

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09385

研究課題名(和文) 大腸癌幹細胞を標的とした新しい光線免疫療法の開発応用

研究課題名(英文) Immunophoto therapy targeting cancer stem cell in colorectal cancer

研究代表者

六車 直樹 (MUGURUMA, Naoki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・准教授

研究者番号：90325283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：20症例の大腸癌オルガノイドの樹立ならびに継代培養に成功した。がん幹細胞マーカーである、LGR5、CD133、CD44v6に対してフローサイトメトリーを行った。5-FUおよびオキサリプラチンを用いてIC50による薬剤耐性を評価するとともに、ヌードマウスにオルガノイドを移植し、増殖能および薬剤耐性を評価した。Lgr5陽性細胞中でCD133陽性率が高いものは薬剤感受性が高く、CD133陽性率が低いものが薬剤耐性に関わっている可能性が考えられた。GIST細胞株を用い担癌ヌードマウスにレーザー照射を定期的に行った。全治療マウスで90%以上の腫瘍縮小率が得られ、うち4匹では腫瘍が完全に消失した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、大腸癌幹細胞としてLgr5陽性細胞に着目し、Lgr5陽性細胞中でCD133陽性率が高いものは抗がん剤薬剤感受性が高く、CD133陽性率が低いものが薬剤耐性に関わっている可能性を示し、これまでになく新たな知見を得た。さらにオルガノイドをヌードマウスへの移植を試み、細胞株とは異なりヒト組織を反映した腫瘍形成を確認した。代用したGIST細胞でレーザー焼灼を行ったところ、標識抗体投与群のみで高い治療効果が得られたことから、Lgr5などの表面マーカーを標的とする大腸癌幹細胞の光免疫治療への応用が期待された。光免疫治療法の確立により化学療法抵抗性を示す大腸癌の予後改善が期待される。

研究成果の概要(英文)：Organoids were successfully developed and cultured from 20 cases of colorectal cancer and flowcytometry was performed to evaluate expression of cancer stem cell markers such as LGR5, CD133 and CD44v6. Chemoresistance was noted in organoids showing high expression of LGR5 and low expression of CD133. Organoids were implanted to nude mice and tumor resembling original human tumor was created. Gastrointestinal stromal tumor expressing c-kit was implanted to nude mice and treated with infrared laser irradiation in combination with intravenous injection of IR700-labeled anti-c-kit antibody. Tumor regression rate was 90% and tumor was completely eradicated in 4 out of 7 mice. In these results, it is expected to realize photoimmunotherapy targeting cancer stem cell in colorectal cancer.

研究分野：消化器内科学

キーワード：がん幹細胞 大腸癌 分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

(1) わが国で新たに発見される大腸癌症例は年間 10 万人を超える。進行大腸癌の予後は分子標的薬剤の登場などにより改善してきている。しかし、ステージ 4 における 5 年生存率は 20% 未満であり、ほとんどの症例で根治が得られていないのが現状である。このような背景から進行大腸癌を根治するための新しい治療戦略の開発の必要性が高まっている。一部のがん細胞は、自らとまったく同じ細胞を作り出す「自己複製能」と、多種類の細胞に分化しうる「多分化能」という、胚性幹細胞や体性幹細胞などの幹細胞に共通して見られる 2 つの特徴を持ち、がん組織中で自己複製により自分と同じ細胞を維持しながら、分化によって周辺の大数のがん細胞を生み出すもとなっていると考えられている。これらの一部のがん細胞を「がん幹細胞」と呼び、治療抵抗性に重要な役割を果たしていると考えられている。その理由として、がん幹細胞は細胞周期の回転が遅いあるいは G0 期にあるため抗がん剤や放射線の増殖を標的とした治療が聞きにくい点、トランスポーターなど薬剤をくみ出す機構が発達している点、薬剤耐性の獲得などが考えられている。つまり、一般的な抗がん剤による治療では、がん幹細胞としての機能を持たない分化したがん細胞だけを標的としている問題点が考えられる。標準治療によって大部分のがん細胞を除いても、ごく少数のがん幹細胞が生き残っていればやがて再発が起こりうることになり、これが、がんにおいてしばしば再発が起きる理由と考えられている。がん幹細胞を標的として除去することができれば、がんの転移や再発の防止にも有用な治療法の開発につながることを期待されている。近年、大腸癌など固形がんにおけるがん幹細胞で発現している CD44 や CD133 などの分子マーカーが明らかとなり、発現と機能との関連や治療標的としての可能性が大いに注目されている。がん幹細胞を標的とした薬剤の開発も進んでいるが、発現分子は個人間で異なるため、限界も指摘されつつある。

(2) 最近、佐藤らはヒトの内視鏡生検組織や手術標本組織から正常細胞または腫瘍細胞を分離し、各種増殖因子、Wnt3A などを添加して培養することにより、大腸細胞が腺管を形成して長期間培養しうる新しい培養技術を報告した(オルガノイド培養)。このオルガノイドを用いれば、たった 1 つの幹細胞から生体内の組織に類似した構造を培養皿あるいは移植したマウスの体内で患者腫瘍の性質をそのまま反映させることが可能である。がん幹細胞のオルガノイドを解析することで、がん幹細胞の起源や発生、増殖等について検討できるほか、標的治療の可能性についても検討され始めている。

(3) NIH の小林らは光分子イメージングの技術を発展させる形で、抗体の持つ抗原結合特異性の高さを利用し、光感受性基質に近赤外光の照射を行うことで特定の細胞を死滅させる「光線免疫療法」をヒト抗体使用のもとに確立した。本法の長所は、正常細胞を傷害することなく抗体が結合した細胞のみを傷害する点、抗体のみでは効果が弱い点を光照射によるシナジー効果が得られる点、近赤外光を用いることにより組織透過性を向上させ、深部に存在する標的のみを傷害可能な点、さらに標的への抗体を変えることによってさまざまな標的分子に対応可能な点である。

2. 研究の目的

上述の光免疫療法を応用することで従来の殺細胞性あるいは分子標的薬剤とは異なる機序で、大腸がん幹細胞を標的とした新たな治療法を本基盤研究で確立することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 大腸癌患者より生検サンプルを採取し、複数の因子を含む培地で培養を行う。
- (2) 得られたオルガノイドから LGR5 などの幹細胞マーカーの発現を調べる。
- (3) 候補分子のウェスタンブロッティング解析、免疫染色を行い、抗体を絞り込む。
- (4) 標識抗体を作製し、蛍光特性と抗体活性を *in vitro* および *in vivo* で評価する。
- (5) 標識抗体を用いて担癌ヌードマウスに光線免疫療法を行い、治療後評価を行う。

4. 研究成果

(1) 徳島大学病院倫理委員会の承認を得て 20 症例の大腸癌症例に対して大腸内視鏡検査時に病変部より生検を行い、オルガノイドの樹立ならびに継代培養に成功した。がん幹細胞マーカーである、LGR5、CD133、CD44v6 に対してフローサイトメトリーを行った。LGR5 発現細胞において、CD133 低発現群(Ca13)と高発現群(Ca18)で、進行大腸癌の標準治療薬である 5-FU およびオキサリプラチンを用いて IC50 による薬剤耐性を評価したところ、IC50 値は Ca13 で 225 μ M、Ca18 は 200 μ M で有意差は認められなかった

(図 1)

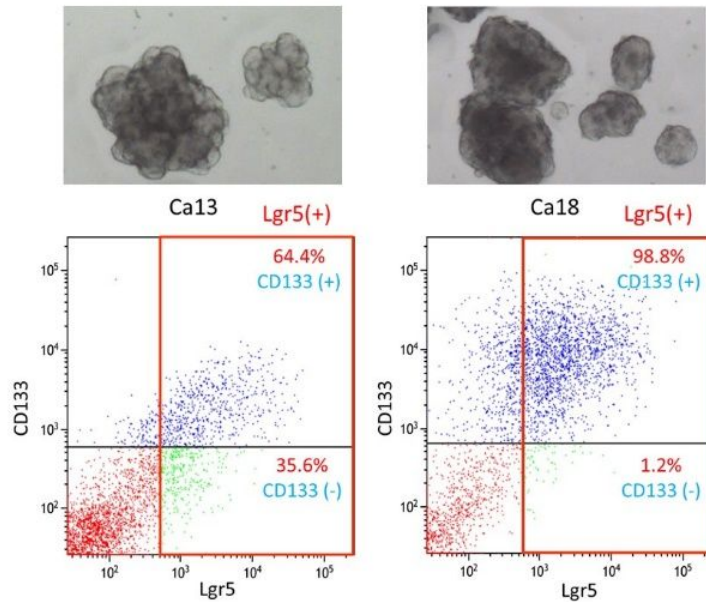


図 1 . 大腸癌オルガノイド (Lgr5+) における CD133 発現 (フローサイトメトリー法)

(2) 続いてヌードマウスに各オルガノイドを移植し、増殖能および薬剤耐性を評価した。Ca18 で腫瘍体積の抑制効果が強くみられ、形質の違いが IC50 に反映されていた。以上より Lgr5 陽性細胞中で CD133 陽性率が高いものは薬剤感受性が高く、CD133 陽性率が低いものが薬剤耐性に関わっている可能性が考えられた (図 2)。これらが幹細胞は population が極めて少ないことから、代用実験として CD133 発現の高い GIST 細胞株を用い担癌ヌードマウスにレーザー照射を定期的に行うこととした (図 3)。

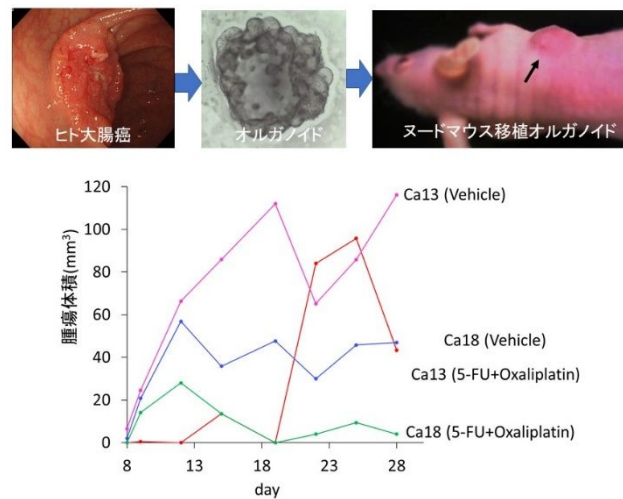


図 2 . 大腸癌オルガノイド移植ヌードマウスにおける薬剤効果

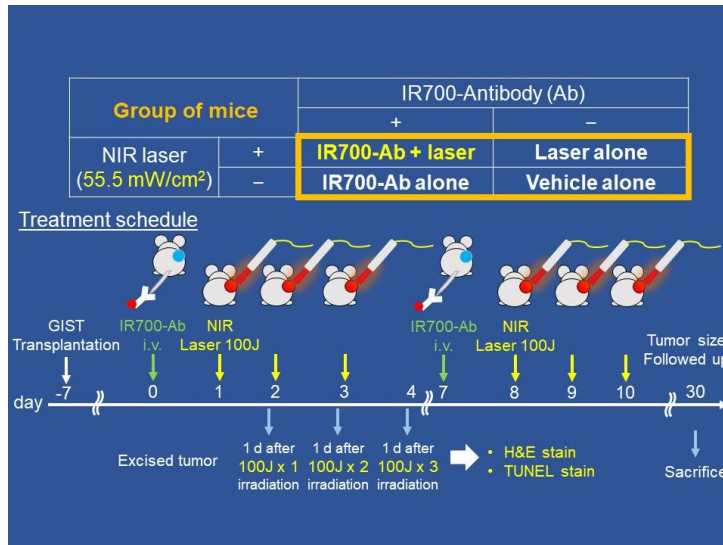


図3 . 腫瘍オルガノイド移植ヌードマウスに対する光免疫治療プロトコール

(3) GISTはc-KIT発現が高いことから赤外蛍光物質であるIR700標識抗c-KIT抗体をマウスに静脈投与した。その結果、GIST細胞特異的な蛍光シグナルが得られた。IR700標識抗体はGIST腫瘍特異的に集積した。腫瘍部における蛍光強度は投与後24時間をピークに漸減したが、非腫瘍部との蛍光強度比は増大傾向がみられた。

(4) 続いて標識抗体反応下にレーザーを照射したところ、標識抗体投与後にレーザーを照射することで、強力な腫瘍縮小効果が得られた。照射量依存的な抗腫瘍効果が確認された。全治療マウスで90%以上の腫瘍縮小率が得られ、うち4匹では腫瘍が完全に消失した(図4)。

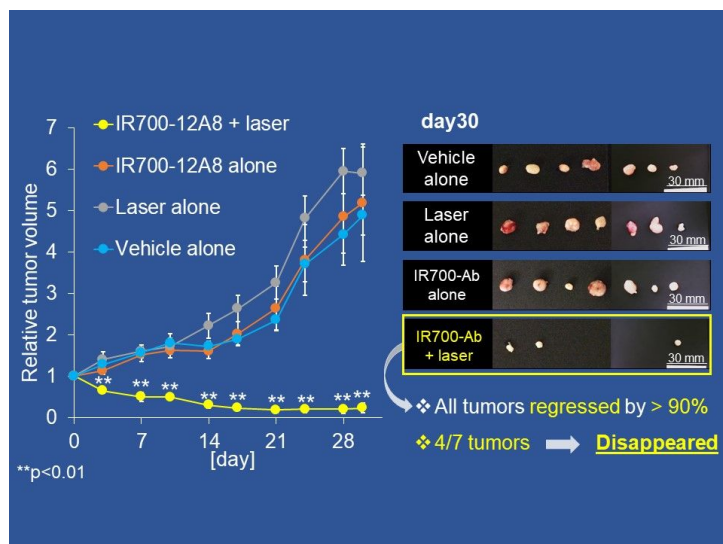


図4 . 腫瘍オルガノイド移植ヌードマウスに対する光免疫治療の効果

(5) Western Blotによる検討では、治療群においてcleaved PARPの増大が確認された。TUNEL染色により算出したApoptotic Indexは、治療群で有意に増加しており、治療後1日目に最も高かった。細胞死を導く機序としては、膜状に局在する標識抗体だけでなく内在化により細胞内へと移行した標識抗体がレーザー照射により活性酸素を産出し、細胞膜上と細胞質内での双方で細胞死(アポトーシス)を誘導していることが考えられた(図5)。

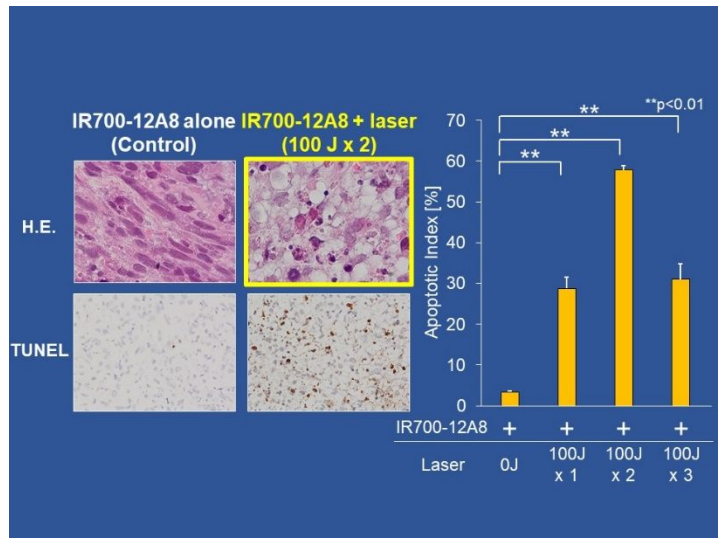


図5 . 光免疫治療後のアポトーシス評価 (TUNEL 染色法)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Miyamoto Yoshihiko, Muguruma Naoki, Fujimoto Shota, Okada Yasuyuki, Kida Yoshifumi, Nakamura Fumika, Tanaka Kumiko, Nakagawa Tadahiko, Kitamura Shinji, Okamoto Koichi, Miyamoto Hiroshi, Sato Yasushi, Takayama Tetsuji	4. 巻 110
2. 論文標題 Epidermal growth factor receptor targeted molecular imaging of colorectal tumors: Detection and treatment evaluation of tumors in animal models	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1921-1930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14020	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 Fujimoto Shota, Muguruma Naoki, Okamoto Koichi, Kurihara Takeshi, Sato Yasushi, Miyamoto Yoshihiko, Kitamura Shinji, Miyamoto Hiroshi, Taguchi Takahiro, Tsuneyama Koichi, Takayama Tetsuji	4. 巻 8
2. 論文標題 A Novel Theranostic Combination of Near-infrared Fluorescence Imaging and Laser Irradiation Targeting c-KIT for Gastrointestinal Stromal Tumors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Theranostics	6. 最初と最後の頁 2313 ~ 2328
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/thno.22027	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Muguruma N, Okamoto K, Takayama T
2. 発表標題 Advanced endoscopic imaging in colorectal lesions
3. 学会等名 Korea International Digestive Endoscopy Congress 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤本将太、六車直樹、高山哲治
2. 発表標題 KIT を 標 的 と し た Gastrointestinal stromal tumorの新しい光分子イメージングと光抗体療法の開発
3. 学会等名 第93回日本消化器内視鏡学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 和田浩典、六車直樹、岡本耕一、藤本将太、藤野泰輝、北村晋志、宮本弘志、佐藤康史、島田光生、高山哲治
2. 発表標題 新規蛍光撮像システムによる大腸前癌病変aberrant crypt fociの分子イメージング
3. 学会等名 第15回日本消化管学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤本将太、六車直樹、岡本耕一、佐藤康史、宮本佳彦、北村晋志、宮本弘志、高山哲治
2. 発表標題 近赤外蛍光標識c-KIT抗体を用いた消化管間質腫瘍（GIST）に対する新たな内視鏡診断治療法（Theranostics）の開発
3. 学会等名 第15回日本消化管学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮本佳彦、六車直樹、高山哲治
2. 発表標題 大腸腫瘍に発現するEGFRを標的とした内視鏡分子イメージングの試み
3. 学会等名 第97回日本消化器内視鏡学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榎原孝典、宮本佳彦、藤本将太、和田浩典、川口智之、喜田慶史、中村文香、田中久美子、北村晋志、岡本耕一、宮本弘志、佐藤康史、六車直樹、高山哲治
2. 発表標題 大腸腫瘍に発現するEpidermal Growth Factor Receptorを標的とした内視鏡分子イメージング
3. 学会等名 第16回日本消化管学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Takayama T, Sato Y, Muguruma N	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer Nature Singapore	5. 総ページ数 116
3. 書名 Alcoholic/Non-Alcoholic Digestive Diseases	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	高山 哲治 (TAKAYAMA Tetsuji) (10284994)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授 (16101)	
研究 分担者	岡本 耕一 (OKAMOTO Koichi) (60531374)	徳島大学・病院・講師 (16101)	