

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15614

研究課題名(和文)大腸癌幹細胞を標的とした新規抗体療法の基礎的研究

研究課題名(英文)Basic study on novel antibody therapy targeting colon cancer stem cells

研究代表者

高橋 秀和 (Hidekazu, Takahashi)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10528508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：LC-MS/MS解析の結果、大腸癌幹細胞マーカーLgr5に共役する分子としてsyntenin-1を同定した。syntenin-1発現の臨床病理学的因子および予後との関連を検証し、機能解析を行った。5年全生存率は低発現群：高発現群=97.8%：63.8%( $p=0.001$ )、5年無再発生存率は低発現群：高発現群=92.4%：61.7% ( $p=0.001$ ) で、syntenin-1高発現群で有意に再発率が高く生存率が低かった。shSyntenin-1にてL-OHPに対する感受性は有意差に上昇した( $p<0.05$ )。

研究成果の概要(英文)：As a result of LC-MS / MS analysis, syntenin-1 was identified as a molecule conjugated to the colon cancer stem cell marker Lgr5. The relationship between clinicopathological factors and prognosis of syntenin-1 expression was examined and functional analysis was performed. Overall survival rate was low expression group: high expression group = 97.8%: 63.8% ( $p = 0.001$ ), 5 year low relapse survival rate was low expression group: high expression group = 92.4%: 61.7% ( $p = 0.001$ ). The rate of recurrence was significantly higher and the survival rate was lower in the high expression group of syntenin-1. Silencing Syntenin-1 increased the sensitivity to L-OHP with significant difference ( $p < 0.05$ ).

研究分野：下部消化管外科

キーワード：Lgr5 Syntenin-1 LC-MS/MS解析 予後マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

癌幹細胞仮説によると、癌組織全体が自己複製能と多分化能を有する癌の源となる細胞すなわち癌幹細胞よりなるとされる。すなわち、癌幹細胞が癌組織を形成する細胞学的階層構造の根元に存在し、癌細胞を供給するため、癌幹細胞を標的とした治療であれば、全体の中で、癌組織を構築するために必要不可欠である細胞集団を特異的に標的とすることにより、良好な効果/副作用比を持った治療が実現可能であると考えられる (Reya T, Nature 2001, Clarke MF, Cancer Res 2006)。さらには、現在臨床応用されている治療では限界のあった患者へ新しい治療を提供できる可能性がある。当科において大腸癌の切除検体を用いて癌部における Lgr5 の発現と予後の解析を行った。Lgr5 の発現は癌部において上昇し、高発現群はリンパ節転移、肝転移が多く、無再発生存率が低かった (Takahashi H. Ann Surg Oncol 2011)。この研究の過程で Lgr5 の mRNA の PCR を施行した結果、Lgr5 の全長よりも短いバンドが増幅され、Lgr5 のエクソン 5 が欠損した配列やエクソン 5-8 が欠損した配列 (スプライスバリエント) が確認された。全長型 Lgr5 が真の幹細胞特異的表面分子であるとの仮説をたて、スプライスバリエントで欠損するエクソン 5 の転写領域に特異的な抗体を作成し、免疫組織染色を行い、全長 Lgr5 陽性細胞が大腸粘膜幹細胞に一致することを確認している。また、癌においては全体の中の一部のみが陽性であることを確認している (癌組織の不均一性)。以上は、Lgr5 陽性細胞の中にも階層性があり、全長 Lgr5 陽性細胞が腸管粘膜ならびに癌の幹細胞である可能性を示唆した。

## 2. 研究の目的

本研究はこの当科で作成した抗ヒト全長型 Lgr5 抗体を用いて分取し、解析することで全長型 LGR5 の腸管上皮幹細胞ならびに癌組織における stemness に関する重要なメカニズ

ムを得ることを目的とした。さらに正常と癌との間で異なるメカニズムを解明し、より癌幹細胞に特異的な治療が開発されることが期待される。次の段階として、抗体をモノクローナル化し、抗腫瘍効果の検討を行う。より効率的に癌腫の縮小効果を得るために、抗腫瘍薬をコンジュゲートし、動物実験にてその効果と安全性を確認することとした。

## 3. 研究の方法

消化器手術症例から摘出した正常腸管ならびに癌組織用いて、抗全長型 Lgr5 抗体を用いて細胞分取を行い、全長型 Lgr5 と splicing variant の発現を mRNA を用いた qPCR で比確認する。分取された細胞集団を用いてマトリゲルを用いた培養系ならびに免疫不全動物への移植実験を行うことにより各細胞集団の維持と増殖の系を確立する。さらにシグナル解析、代謝産物解析を行い、幹細胞性の維持に必要なシグナル及び代謝産物を同定することにより、癌幹細胞を標的とした治療対象分子を絞り込む。

なお、培養系ならびに移植系が確立されない場合は、細胞実験中心のプロジェクトに移行し、ショットガン解析などを用いた全長型 Lgr5 に対する共役分子を同定することにより、癌幹細胞を標的とした治療対象分子を絞り込む予定とした。

## 4. 研究成果

切除標本からの培養系の確立に難渋しているため、細胞実験中心のプロジェクトに移行した。HEK293細胞を用いてLgr5の安定高発現株を作成した。この細胞の膜蛋白を分取しタグに対する抗体を用いて免疫沈降を行なった。得られたサンプルをLC-MS/MS解析に供した結果、Lgr5に共役する分子としてsyntenin-1を同定した。syntenin-1の高発現が複数のがんにおいて予後不良因子となることが報告されているが、大腸癌においてははまだ報告はない。以下大腸癌におけるsyntenin-1発現の臨床病

理学的因子および予後との関連を検証し、その機能解析を行った。(1)2006年から2009年までに当科で根治手術を施行した連続する139例の大腸癌症例を対象とし、切除標本におけるsyntenin-1の発現を免疫組織染色により2群に分類し、臨床病理学的因子および予後との関連性を調べた。(2)3種類のmicrosatellite stable (MSS) 大腸癌細胞株に、syntenin-1に対するshRNAを導入し増殖能・遊走能・抗癌剤感受性アッセイを行った。(1)臨床病理学的因子での比較においては高発現群で分化度 ( $p=0.001$ ) の他に有意な因子を認めなかった。5年全生存率 (overall survival: OS) は低発現群: 高発現群 = 97.8% : 63.8% ( $p=0.001$ )、5年無再発生存率 (relapse free survival: RFS) は低発現群: 高発現群 = 92.4% : 61.7% ( $p=0.001$ ) で、syntenin-1高発現群で有意に再発率が高く生存率が低かった。多変量解析ではOSにおいてはCA19-9値と並んで ( $p<0.0001$ )、RFSにおいては脈管侵襲と並んで ( $p<0.0001$ ) 予後予測因子であった。(2)shRNAでsyntenin-1を抑制すると、増殖能に有意差は認めなかったが、遊走能は有意に低下した ( $p<0.05$ )。また、5-FUに対する感受性は有意差を認めなかったが、L-OHPに対する感受性は有意差に上昇した ( $p<0.05$ )。大腸癌においてsyntenin-1の高発現はOS・RFSの悪化に関与し、予後予測に有用なマーカーとなりうることを示唆された。また、syntenin-1は遊走能と進行再発大腸癌治療におけるkey drugであるL-OHPに対する薬剤感受性に関与していた。

#### 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 6件)

1: Tamai K, Mizushima T, Wu X, Inoue A, Ota M, Yokoyama Y, Miyoshi N, Haraguchi N, Takahashi H, Nishimura J, Hata T, Matsuda C, Doki Y, Mori M, Yamamoto H.

Photodynamic Therapy Using Indocyanine Green Loaded on Super Carbonate Apatite as Minimally Invasive Cancer Treatment. *Mol Cancer Ther.* 2018 Apr 13. pii: molcanther.0788.2017. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0788. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29654066.

2: Inoue A, Mizushima T, Wu X, Okuzaki D, Kambara N, Ishikawa S, Wang J, Qian Y, Hirose H, Yokoyama Y, Ikeshima R, Hiraki M, Miyoshi N, Takahashi H, Haraguchi N, Hata T, Matsuda C, Doki Y, Mori M, Yamamoto H. A miR-29b Byproduct Sequence Exhibits Potent Tumor-Suppressive Activities via Inhibition of NF- $\kappa$ B Signaling in KRAS-Mutant Colon Cancer Cells. *Mol Cancer Ther.* 2018 May;17(5):977-987. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0850. Epub 2018 Mar 15. PubMed PMID: 29545333.

3: Takahashi H (Corresponding Author), Haraguchi N, Nishimura J, Hata T, Matsuda C, Yamamoto H, Mizushima T, Mori M, Doki Y, Nakajima K. A novel suction/coagulation integrated probe for achieving better hemostasis: development and clinical use. *Surg Today.* 2018 Jun;48(6):649-655. doi: 10.1007/s00595-018-1635-x. Epub 2018 Feb 17. PubMed PMID: 29453623.

4: Nomura M, Takahashi H (Corresponding Author), Haraguchi N, Nishimura J, Hata T, Matsuda C, Yamamoto H, Mizushima T, Doki Y, Mori M. [A Case of Rectal Cancer with Multiple Pulmonary and Liver Metastases Could Be Resected through Chemotherapy]. *Gan To Kagaku Ryoho.* 2018 Jan;45(1):169-171. Japanese. PubMed PMID: 29362344.

5: **Takahashi H** (Corresponding Author), Haraguchi N, Nishimura J, Hata T, Yamamoto H, Matsuda C, Mizushima T, Doki Y, Mori M. The Severity of Anastomotic Leakage May Negatively Impact the Long-term Prognosis of Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* 2018 Jan;38(1):533-539. PubMed PMID: 29277820.

6: Nomura M, **Takahashi H** (Corresponding Author), Haraguchi N, Nishimura J, Hata T, Matsuda C, Ikenaga M, Yamamoto H, Murata K, Doki Y, Mori M, Mizushima T. The potential usefulness of the Response Index in positron emission tomography assessing the therapeutic effect of pre-operative chemotherapy for advanced colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2017 Dec;80(6):1219-1226. doi: 10.1007/s00280-017-3442-2. Epub 2017 Oct 26. PubMed PMID: 29075856.

〔学会発表〕(計 5件)

1. **高橋秀和**、大澤日出樹、西村潤一、原口直紹、畑泰司、山本浩文、松田宙、水島恒和、土岐祐一郎、森正樹 大腸癌における完全長 LGR5 陽性細胞の意義についての研究第 55 回日本癌治療学会学術集会 2017 年
2. 牧野俊一郎、**高橋秀和**、原口直紹、西村潤一、畑泰司、松田宙、水島恒和、山本浩文、土岐祐一郎、森正樹 KRAS 遺伝子変異大腸がんにおけるがん幹細胞マーカー-DCLK1 の発現の意義 第 117 回日本外科学会定期学術集会 2017 年
3. 岩本和哉、**高橋秀和**、原口直紹、西村潤一、畑泰司、松田宙、水島恒和、山本浩文、土岐祐一郎、森正樹 大腸癌における syntenin-1 の機能・発現解析 第 72 回日本消化器外科学会総会 2017 年
4. 岩本和哉、**高橋秀和**、原口直紹、西村潤

- 一、畑泰司、松田宙、水島恒和、山本浩文、土岐祐一郎、森正樹 大腸癌における syntenin-1 の機能・発現解析 第 55 回日本癌治療学会学術集会 2017 年
5. 岩本和哉、**高橋秀和**、原口直紹、西村潤一、畑泰司、松田宙、水島恒和、山本浩文、土岐祐一郎、森正樹 大腸癌における syntenin-1 発現の臨床病理学的意義についての検討 第 117 回日本外科学会定期学術集会 2017 年

〔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

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
高橋 秀和 (TAKAHASHI HIDEKAZU)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：10528508

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )