

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15620

研究課題名(和文) 難治性がんにおけるSelf-niche仮説の提唱と革新的治療の開発

研究課題名(英文) Development of the the innovative treatment and the proposal of the Self-niche hypothesis in refractory cancer

研究代表者

前原 喜彦 (MAEHARA, Yoshihiko)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：80165662

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)：PLR123細胞にイリノテカンを添加すると、生き残った細胞は特徴的なクラスターを形成すると共に、セルソーターではSP分画の割合が増加し、より未分化な集団が濃縮されていることが示唆された。SPとnon-SP分画に分離された細胞について、mRNAの発現を比較したところ、特に、SP分画においてABCトランスporterやサイトケラチン等の発現上昇が見られた。また、免疫染色により、イリノテカン処理によって形成されたクラスターの一部の細胞で同タンパク質の発現上昇が確認された。今後は、これらの分子の発現とがん幹細胞性の維持との関係を明らかにし、それらを標的とした新たな治療戦略の開発を進めていきたい。

研究成果の概要(英文)：To find and investigate stem cell niche for the maintenance of stem cells, colon cancer cell line PLR123 was treated with irinotecan and the remnant cells were sorted into SP and non-SP fractions, and analyze expression levels of mRNA and protein. In cell sorter, SP fraction increased after treatment with irinotecan. ABC transporter and cytokeratin RNAs were upregulated in cancer cells of SP fraction in the microarray. We confirmed the CK20 and BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) expression with immunohistochemistry in the cell block of PLR123 irinotecan treated cell. We will elucidated the existence of niche-like cells and identify the key molecule which needed to form the niche.

研究分野：消化器外科

キーワード：cancer stem cell niche irinotecan がん幹細胞

1. 研究開始当初の背景

根治的外科手術、化学療法、放射線治療などのがん治療を行ったにもかかわらず、再発・転移が起こる原因の一つとして、**がん幹細胞の存在が想定されている**。近年、**がん幹細胞と非がん幹細胞間の可塑性**が示唆されており、完治には、がん幹細胞だけでなく、分化細胞への対応の必要性も提唱されている。本研究では、細胞株として樹立された、**大腸がん幹細胞 PLR123** (Stem Cells. 2012, 30(12):2631-44)を用いている。PLR123 にイリノテカンを添加した状態で1-2週間培養すると、ほとんどの細胞は死んでいくが、生存細胞は次第に寄せ集まり、薬剤耐性の腫瘍細胞クラスターを形成する。

がん幹細胞の維持には微小環境(ニッチ)が重要であることや、クラスターの特徴的な構造から、クラスター内のがん幹細胞は何らかのニッチ様細胞にサポートされて、生存している可能性が考えられた。また、最近、気道上皮の**幹細胞自信がニッチとして働き**、娘細胞を維持するという報告があった(Nature. 2015; 523(7562): 597-601)。そこで、本研究は、一部の細胞が**自らニッチへと変化する**、**Self-niche 仮説を提唱する**と共に、その存在を検証することを目的とする。

2. 研究の目的

抗がん剤耐性や癌の転移・再発の原因となるがん幹細胞の維持には、その微小環境(ニッチ)が重要である。これまでの研究から、抗がん剤耐性メカニズムの一つとして、新たに“Self-niche”仮説を提唱するに至った。つまり、抗がん剤治療によりストレスを受けたがん幹細胞の一つは自らニッチとしての機能を獲得する事により、抗がん剤耐性を獲得しているのではないかという仮説である。本研究はこの仮説検証、及びニッチの形成・維持に重要な分

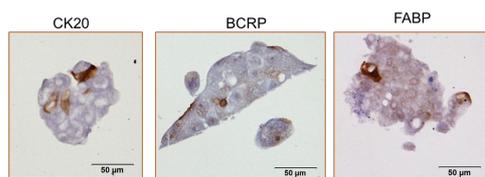
Gene Symbol	Description	(-) signal	Iri (+) signal	SP signal	non-SP signal	SP/n-SP ratio
FFAR3	free fatty acid receptor 3 (FFAR3) (GPR41)	4.3	4.3	217.3	5.4	40.36
KRT20	keratin 20 (KRT20)	31.7	74.2	1728.9	210.3	8.22
FABP1	fatty acid binding protein 1, liver (FABP1)	101.1	53.4	1325.8	164.1	8.08
ABCG2	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2 (ABCG2)	4.6	31.3	314.7	51.5	6.11
SPINK4	serine peptidase inhibitor, Kazal type 4 (SPINK4)	7683.2	728.9	830.9	313.6	2.65
HBEGF	heparin-binding EGF-like growth factor (HBEGF)	137.7	339.3	583.1	275.7	2.11

子の同定、そして、難治性がんの治療に有効な治療手段を開発することを目的としている。

3. 研究の方法

大腸癌細胞株 PLR123 細胞をイリノテカン存在下で培養し、セルソーターを用いて Silde population (SP) とそれ以外の

Confirmation of expression of CK20 and BCRP in irinotecan-treated cells



irinotecan-treated-PLR123 Cell block (embedded paraffin)

(Nons-SP)分画に細胞を分離した。

各分画の mRNA の発現をマイクロアレイ解析にて比較して SP 分画で発現の高い分子をピックアップした。免疫染色によりタンパク質の発現を確認し、その発現意義を考察した。

4. 研究成果

PLR123 細胞にイリノテカンを添加すると生き残った細胞は特徴的なクラスターを形成するとともに SP 分画の割合は増加し、より未分化な細胞集団が濃縮されていることが示唆された。

マイクロアレイ解析にて以下のような遺伝子が同定された。

SP/ n-SP Ratio>2 の分子: 222 遺伝子

SP signal が 100 以上の分子をピックアップ: 18 遺伝子

SP と Non-SP 分画に分離された細胞について mRNA の発現を比較したところ、特に SP 分画に ABC トランスポーターやサイトケラチンなどの発現上昇がみられた。また、免疫染色によりイリノテカン処理によって形成されたクラスターの一部の細胞で同様のタンパクの発現上昇が認められた。

がん細胞 PLR123 はイリノテカン処理により薬剤耐性能の上昇と SP 分画の増加が認められる。特に ABC トランスポーターやサイトケラチンなどが認められるため今後はこれら分子の発現とがん幹細胞維持との関係を明らかにし、それらを標的とした新たな治療戦略の開発を進める。

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 22 件)

Hu Q, Masuda T, Sato K, Tobo T, Nambara S, Kidogami S, Hayashi N, Kuroda Y, Ito S, Eguchi H, Saeki H, Oki E, Maehara Y, Mimori K. Identification of ARL4C as a Peritoneal Dissemination-Associated Gene and Its Clinical Significance in Gastric Cancer. Ann Surg Oncol. 査読有、2018; 25(3):745-53. doi: 10.1245/s10434-017-6292-6. Epub 2017 Dec 21. doi:

Katsura M, Shoji F, Okamoto T, Shimamatsu S, Hirai F, Toyokawa G, Morodomi Y, Tagawa T, Oda Y, Maehara Y. Correlation between CXCR4/CXCR7/CXCL12 chemokine axis expression and prognosis in lymph-node-positive lung cancer patients. Cancer Sci. 査読有、2018; 109(1):154-65. doi: 10.1111/cas.13422. Epub 2017 Nov 9. doi:

Kitao H, Iimori M, Kataoka Y, Wakasa T, Tokunaga E, Saeki H, Oki E, Maehara Y.

- DNA replication stress and cancer chemotherapy. *Cancer Sci.* 査読有、 2018; 109(2):264-71. doi: 10.1111/cas.13455. Epub 2017 Dec 22. doi:
- Korehisa S, Oki E, Iimori M, Nakaji Y, Shimokawa M, Saeki H, Okano S, Oda Y, Maehara Y. Clinical significance of programmed cell death-ligand 1 expression and the immune microenvironment at the invasive front of colorectal cancers with high microsatellite instability. *Int J Cancer.* 査読有、 2018; 142(4):822-32. doi: 10.1002/ijc.31107. Epub 2017 Oct 31. doi:
- Okamoto T, Takada K, Sato S, Toyokawa G, Tagawa T, Shoji F, Nakanishi R, Oki E, Koike T, Nagahashi M, Ichikawa H, Shimada Y, Watanabe S, Kikuchi T, Akazawa K, Lyle S, Takabe K, Okuda S, Sugio K, Wakai T, Tsuchida M, Maehara Y. Clinical and Genetic Implications of Mutation Burden in Squamous Cell Carcinoma of the Lung. *Ann Surg Oncol.* 査読有、 2018; 25(6):1564-71. doi: 10.245/s10434-018-6401-1. Epub 2018 Mar 2. doi:
- Shimagaki T, Yoshizumi T, Harimoto N, Yoshio S, Naito Y, Yamamoto Y, Ochiya T, Yoshida Y, Kanto T, Maehara Y. MicroRNA-125b expression and intrahepatic metastasis are predictors for early recurrence after hepatocellular carcinoma resection. *Hepatol Res.* 査読有、 2018; 48(4):313-21. doi: 10.1111/hepr.12990. Epub 2017 Dec 5. doi:
- Takada K, Toyokawa G, Shoji F, Okamoto T, Maehara Y. The Significance of the PD-L1 Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer: Trenchant Double Swords as Predictive and Prognostic Markers. *Clin Lung Cancer.* 査読有、 2018;19(2):120-9. doi: 10.1016/j.clcc.2017.10.014. Epub Oct 28. doi:
- Takada K, Toyokawa G, Tagawa T, Kohashi K, Shimokawa M, Akamine T, Takamori S, Hirai F, Shoji F, Okamoto T, Oda Y, Maehara Y. PD-L1 expression according to the EGFR status in primary lung adenocarcinoma. *Lung Cancer.* 査読有、 2018; 116:1-6.(doi):10.1016/j.lungcan.2017.12.003. Epub Dec 7. doi:
- Tomino T, Tajiri H, Tatsuguchi T, Shirai T, Oisaki K, Matsunaga S, Sanematsu F, Sakata D, Yoshizumi T, Maehara Y, Kanai M, Cote JF, Fukui Y, Uruno T. DOCK1 inhibition suppresses cancer cell invasion and macropinocytosis induced by self-activating Rac1(P29S) mutation. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有、 2018; 497(1):298-304. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.02.073. Epub Feb 9. doi:
- Yamashita N, Tokunaga E, Iimori M, Inoue Y, Tanaka K, Kitao H, Saeki H, Oki E, Maehara Y. Epithelial Paradox: Clinical Significance of Coexpression of E-cadherin and Vimentin With Regard to Invasion and Metastasis of Breast Cancer. *Clin Breast Cancer.* 査読有、 2018; 16(17):30629-8. doi:
- Haratake N, Toyokawa G, Tagawa T, Kozuma Y, Matsubara T, Takamori S, Akamine T, Yamada Y, Oda Y, Maehara Y. Positive Conversion of PD-L1 Expression After Treatments with Chemotherapy and Nivolumab. *Anticancer Res.* 査読有、 2017; 37(10):5713-7. doi: 10.21873/anticancer.12009. doi:
- Imai D, Yoshizumi T, Okano S, Uchiyama H, Ikegami T, Harimoto N, Itoh S, Soejima Y, Aishima S, Oda Y, Maehara Y. The prognostic impact of programmed cell death ligand 1 and human leukocyte antigen class I in pancreatic cancer. *Cancer Med.* 査読有、 2017; 6(7):1614-26. doi: 10.002/cam4.087. Epub 2017 Jun 10. doi:
- Inoue Y, Yamashita N, Kitao H, Tanaka K, Saeki H, Oki E, Oda Y, Tokunaga E, Maehara Y. Clinical Significance of the Wild Type p53-Induced Phosphatase 1 Expression in Invasive Breast Cancer. *Clin Breast Cancer* 査読有、 2017; 21(17):30385-3. doi:
- Nakanishi R, Kitao H, Kiniwa M, Morodomi Y, Iimori M, Kurashige J, Sugiyama M, Nakashima Y, Saeki H, Oki E, Maehara Y. Monitoring trifluridine incorporation in the peripheral blood mononuclear cells of colorectal cancer patients under trifluridine/tipiracil medication. *Sci Rep.* 査読有、 2017; 7(1):16969. doi: 10.1038/s41598-017-17282-5. doi:
- Nambara S, Masuda T, Tobo T, Kidogami S, Komatsu H, Sugimachi K, Saeki H, Oki E, Maehara Y, Mimori K. Clinical significance of ZNF750 gene expression, a novel tumor suppressor gene, in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 査読有、 2017; 14(2):1795-801. doi: 10.3892/ol.2017.6341. Epub 2017 Jun 8. doi:
- Nishimura S, Oki E, Ando K, Iimori M, Nakaji Y, Nakashima Y, Saeki H, Oda Y, Maehara Y. High ubiquitin-specific protease 44 expression induces DNA aneuploidy and provides independent prognostic information in gastric cancer. *Cancer Med.* 査読有、 2017; 6(6):1453-64. doi: 10.002/cam4.090. Epub 2017 May 23. doi:

Oki E, Okano S, Saeki H, Umemoto Y, Teraishi K, Nakaji Y, Ando K, Zaitu Y, Yamashita N, Sugiyama M, Nakashima Y, Ohgaki K, Oda Y, Maehara Y. Protein Expression of Programmed Death 1 Ligand 1 and HER2 in Gastric Carcinoma. *Oncology*. 査読有、2017; 93(6):387-94. doi: 10.1159/000479231. Epub 2017 Sep 15. doi:

Tajiri H, Uruno T, Shirai T, Takaya D, Matsunaga S, Setoyama D, Watanabe M, Kukimoto-Niino M, Oisaki K, Ushijima M, Sanematsu F, Honma T, Terada T, Oki E, Shirasawa S, Maehara Y, Kang D, Cote JF, Yokoyama S, Kanai M, Fukui Y. Targeting Ras-Driven Cancer Cell Survival and Invasion through Selective Inhibition of DOCK1. *Cell Rep*. 査読有、2017; 19(5):969-80. doi:

10.1016/j.celrep.2017.04.016. doi: Takada K, Toyokawa G, Tagawa T, Kohashi K, Akamine T, Takamori S, Hirai F, Shoji F, Okamoto T, Oda Y, Maehara Y. Association Between PD-L1 Expression and Metabolic Activity on (18)F-FDG PET/CT in Patients with Small-sized Lung Cancer. *Anticancer Res*. 査読有、2017; 37(12):7073-82. doi: 10.21873/anticancer.12180. doi:

Tsuda Y, Iimori M, Nakashima Y, Nakanishi R, Ando K, Ohgaki K, Kitao H, Saeki H, Oki E, Maehara Y. Mitotic slippage and the subsequent cell fates after inhibition of Aurora B during tubulin-binding agent-induced mitotic arrest. *Sci Rep*. 査読有、2017; 7(1):16762. doi: 10.1038/s41598-017-17002-z. doi:

②① Tsutsumi S, Saeki H, Nakashima Y, Ito S, Oki E, Morita M, Oda Y, Okano S, Maehara Y. Programmed death-ligand 1 expression at tumor invasive front is associated with epithelial-mesenchymal transition and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*. 査読有、2017; 108(6):1119-27. doi: 10.1/cas.13237. Epub 2017 May 25. doi:

②② Haratake N, Toyokawa G, Takada K, Kozuma Y, Matsubara T, Takamori S, Akamine T, Katsura M, Shoji F, Okamoto T, Oda Y, Maehara Y. Programmed Death-Ligand 1 Expression and EGFR Mutations in Multifocal Lung Cancer. *Ann Thorac Surg*. 査読有、2018; 105(2):448-54. doi: 10.1016/j.athoracsur.2017.09.025. Epub Dec 15. doi:

〔学会発表〕(計 2 件)

小野尚美、原田結、佐伯浩司、沖英次、米満吉和、前原喜彦. Characterization of drug resistant cancer stem-like cells and elucidation of the

maintenance mechanisms. 第 28 回日本消化器癌発生学会、2017

小野尚美、原田結、佐伯浩司、米満吉和、前原喜彦. 薬剤耐性がん幹細胞株細胞の動態変化とその維持機構、第 27 回日本消化器癌発生学会、2016

〔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

前原 喜彦 (MAEHARA, Yoshihiko)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号：80165662

(2) 研究分担者

米満 吉和 (YONEMITSU, Yoshikazu)
九州大学・薬学研究院・教授
研究者番号：40315065

沖 英次 (OKI, Eiji)
九州大学・医学研究院・講師
研究者番号：70380392

佐伯 浩司 (SAEKI, Hiroshi)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号：80325448

原田 結 (HARADA, Yui)
九州大学・薬学研究院・助教
研究者番号：00608507

(3) 連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし