

令和 3 年 6 月 26 日現在

機関番号：81303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10716

研究課題名(和文)胆管癌がん幹細胞を治療標的とする化合物の探索

研究課題名(英文) Identification of a small compound targeting cancer stem cells in cholangiocarcinoma

研究代表者

山本 久仁治 (Yamamoto, Kuniharu)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・がん幹細胞研究部・特任研究員

研究者番号：00375073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：近年、がん組織の中に「がん幹細胞」の存在が報告されている。がん幹細胞は静止期に存在するため、抗癌剤や放射線照射に対して強い耐性を持ち、治療抵抗性の主因を担っている。私たちは、胆道癌における新規がん幹細胞関連遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、BEX2遺伝子を同定した。BEX2は胆管癌における静止期癌幹細胞維持に必要な分子であることがわかり、治療標的になり得ると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちは難治性癌である胆管癌の新たな治療標的を同定した。今後、詳細な分子機構を明らかにすることで、新規治療に結びつく可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Recently, Cancer stem cell is recognized as therapy-resistant cells because its population is dominant in quiescent phase. We searched a new cancer stem cell-related gene, and found BEX2. BEX2 is indispensable in maintaining dormant cancer stem cells and could be a promising therapeutic target.

研究分野：腫瘍学

キーワード：胆管癌

1. 研究開始当初の背景

近年、がん組織の中に「がん幹細胞」の存在が報告されている。がん幹細胞は静止期に存在するため、抗癌剤や放射線照射に対して強い耐性を持ち、治療抵抗性の主因を担っている。これまで私たちは、胆道癌における新規がん幹細胞関連遺伝子のスクリーニングを行ってきた。その結果、CD274 低発現細胞は静止期に局在し、CD274 (PD-L1) ががん幹細胞に対して抑制的に働くことを見いだした。(Cancer Science, 2014) 更に、胆道癌症例の解析では、(これまで報告のある膵癌や肺癌での結果とは逆に) CD274 低発現症例は予後不良であることも明らかにした。従って、CD274 は胆道癌においては有効な治療ターゲットとはならないことが考えられた。そこで、私たちは CD274 低発現分画で高発現している機能性分子を探索することで、新たな治療ターゲットを見いだそうとした。マイクロアレイを用いたスクリーニングの結果、BEX2 (Brain-expressed X-linked gene 2) 遺伝子の発現が CD274 低分画で高発現しており、ノックダウンすると造腫瘍能が著しく低下した。BEX2 は、もともと胎児脳の cDNA ライブラリーからクローニングされた遺伝子であるが、機能解析はほとんどなされていない。最近、BEX2 ノックアウトマウスが作成され、肝や胃上皮における正常幹細胞マーカーとなり得ると報告されたが、その詳細な機能解析はなされていない。興味深いことに、静止期において、CD274 は低発現であり、同時に BEX2 は高発現であった。BEX2 をノックダウンすると、静止期の細胞が著明に減少した。これらの結果からは、BEX2 によって静止期の細胞分画が減少し、抗癌剤耐性を失うことが予想されたが、実際に、BEX2 をノックダウンすると gemcitabine に対する感受性は上昇した。BEX2 の発現を抑えると、造腫瘍を失い、抗癌剤感受性が上昇した。これらのことから、私たちは、BEX2 およびその下流を阻害することができれば、胆管癌の治療感受性を向上させられると考えた。

2. 研究の目的

胆管癌において、BEX2 の役割を、特に静止期との関連性において解析する。

3. 研究の方法

胆管癌細胞株 HuCCT1, RBE は RIKE BioResource Center から分与された。short hairpin RNA あるいは small interfering RNA を用いて BEX2 をノックダウンした。BEX2 過剰発現株は PiggyBac ベクターを用いて樹立した。造腫瘍能は NOG マウス皮下での腫瘍径を測定した。網羅的遺伝子発現解析としてマイクロアレイを実施した。

4. 研究成果

・胆管癌における BEX2 の表現型解析

胆管癌において BEX2 をノックダウンすると、静止期集団の減少・抗癌剤感受性の上昇・造腫瘍能の低下がみられるが、この分子機序を明らかにすることを試みた。

定常状態において、BEX2 は細胞周期の G0 期に高発現することを見いだした。また、血清飢餓状態によって G0 期を誘導すると、BEX2 発現も誘導されることが判明した。

BEX2 は TUFM と会合することが判明した。BEX2・TUFM いずれをノックダウンしてもミトコンドリア酸素消費量 OCR は上昇し、造腫瘍能は低下した。このことから、BEX2 と TUFM は協調してミトコンドリア機能を阻害し、細胞を低エネルギー状態に誘導して、細胞周期を静止期に誘導している可能性が示唆された。

・BEX2 分解経路の同定

BEX2 は E3 複合体である FEM1B-CUL2 と会合することが判明した。実際、BEX2 はユビキチン化され、プロテアソーム阻害剤 MG132 によって分解が抑制され、FEM1B-CUL2 によって分解を受けることを明らかにした。このことから、BEX2 による静止期がん幹細胞の表現型は、FEM1B-CUL2 による分解によって制御されている可能性が示唆された。

・BEX2 転写機構の解析

BEX2 の転写制御を調べたところ、BEX2 上流の部分が転写活性に必要であり、同部位には転写因子 USF2 が結合することが予測され、実際 USF2 によって BEX2 promoter 活性は上昇した。BEX2 の転写制御の一端を明らかにした。

・ヒト胆管癌における BEX2 の発現パターン

組織免疫染色をおこない、ヒト胆管癌 xenograft において、BEX2 と Ki67 の発現が排他的であることが分かった。実際のヒト検体で、BEX2 陽性細胞が非増殖細胞であることを明らかにした。

以上から、BEX2 は胆管癌における静止期癌幹細胞維持に必要な分子であり、治療標的になり得ると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yokoyama Misa, Tanuma Nobuhiro, Shibuya Rie, Shiroki Takeharu, Abue Makoto, Yamamoto Kuniharu, Miura Koh, Yamaguchi Kazunori, Sato Ikuro, Tamai Keiichi, Satoh Kennichi	4. 巻 52
2. 論文標題 Pyruvate kinase type M2 contributes to the development of pancreatic ductal adenocarcinoma by regulating the production of metabolites and reactive oxygen species	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 881-891
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2018.4258	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 Tamai Keiichi, Nakamura-Shima Mao, Shibuya-Takahashi Rie, Kanno Shin-Ichiro, Yasui Akira, Mochizuki Mai, Iwai Wataru, Wakui Yuta, Abue Makoto, Yamamoto Kuniharu, Miura Koh, Mizuma Masamichi, Unno Michiaki, Kawamura Sadafumi, Sato Ikuro, Yasuda Jun, Yamaguchi Kazunori, Sugamura Kazuo, Satoh Kennichi	4. 巻 10
2. 論文標題 BEX2 suppresses mitochondrial activity and is required for dormant cancer stem cell maintenance in intrahepatic cholangiocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21592
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-78539-0	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 Hatsuzawa Yuuri, Yamaguchi Kazunori, Takanashi Tomoka, Sato Ikuro, Tamai Keiichi, Mochizuki Mai, Iwai Wataru, Wakui Yuta, Abue Makoto, Yamamoto Kuniharu, Yasuda Jun, Mizuma Masamichi, Unno Michiaki, Sugamura Kazuo	4. 巻 20
2. 論文標題 CD109 promotes the tumorigenic ability and metastatic motility of pancreatic ductal adenocarcinoma cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pancreatology	6. 最初と最後の頁 493 ~ 500
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pan.2020.01.013	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0件

〔図書〕 計0件

〔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	玉井 恵一 (Tamai Keiichi) (40509262)	地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター (研究所)・がん幹細胞研究部・部長 (81303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------