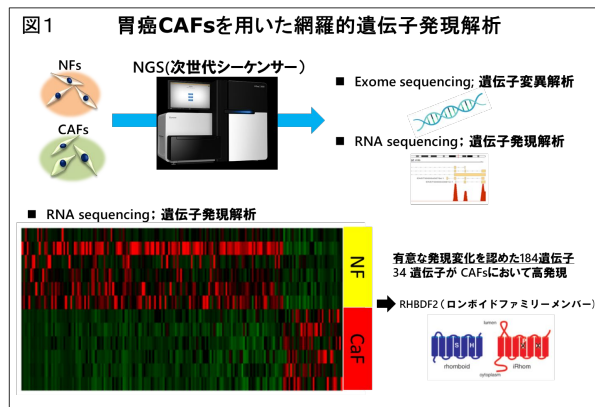
3. 研究の方法

Diffuse-type 胃癌切除検体から樹立した NFs/CAFs 細胞を用いて次世代シーケンサーによる網羅的ゲノム解析をおこなう。OMICS データの統合解析によりニッチ候補分子を選択し機能解析をおこなう。最終的に治療標的となり得るニッチ因子を同定し、阻害剤スクリーニングに向けた最適な評価系を確立する。以下に、研究計画を具体的なステップに分けて記載する。(1) Diffuse-type 胃癌 CAFs を用いた網羅的ゲノム解析、シーケンシングデータの高次解析、統合解析によるニッチ候補分子選択、胃癌切除検体を用いた候補分子の発現解析、予後解析およびニッチ候補分子の invitro、in vivo 機能解析 (2) CAFs 由来の細胞外小胞を用いた網羅的プロテオミクスを行い、タンパク質レベルで胃癌の癌幹細胞性に関わる分子を同定する。

4. 研究成果

(1) 次世代シーケンサーを用いて CAFs の網羅的な遺伝子発現解析を実施した。網羅的な解析結果をシンガポール大学にて確立された解析パイプラインを用いて統合解析し、胃癌の浸潤転移に関わる候補遺伝子の抽出を行なった。網羅的解析の結果、CAFs 特異的遺伝子としてロンボイドファミリーメンバーの RHBDF2 を見出した (図1)。gain of function、loss of function の細胞を構築し機能解析をおこなった。さらに免疫不全マウスへの xenograft モデルによる検証も並行しておこなうことで、生体内での腫瘍形成、浸潤・転移能についても合わせて評価した。胃癌組織における候補遺伝子の発現解析に加えてコホートデータを用いて、網羅的解析から得られた知見の臨床的意義について評価した。胃癌組織の間質中 CAFs に依存する新しい胃癌浸潤メカニズムを見出し研究成果を報告している (図2)。

(2) 更に、CAFs は様々な分泌タンパク質や細胞外小胞 (Extracellular vesicles: EVs) を産生することを見出し CAFs 由来因子によって引き起こされる胃癌特性の変化、とくに抗がん剤抵抗性などの癌幹細胞性に与える影響について検討を行った。具体的には CAFs が分泌する EVs の網羅的なプロテオミクスをおこなった結果、CAFs-EVs に特異的に含有される特異的タンパク質による胃癌細胞の顕著な抗癌剤抵抗性の新しい分子メカニズムを見出した。さらに免疫不全マウスへの胃癌細胞と CAFs の腹腔内移植による腹膜播種結節モデルにおいて CAFs との共移植により腫瘍・転移形成が促進されることを確認している。CAF 由来エクソソームが生体レベルで抗がん剤抵抗性を引き起こすのか今後、同マウスモデルを用いて in vivo での検討を行う予定である。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

1. Bu L, Baba H, Yoshida N, Miyake K, Yasuda T, Uchihara T, Tan P, Ishimoto. Biological heterogeneity and versatility of cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment. *Oncogene*. 2019 Feb 28. In press 査読あり、オープンアクセス無し 謝辞あり doi: 10.1038/s41388-019-0765-y
2. Izumi D, Gao F, Toden S, Sonohara F, Kanda M, Ishimoto T, Kodera Y, Wang X, Baba H, Goel A. A genomewide transcriptomic approach identifies a novel gene expression signature for the detection of lymph node metastasis in patients with early stage gastric cancer. *EBioMedicine*. 2019 Feb 13. In press 査読あり、オープンアクセス有り 謝辞無し doi: 10.1016/j.ebiom.2019.01.057
3. Tsukamoto M, Imai K, Ishimoto T, Komohara Y, Yamashita YI, Nakagawa S, Umezaki N, Yamao T, Kitano Y, Miyata T, Arima K, Okabe H, Baba Y, Chikamoto A, Ishiko T, Hirota M, Baba H. PD-L1 expression enhancement by infiltrating macrophage-derived tumor necrosis factor- leads to poor pancreatic cancer prognosis. *Cancer Sci*. 2019 Jan;110(1):310-320. 査読あり、オープンアクセス有り 謝辞無し doi: 10.1111/cas.13874
4. Arima K, Ohmuraya M, Miyake K, Koiwa M, Uchihara T, Izumi D, Gao F, Yonemura A, Bu L, Okabe H, Imai K, Hashimoto D, Baba Y, Chikamoto A, Yamashita YI, Furukawa T, Araki K, Baba H, Ishimoto T. Inhibition of 15-PGDH causes Kras-driven tumor expansion through prostaglandin E2-ALDH1 signaling in the pancreas. *Oncogene*. 2019 Feb;38(8):1211-1224. 査読あり、オープンアクセス無し 謝辞あり doi: 10.1038/s41388-018-0510-y
5. Yagi T, Baba Y, Ishimoto T, Iwatsuki M, Miyamoto Y, Yoshida N, Watanabe M, Baba H. PD-L1 Expression, Tumor-infiltrating Lymphocytes, and Clinical Outcome in Patients With Surgically Resected Esophageal Cancer. *Ann Surg*. 2019 Mar;269(3):471-478. 査読有 オープンアクセス無 謝辞記載無 doi: 10.1097/SLA.0000000000002616
6. Eto T, Miyake K, Nosho K, Ohmuraya M, Imamura Y, Arima K, Kanno S, Fu L, Kiyozumi Y, Izumi D, Sugihara H, Hiyoshi Y, Miyamoto Y, Sawayama H, Iwatsuki M, Baba Y, Yoshida N, Furukawa T, Araki K, Baba H, Ishimoto T. Impact of loss-of-function mutations at the RNF43 locus on colorectal cancer development and progression. *J Pathol*. 2018 Aug;245(4):445-455. 査読あり、オープンアクセス無し 謝辞あり doi: 10.1002/path.5098
7. Arima K, Komohara Y, Bu L, Tsukamoto M, Itoyama R, Miyake K, Uchihara T, Ogata Y, Nakagawa S, Okabe H, Imai K, Hashimoto D, Chikamoto A, Yamashita YI, Baba H, Ishimoto T. Downregulation of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase by interleukin-1 from activated macrophages leads to poor prognosis in pancreatic cancer. *Cancer Sci*. 2018 Feb;109(2):462-470. 査読有 オープンアクセス有 謝辞記載有 doi: 10.1111/cas.13467
8. Kitano Y, Baba Y, Nakagawa S, Miyake K, Iwatsuki M, Ishimoto T, Yamashita YI, Yoshida N, Watanabe M, Nakao M, Baba H. Nrf2 promotes oesophageal cancer cell proliferation via metabolic reprogramming and detoxification of reactive oxygen species. *J Pathol*. 2018 Mar;244(3):346-357 査読有 オープンアクセス無 謝辞記載無 doi: 10.1002/path.5021
9. Arima K, Yamashita YI, Hashimoto D, Nakagawa S, Umezaki N, Yamao T, Tsukamoto M, Kitano Y, Yamamura K, Miyata T, Okabe H, Ishimoto T, Imai K, Chikamoto A, Baba H. Clinical usefulness of postoperative C-reactive protein/albumin ratio in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am J Surg*. 2018 Jul;216(1):111-115 査読有 オープンアクセス無 謝辞記載無 doi: 10.1016/j.amjsurg.2017.08.016
10. Ishimoto T, Miyake K, Nandi T, Yashiro M, Onishi N, Huang KK, Lin SJ, Kalpana R, Tay ST, Suzuki Y, Cho BC, Kuroda D, Arima K, Izumi D, Iwatsuki M, Baba Y, Oki E, Watanabe M, Saya H, Hirakawa K, Baba H, Tan P. Activation of transforming growth factor beta 1 signaling in gastric cancer-associated fibroblasts increases their motility, via expression of rhomboid 5 homolog 2, and ability to induce invasiveness of gastric cancer cells. *Gastroenterology*. 2017 Jul;153(1):191-204. 査読有 オープンアクセス無 謝辞記載有 doi: 10.1053/j.gastro.2017.03.046
11. Izumi D, Ishimoto T, Miyake K, Eto T, Arima K, Kiyozumi Y, Uchihara T, Kurashige

J, Iwatsuki M, Baba Y, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Watanabe M, Goel A, Tan P, Baba H. Colorectal Cancer stem cells acquire chemoresistance through the upregulation of F-box/WD repeat-containing protein 7 and the consequent degradation of c-Myc. *Stem Cells*. 2017 Sep;35(9):2027-2036. 査読有 オープンアクセス無 謝辞記載有 doi: 10.1002/stem.2668

12. Mima K, Nakagawa S, Sawayama H, **Ishimoto T**, Imai K, Iwatsuki M, Hashimoto D, Baba Y, Yamashita YI, Yoshida N, Chikamoto A, Baba H. The microbiome and hepatobiliary-pancreatic cancers. *Cancer Lett*. 2017 Aug 28;402:9-15. 査読有 オープンアクセス無 謝辞記載無 doi: 10.1016/j.canlet.2017.05.001

〔学会発表〕(計 11 件)

1. **Ishimoto T**, Uchihara T, Iwatsuki M, Baba Y, Yoshida N, Baba H. Extracellular vesicles from cancer associated fibroblasts induce drug resistance via integrin 1/FAK signaling in gastric cancer cells International Gastric Cancer Congress 2019/05/11
2. **Ishimoto T**, Uchihara T, Miyake K, Yonemura A, Yasuda T, Itoyama R, Iwatsuki M, Baba Y, Yoshida N, Baba H. Extracellular vesicles from cancer associated fibroblasts induce drug resistance via integrin 1/FAK signaling in gastric cancer cells 11th AACR-JCA Joint Conference 2019/2/8
3. **石本崇胤**, 三宅慧輔, 伊東山瑠美, 内原智幸, 吉田直矢, 馬場秀夫 腫瘍間質に依存する diffuse-type 胃癌浸潤性増殖機構の解明 第 29 回日本消化器癌発生学会総会 2018/11/16
4. **Ishimoto T**, Arima K, Bu L, Uchihara T, Miyake K, Eto T, Itoyama R, Baba H. Expansion of pancreatic cancer stem-like cells through PGE2 accumulation in inflammatory environment AACR annual meeting 2018 2018/4/14
5. **石本崇胤**, 三宅慧輔, 八代正和, 内原智幸, 有馬浩太, 泉大輔, 岩槻政晃, 馬場祥史, 渡邊雅之, Patrick Tan, 馬場秀夫 腫瘍炎症環境において間質に依存する胃癌進展の分子メカニズム 第 118 回日本外科学会定期学術集会 2018/4/5
6. **Takatsugu Ishimoto**, Keisuke Miyake, Rumi Itoyama, Tomoyuki Uchihara, Kota Arima, Daisuke Izumi, Masaaki Iwatsuki, Yoshifumi Baba, Naoya Yoshida, Hideo Baba Molecular mechanism of gastric cancer progression by activated stroma in inflammatory environment 第 90 回日本胃癌学会総会 2018/3/7
7. **Ishimoto T**, Miyake K, Yashiro M, Eto T, Izumi D, Arima K, Baba Y, Watanabe M, Hirakawa K, Baba H. RHBDF2 in stromal fibroblasts mediates TGF- signaling and enhances gastric cancer cell invasion via intercellular crosstalk. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2017 Apr 4rd 2017. Washington
8. **Ishimoto T**, Miyake K, Yashiro M, Eto T, Arima K, Izumi D, Baba Y, Hirakawa K, Tan P, Baba H. Identification of a new molecule mediating gastric cancer invasion based on genomic analysis of cancer-associated fibroblasts. 12th International gastric cancer congress. Apr 21rd 2017. 北京
9. **石本 崇胤**, Patrick Tan, 馬場秀夫 腫瘍炎症環境における間質とのクロストークを介した diffuse-type 胃癌進展機構 JDDW 2017 福岡
10. **Ishimoto T**, Miyake K, Yashiro M, Eto T, Arima K, Izumi D, Baba Y, Hirakawa K, Tan P, Baba H. Identification of molecular mechanism underlying diffuse-type gastric cancer invasion depending on tumor stroma. The 76th Annual Meeting of the Japan Cancer Association. Sep 29th 2017. 横浜
11. **石本 崇胤**, Patrick Tan, 馬場秀夫 腫瘍間質に依存するびまん性胃癌浸潤分子メカニズムの同定 第 28 回日本消化器癌発生学会 2017 年 11 月 18 日 熊本

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：なし
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者
研究協力者氏名：なし
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。