

令和 2 年 4 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04157

研究課題名(和文)変動するヒエラルキーに着目した消化器癌治療法～マウスからヒト可視化モデルへ～

研究課題名(英文)Therapeutic strategy against gastrointestinal cancer by utilizing cancer hierarchy

研究代表者

妹尾 浩 (Seno, Hiroshi)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：90335266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,500,000円

研究成果の概要(和文)：癌の進展過程では、癌幹細胞を頂点とする階層性と分化・脱分化を生じる可塑性が併存し、癌組織のヒエラルキーがダイナミックに変動する。本研究に先だって研究代表者らは、癌幹細胞特異的マーカーとしてDcl1を報告し、消化器癌の分化・脱分化の制御因子としてSWI/SNF複合体の意義を示してきた。本研究では、(1)階層性を活かし癌幹細胞を標的とする消化器癌治療、(2)可塑性を活かし分化を誘導する消化器癌治療を検討し、(3)生体外培養系と可視化技術を用いたヒト消化器癌での検証を行った。それによりヒト消化器癌に対する臓器横断的な新規治療法に向けた基盤的知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通じて、正常組織への傷害を回避しつつ癌組織を選択的に退縮させる理想的な癌治療へ近づくための基盤的知見を得ることができた。また、可塑性を応用した分化誘導治療に道を拓き、臓器の違いを超えた消化器癌治療の開発につながる将来性が期待される。このように、消化器癌の階層性と可塑性の本態に迫ろうとする学術的側面と、ヒト消化器癌の生体外可視化モデルを併用して「消化器癌幹細胞標的・分化誘導治療法開発」へ向けた創薬標的を検証する臨床的側面の双方で意義を有する研究と思われた。

研究成果の概要(英文)：During cancer development, cancer stem cells are closely associated with hierarchy and plasticity of cancer tissues. Previously, we reported that Dcl1 is one of the cancer stem cell-specific markers, and that SWI/SNF complex regulates differentiation of gastrointestinal cancers. Based on these findings, we here investigated (1) therapeutic strategy by utilizing cancer hierarchy and cancer stem cells, (2) therapeutic strategy by focusing on plasticity and differentiation status, and (3) determined them in organoid and patient-derived xenograft systems. These experiments indicated fundamental data to develop novel therapeutic strategies against various gastrointestinal cancers.

研究分野：消化器病学

キーワード：大腸癌 膵臓癌 可塑性 分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の幹細胞研究の進歩により、正常組織幹細胞と同様に、癌組織にも癌幹細胞が存在し、ある種の階層性をもたらしていることがわかった。しかし正常臓器と癌組織の階層性は固定したものでなく、微小環境やジェネティック、エピジェネティックな変化によって、分化した正常細胞/癌細胞が再び幹細胞性を獲得するなど、ダイナミックに変動することも明らかになってきた。たとえば炎症下で癌遺伝子が活性化すると、腸タフト細胞から腸腫瘍が、膵腺房細胞から膵腫瘍 (pancreatic intraepithelial neoplasia; PanIN) が発生し、様々な消化器臓器で分化細胞が可塑性や癌化のポテンシャルを持つ。その一方で、腫瘍細胞に増殖能を失わせ、分化細胞に誘導する治療法も検討されており、これら階層性と可塑性がもたらす「変動するヒエラルキー」に着目した消化器癌治療法の可能性が注目を集めている。

本研究に先立って研究代表者らは、消化器癌がもつ階層性を癌幹細胞を中心に検証してきた。すなわち腸では *Dclk1* が腫瘍幹細胞特異的マーカーであり、*Apc^{Min}* マウスを用いた実験で、*Dclk1* 陽性細胞の排除によって正常腸組織に傷害なく腸腫瘍のみが劇的に退縮することを示した。同様にマウス膵腫瘍 (PanIN) でも、*Dclk1* 陽性細胞の排除によって膵腫瘍が消失した。このように、腫瘍組織の階層性を活かし腫瘍幹細胞を排除することは、臓器の違いを超えた消化器癌治療につながる可能性があると考えた。

一方、ダイナミックに分化・脱分化を生じる可塑性についても、クロマチン・リモデリングの制御因子 SWI/SNF 複合体の関与を報告してきた。SWI/SNF 複合体の構成因子 Brg1 や Arid1 の遺伝子変異は様々な消化器癌で報告されているが、申請者らは Brg1 欠損に Kras 活性化が加わると脱分化して、粘液分泌が特徴の intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) および IPMN 膵癌が生じることを報告した。同様に腸管でも Brg1 欠損により増殖帯の延長と分泌細胞への分化が促進され、SWI/SNF 複合体が消化器臓器の癌化と分化を制御する因子であることを示してきた。

研究代表者らは、これら独自の先行研究を通じて *Dclk1* 陽性癌幹細胞に特異的に発現する因子を多数同定した。さらに、SWI/SNF 複合体の下流で発現が上昇するキナーゼ類も複数同定した。そこで本研究では、これら消化器癌の階層性と可塑性に関する因子を創薬標的と捉え、変動するヒエラルキーに着目した消化器癌治療戦略を構築しようと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 階層性を活かし癌幹細胞を標的とする消化器癌治療、(2) 可塑性を活かし分化を誘導する消化器癌治療を検討し、(3) 生体外培養系と可視化技術を用いたヒト消化器癌での検証を行うこととした。それにより消化器癌の癌幹細胞動態と可塑性の本態に迫るとともに、ヒト消化器癌に対する臓器横断的な新規治療法の実現を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、以下の3つの計画を立てた。

(1) 階層性を活かし癌幹細胞を標的とする消化器癌治療の検討

Dclk1 陽性癌幹細胞特異的な因子を阻害する小分子化合物、抗体の意義を検証し、癌幹細胞排除のための創薬シーズを検討する。

(2) 可塑性を活かし分化を誘導する消化器癌治療の検証

SWI/SNF 複合体の下流キナーゼを阻害し、癌細胞の分化誘導効果を検証する。

(3) 生体外培養系と可視化技術を用いヒト消化器癌への応用を目指す展開

ヒト消化器癌3次元スフェロイド培養系とPDXモデルに細胞系譜解析と可視化技術を導入し、

上記(1)、(2)で見いだした創薬標的のヒト消化器癌における実効性を検証する。

これらの研究により、消化器癌における癌幹細胞標的治療、分化誘導治療の開発を目指すこととした。

4. 研究成果

本研究では、以下の研究成果を得た。

(1) 階層性を活かし癌幹細胞を標的とする消化器癌治療の検討

まず Dclk1 下流因子の意義を検証するためのモデル動物を作出した。Dclk1 陽性癌幹細胞に高発現する因子が癌幹細胞維持に果たす役割を検証するため、Rac2 ノックアウトマウスなどを腸腫瘍モデルマウス (*Apc^{Min}* マウス)、膵腫瘍モデルマウス (*Ptf1a-Cre; Kras^{G12D}; Trp53^{I72H}* マウス) と交配した。その結果、Rac2 ノックアウトにより腸腫瘍数は減少した。また、同様に Dclk1 陽性癌幹細胞に高発現する IL17RB のノックアウトマウスを *Apc^{Min}* マウス、*Ptf1a-Cre; Kras^{G12D}; Trp53^{I72H}* マウスと交配したところ、腸腫瘍数および膵腫瘍数は有意な減少を認めなかった。これらの結果に基づいて、ヒト大腸癌細胞株で Rac2 を阻害したところ、有意に癌細胞の増殖が抑制された。一方、抗 IL17RB 抗体の投与では同様の効果は認められなかった。

(2) 可塑性を活かし分化を誘導する消化器癌治療の検証

まず SWI/SNF 複合体の構成因子のうち、その欠失が消化器癌の発生と分化状態に影響する Brg1 に加え、種々の消化器癌で遺伝子変異が報告されている Arid1a の意義も検証することとした。そのため *Brg1* または *Arid1a* ノックアウトマウスを、腸腫瘍モデルマウス (*Apc^{Min}* マウス)、膵腫瘍モデルマウス (*Ptf1a-Cre; Kras^{G12D}; Trp53^{I72H}* マウス) と交配し、*Brg1* または *Arid1a* の腸腫瘍、膵腫瘍における役割を *in vivo* で検討した。その結果、*Brg1* ノックアウトによりマウス腸腫瘍数は減少し、膵腫瘍も減少した。しかし、*Arid1a* ノックアウトによりマウス腸腫瘍数は減少し、膵腫瘍数は変化しなかった。このように、*Brg1* と *Arid1a* の間に臓器によって表現型の差があることが明らかとなった。

一方、ヒト消化器癌で報告されている BRG1 および ARID1A 遺伝子の変化は欠失または変異が多く、SWI/SNF 複合体を標的に消化器癌を分化させるためには、その機能を回復させる必要がある。そこで、ヒト消化器癌細胞株で、BRG1 および ARID1A の下流で高発現するキナーゼの発現を阻害し、SWI/SNF 複合体下流の転写制御が回復するかを検討した。その結果、一部のキナーゼ発現の阻害によって、SWI/SNF 複合体下流で Sox9 などの転写制御が回復することがわかった。

(3) 生体外培養系と可視化技術を用いヒト消化器癌への応用を目指す展開

ヒト大腸癌および膵癌患者から、外科的手術または内視鏡によって採取した消化器癌組織をもとに消化器癌 3 次元スフェロイド培養系の作成を行った。本研究に先立って大腸癌と膵癌の 3 次元スフェロイド培養系の作成を開始し、一定数のヒト消化器癌 3 次元スフェロイド培養系の蓄積 = バンク化を進めてきたが、一層充実したヒト消化器癌由来 3 次元スフェロイド培養系バンクを構築することができた。また、それらヒト消化器癌 3 次元スフェロイド培養系バンクから PDX モデルを作成した。上記(1)、(2)で同定したシーズを同モデルに適用したところ、一部のシーズ候補でヒト消化器癌スフェロイド、PDX の退縮効果を確認することができた。

これら(1)~(3)の研究を通じて、消化器癌の階層性と可塑性を標的とし、ダイナミックに変動するヒエラルキーに着目した新規消化器癌治療戦略の確立につながる知見を獲得することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Matsumoto Y, Nakanishi Y, Yoshioka T, Yamaga Y, Masuda T, Fukunaga Y, Sono M, Yoshikawa T, Nagao M, Araki O, Ogawa S, Goto N, Hiramatsu Y, Breyer RM, Fukuda A, Seno H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Epithelial EP4 plays an essential role in maintaining homeostasis in colon.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 15244
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-51639-2.	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 該当する
1. 著者名 Goto N, Fukuda A, Yamaga Y, Yoshikawa T, Maruno T, Maekawa H, Inamoto S, Kawada K, Sakai Y, Miyoshi H, Taketo MM, Chiba T, Seno H.	4. 巻 116
2. 論文標題 Lineage tracing and targeting of IL17RB+ tuft cell-like human colorectal cancer stem cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 12996-13005
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1900251116.	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 -
1. 著者名 Nishikawa Y, Kodama Y, Shiokawa M, Matsumori T, Marui S, Kuriyama K, Kuwada T, Sogabe Y, Kakiuchi N, Tomono T, Mima A, Morita T, Ueda T, Tsuda M, Yamauchi Y, Sakuma Y, Ota Y, Maruno T, Uza N, Uesugi M, Kageyama R, Chiba T, Seno H.	4. 巻 38
2. 論文標題 Hes1 plays an essential role in Kras-driven pancreatic tumorigenesis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncogene.	6. 最初と最後の頁 4283-4296
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-019-0718-5.	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 -
1. 著者名 Yoshioka T, Fukuda A, Araki O, Ogawa S, Hanyu Y, Matsumoto Y, Yamaga Y, Nakanishi Y, Kawada K, Sakai Y, Chiba T, Seno H.	4. 巻 248
2. 論文標題 Bmi1 marks gastric stem cells located in the isthmus in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Pathol.	6. 最初と最後の頁 179-190
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/path.5244.	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 -

1. 著者名 Hiramatsu Y, Fukuda A, Ogawa S, Goto N, Ikuta K, Tsuda M, Matsumoto Y, Kimura Y, Yoshioka T, Takada Y, Maruno T, Hanyu Y, Tsuruyama T, Wang Z, Akiyama H, Takaishi S, Miyoshi H, Taketo MM, Chiba T, Seno H.	4. 巻 116
2. 論文標題 Arid1a is essential for intestinal stem cells through Sox9 regulation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 1704-1713
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1804858116.	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 -

1. 著者名 Tsuda M, Fukuda A, Roy N, Hiramatsu Y, Leonhardt L, Kakiuchi N, Hoyer K, Ogawa S, Goto N, Ikuta K, Kimura Y, Matsumoto Y, Takada Y, Yoshioka T, Maruno T, Yamaga Y, Kim GE, Akiyama H, Ogawa S, Wright CV, Saur D, Takaori K, Uemoto S, Hebrok M, Chiba T, Seno H.	4. 巻 128
2. 論文標題 The BRG1/SOX9 axis is critical for acinar cell-derived pancreatic tumorigenesis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Clin Invest.	6. 最初と最後の頁 3475-3489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI94287.	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 該当する

1. 著者名 Yamaga Y, Fukuda A, Nakanishi Y, Goto N, Matsumoto Y, Yoshioka T, Maruno T, Chiba T, Seno H.	4. 巻 50
2. 論文標題 Gene expression profile of Dclk1+ cells in intestinal tumors.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Dig Liver Dis.	6. 最初と最後の頁 1353-1361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dld.2018.06.011.	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 -

1. 著者名 Kimura Y, Fukuda A, Ogawa S, Maruno T, Takada Y, Tsuda M, Hiramatsu Y, Araki O, Nagao M, Yoshikawa T, Ikuta K, Yoshioka T, Wang Z, Akiyama H, Wright CV, Takaori K, Uemoto S, Chiba T, Seno H.	4. 巻 155
2. 論文標題 ARID1A Maintains Differentiation of Pancreatic Ductal Cells and Inhibits Development of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma in Mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Gastroenterology.	6. 最初と最後の頁 194-209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2018.03.039.	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 該当する

1. 著者名 Sakuma Y, Kodama Y, Eguchi T, Uza N, Tsuji Y, Shiokawa M, Maruno T, Kuriyama K, Nishikawa Y, Yamauchi Y, Tsuda M, Ueda T, Matsumori T, Morita T, Tomono T, Kakiuchi N, Mima A, Sogabe Y, Marui S, Kuwada T, Okada A, Watanabe T, Nakase H, Chiba T, Seno H.	4. 巻 8
2. 論文標題 Chemokine CXCL16 mediates acinar cell necrosis in cerulein induced acute pancreatitis in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 8829
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-27200-y	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 Kanda K, Sakamoto J, Matsumoto Y, Ikuta K, Goto N, Morita Y, Ohno M, Nishi K, Eto K, Kimura Y, Nakanishi Y, Ikegami K, Yoshikawa T, Fukuda A, Kawada K, Sakai Y, Ito A, Yoshida M, Kimura T, Chiba T, Nishi E, Seno H.	4. 巻 3
2. 論文標題 Nardilysin controls intestinal tumorigenesis through HDAC1/p53-dependent transcriptional regulation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JCI Insight.	6. 最初と最後の頁 e91316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.91316.	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 -

1. 著者名 Goto Norihiro, Ueo Taro, Fukuda Akihisa, Kawada Kenji, Sakai Yoshiharu, Miyoshi Hiroyuki, Taketo Makoto Mark, Chiba Tsutomu, Seno Hiroshi	4. 巻 77
2. 論文標題 Distinct Roles of HES1 in Normal Stem Cells and Tumor Stem-like Cells of the Intestine	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 3442 ~ 3454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-16-3192	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 -

1. 著者名 Matsumoto Tomonori, Takai Atsushi, Eso Yuji, Kinoshita Kazuo, Manabe Toshiaki, Seno Hiroshi, Chiba Tsutomu, Marusawa Hiroyuki	4. 巻 77
2. 論文標題 Proliferating EpCAM-Positive Ductal Cells in the Inflamed Liver Give Rise to Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 6131 ~ 6143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-17-1800	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13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 平松由紀子、福田晃久、妹尾浩
2. 発表標題 Sox9制御を介した腸幹細胞、腸恒常性維持におけるArid1aの役割について
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川智、福田晃久、妹尾浩
2. 発表標題 Setdb1はp53発現制御を介してアポトーシスを阻害することにより膵臓癌の形成に必要である
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 妹尾浩、後藤規弘、福田晃久
2. 発表標題 The role of tuft cell-like tumor/cancer cells in intestinal tumors.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平松由紀子、福田晃久、妹尾浩
2. 発表標題 Sox9制御を介した腸幹細胞、腸恒常性維持におけるArid1aの役割について
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川智、福田晃久、津田喬之、後藤規弘、平松由紀子、妹尾浩
2. 発表標題 The functional role of Eset in exocrine pancreatic regeneration and pancreatic cancer initiation
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 津田喬之、福田晃久、妹尾浩
2. 発表標題 BRG1/SOX9 axis is critical for acinar cell-derived pancreatic tumorigenesis.
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yukio Hiramatsu, Akihisa Fukuda, Hiroshi Seno
2. 発表標題 Essential role of Arid1a in intestinal stem cell maintenance and homeostasis through Sox9 regulation.
3. 学会等名 GI Research Academy 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 後藤規弘、福田晃久、妹尾浩
2. 発表標題 腸管の正常幹細胞と腫瘍幹細胞におけるHes1の役割
3. 学会等名 第104回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Norihiko Goto, Akihisa Fukuda, Tsutomu Chiba, Hiroshi Seno
2. 発表標題 The role of Hes1 in the normal and tumor stem cells of the intestine.
3. 学会等名 American Association for Cancer Research (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Motoyuki Tsuda, Akihisa Fukuda, Takahisa Maruno, Haruhiko Akiyama, Kyoichi Takaori, Shinji Uemoto, Tsutomu Chiba, Hiroshi Seno, et al.
2. 発表標題 Brg1 plays a critical role in PanIN formation through regulating Sox9 expression.
3. 学会等名 American Association for Cancer Research (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松本知訓、妹尾浩、丸澤宏之
2. 発表標題 EpCAM陽性肝幹/前駆細胞を起源とした肝発癌の分子機構
3. 学会等名 第103回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kozo Ikuta, Akihisa Fukuda, Eiichiro Nishi, Hiroshi Seno, et al.
2. 発表標題 Nardilysin functions as a tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma through maintaining acinar cell differentiation and suppressing pancreatitis.
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 妹尾浩、丸野貴久、後藤規弘、津田喬之、木村佳人、福田晃久
2. 発表標題 膵がん形成過程における可塑性と幹細胞性
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都大学大学院医学研究科・消化器内科学 研究業績 https://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~gastro/kenkyu/gyoseki.html</p>
--

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
研究分担者	福田 晃久 (Fukuda Akihisa) (70644897)	京都大学・医学研究科・講師 (14301)	