

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月24日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16561

研究課題名(和文) 胃癌のがん幹細胞を標的とした薬剤耐性獲得の分子機序の解明と新規治療の開発

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism of drug resistance acquisition targeting cancer stem cells of gastric cancer and development of novel treatment

研究代表者

中島 雄一郎 (NAKASHIMA, yuichiro)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：40733564

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)：CD44v9高発現群57例は低発現群147例と比較し、有意に予後不良であった(全生存率 $p=0.001$ 、無病生存率 $p=0.001$)。治療前生検標本におけるCD44v9高発現群14例は低発現群15例と比較し、有意に組織学的治療効果が低かった($p=0.025$)。CD44v9高発現胃癌細胞株(MKN45・NUGC4)においてCD44v9発現をknockdownすると、細胞内のGSH levelの低下とROS levelの上昇を伴い、5-FUに対する薬剤感受性が上昇した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CD44v9発現は癌の浸潤・転移に関わるだけでなく、薬剤の組織学的治療効果と有意に相関していた。細胞株の実験において、CD44v9は細胞内のROSを制御することによって、5-FUの薬剤感受性に影響を与えている可能性がある。以上より、胃癌におけるCD44v9発現は化学療法感受性バイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Gastric cancer patients with CD44v9 high expression (57 cases) showed significantly worse prognosis compared to those with low expression patients (147 cases) (overall survival $p=0.001$, progression free survival $p=0.001$). CD44v9 high expression group also showed significantly lower histological therapeutic response compared to low expression group ($p=0.025$). Knockdown of CD44v9 in gastric cancer cell lines with CD44v9 high expression (MKN45 and NUGC4) increased drug sensitivity to 5-FU with decrease of GSH level and increase of ROS level.

研究分野：消化管外科学

キーワード：CD44v9 癌幹細胞 胃癌 5-FU 薬剤感受性 活性酸素

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景

(1) 消化管癌の集学的治療の成績

胃癌は罹患率では男性で1位、女性で2位、死亡率では男女ともに2位と依然として早急に克服されるべき疾患である。近年の検診の普及に伴い、内視鏡的粘膜切除症例の増加、ピロリ菌の除菌が進められ、今後罹患率、死亡率の減少が見込まれる可能性がある一方で、発症時から高度進行で手術療法施行が不可能もしくは手術療法+術後化学療法では根治が困難な症例も認め、予後も極めて不良であるのが現状である。

近年、このような高度進行症例に対し術前化学療法が行われるようになり、当施設においても九州消化器化学療法研究会(KSCC)の臨床試験に参加し、術前診査腹腔鏡検査にて正確な進行度診断を行い、術前化学療法施行後に胃切除術を施行してきた。本臨床試験の primary end point である病理組織学的奏効割合の検討を行っていく中で、grade 0(無効)から grade 3(完全奏効)の症例や切除標本内に奏効部位、非奏効部位が混在する症例を多く経験し、今後はこれらの症例の術後経過を観察し、病理組織学的奏効割合と予後との関連が明らかになることが見込まれている。

(2) がん幹細胞の探索と治療への応用

がん細胞は部位に依存しない無制限増殖能、浸潤能、転移能をもつ細胞であるが、臨床で遭遇するがんを形成するすべてのがん細胞すべてがこれらの性質を持っているとは限らず、がん細胞の一部が自己複製能や多分化能という幹細胞と同様の性質を持ち、がん組織中で自己複製を繰り返しつつ、分化してがん細胞集団となっていると考えられている。この癌細胞は「がん幹細胞(cancer stem cell)」と呼ばれ、化学療法や放射線などの治療へ抵抗性を示すために残存しやすく、再発・転移の原因となっている可能性があると考えられている(図1)。したがって、がん幹細胞を標的とした治療法を確立することで再発、転移のリスクが少ない新しいがん治療が構築できるものと期待されている。

また、化学療法に対する耐性や奏効後の再燃をきたす原因として、がん幹細胞とニッチ形成さらに上皮間葉移行(EMT)が注目されている(Boroyksi T, et al. Cancer Res.2011;71:634-9)。in vitro の検討ではがん幹細胞の性質をもった side population はその他の population よりも抗癌剤の感受性が低いことが示されており(Schmuck R, et al. Am J Pathol. 2011;178:1702-804)、抗癌剤投与後に細胞形態が間葉細胞様に変化し、細胞死を逃れていることも想定され、その細胞の環境としてニッチが注目されている。しかし、この仮説を検証するための in vivo での検討報告は依然として少なく、術前化学療法施行例に注目した臨床検体における検討は報告されていない。

CD44 は血球細胞、消化管、筋肉、骨格、皮膚に広範に存在する、ヒアルロン酸をはじめとする細胞外マトリックスと結合する接着分子であり、リンパ球活性化、細胞-細胞間接着及び細胞-基質間接着、細胞運動、癌細胞増殖・転移などに深く関与している。

その機能は発現量だけでなく、alternative splicing によるバリエーションの発現や、糖鎖付加やリン酸化といったいわゆる翻訳後修飾によっても制御される(図2)。近年の報告では、CD44 は様々な固形癌におけるがん幹細胞マーカーとして注目されており、その発現意義および機能を解析することは非常に重要であると考えられる。また、CD44 のバリエーションアイソフォーム(CD44v)の発現は、遠隔転移と関連していることが報告されてきた(Hi HQ, et al. Br J Cancer. 2014;110:2011-20)。

(3) 消化管癌における新しい分子標的治療の確立

EGFR に結合し、EGFR を活性化する増殖因子(リガンド)には、EGF, TGF α , Amphiregulin, HB-EGF, Betacellulin, Epiregulin, Epigen の7種類が知られている。正常組織と癌組織ではそれらリガンドの発現のバランスが変化しており、その影響より下流シグナルも影響を受けている可能性が示唆されている。卵巣癌においては、そのEGFR リガンドの一つであるHB-EGFが高発現しており、癌の進行度に応じて発現が増強することを我々は報告している(Tanaka T, et al. Clin Cancer Res. 2005;11:4783-92)。抗癌剤や分子標的治療に関するあらたな耐性機序として non-coding small RNA である microRNA が注目されつつある。miRNA はヒトでは800種類以上が知られており、細胞の老化、発癌、転移などにも関与することが明らかとなっている。miRNA のひとつである miR-214 は PTEN を抑制しがんの悪性化に関与するだけでなく、AKT を活性化しシスプラチンに耐性に関与することが報告されている。

我々は、大腸癌の臨床検体をもちいて、がん幹細胞マーカーとして Lgr5 の発現を確認した。CD44 v9 がシスチントランスポーターxCT と結合し、xCT の細胞膜上での発現を安定化することでシスチンの細胞内取り込みが増大し還元型グルタチオンの生成を促進することが明らかになった(Ishimoto T, et al. Cancer Cell. 2011;19:387-400)。その結果、癌細胞におけるCD44v9 の発現が活性酸素の蓄積を抑制し、腫瘍の増大と治療抵抗性を促進すると考えられた。化学療法や放射線治療により細胞内の活性酸素が上昇し、細胞障害を生じることが予想されており、胃癌においてがん幹細胞マーカーの発現を確認できれば、抗酸化ストレスを介した治療耐性化の機序の解明や感受性の予測が可能となり、がん幹細胞をターゲットとした分子標的治療の開発ができる。現在この点に着目した検討を開始している。

研究期間内に何をどこまで明らかにしようとするのか

胃癌の転移、再発にはがん幹細胞が関与していることが示唆されるが、がん幹細胞を標的とし

た有効な治療は開発されていない。また、切除不能進行癌において主たる治療の化学療法や放射線治療においては、CD44v9 による抗酸化ストレス機構を解明することで、幹細胞を標的とした強力な抗がん作用が期待できることを示している。本研究では難治性消化器癌に対する化学療法・放射線療法耐性とがん幹細胞の発現との関係を明らかにし、がん幹細胞治療を標的とした新たな治療戦略の確立を目指す。

当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義
癌幹細胞を標的とした治療を開発するために、幹細胞の抽出を臨床検体より行い、その EGFR リガンドの違いを原発巣や転移巣、また播種巣との比較で明らかにする。その上で幹細胞特異的なシグナル伝達を明らかとした上で、新しい治療法の構築を行う。
我々が行う予定の検討では、多くの分子標的薬剤が標的としているチロシンキナーゼ膜型レセプターからの細胞内シグナルの検討を行ない、また microRNA の検討から消化器癌における分子標的薬剤の感受性因子を同時に明らかにすることを目的としており、さまざまな分子標的薬剤の感受性予測につながると考えている。

2. 研究の目的

本研究では、胃癌においてがん幹細胞の発現を確認し、化学療法に対して耐性の原因となり得るがん幹細胞を探索し、治療耐性のメカニズムを明らかにする。その上で、薬剤耐性を制御する microRNA の働きを検討し、がん幹細胞治療を標的とした新しい分子標的治療の開発を目指す。

3. 研究の方法

本研究を遂行する上での具体的な工夫

1) 胃癌のがん幹細胞に着目した新しい分子標的の探索

胃癌のがん幹細胞マーカー陽性細胞の抽出

本検討では、胃癌の幹細胞を同定し、細胞内シグナルの状態を確認するとともに、それを利用した治療法の開発を行う。

平成 29 年度

胃癌組織検体を CD44, CD133, LGR5 等で染色し、幹細胞の性質を持った胃癌細胞を同定する。Laser capture microdissection を用い細胞単位で採取し、その他の部位と EGFR リガンドの発現の違いや細胞分裂に関わるチェックポイントキナーゼなどの蛋白群の遺伝子発現の変化を検討する。

胃癌組織検体からフローサイトメトリーを用いて、表面抗原 CD44, CD133 で細胞を分離し同じく、EGFR リガンドの発現の違いや、細胞分裂に関わるチェックポイントキナーゼなどの蛋白群の遺伝子発現の変化を検討する。

cDNA マイクロアレイを用いて、CD44, CD133, LGR5 の発現の違いにより変化してくる miRNA を同定する。

平成 30 年度以降

タンパク電気泳動を 2 次元で行ない、CD44 高発現、低発現で確認される新しいスポットをタンパク質量分析器で同定する。
臨床検体を対象として、免疫組織化学染色、もしくはウェスタンブロットングを用いて上記の結果を確認する。

2) 胃癌におけるがん幹細胞の Sphere Formation Assay を用いた薬剤感受性試験

CD44v (CD44 バリエーション) 抗体を用いて、消化管がん細胞に高頻度で発現している細胞をセルソーターを用いて検出し、Sphere Formation Assay を用い、in vitro での解析を行う。さらにマウスにおける転移モデルを作成し、薬剤の治療効果を確認する。

平成 29 年度

胃癌細胞株を用いて、CD44v 抗体による染色を行い、CD44v が発現している細胞をセルソーターを用いて検出分離する。

がん幹細胞の特性である腫瘍形成能を利用し、がん幹細胞の高濃縮群の細胞を低吸着 plate に播種・培養。スフィア形成を確認する。

薬剤投与を行い、スフィア数の減少により、薬剤のがん幹細胞 (CSC) への作用効果を定量する。

平成 30 年度以降

マウス移植片における検討

がん幹細胞の高濃縮群細胞をマウスに尾静注し肺転移モデルを作製する。

マウスにヒト胃癌細胞を同所性移植し、肝転移モデルを作製する。このモデルで発生した肝転移の EGFR リガンド、PTEN の発現状況や AKT のリン酸化状態を原発と比較検討する。

CRM197 の抗癌剤併用試験

EB-EGF を高発現した癌を移植した担癌マウスに CRM197 を投与して、癌に対する感受性を検討する。5-FU, CDDP, タキサン系薬剤、塩酸イリノテカンなどとの併用効果を検討する。

3) 分子標的薬の感受性因子

上記の結果が得られた後は、データベースを基にさまざまな臨床病理学的因子と対比し、さら

に化学療法や放射線療法の感受性を実際の症例の治療経過をもとに解析することが可能でそれらの結果を臨床での治療戦略構築へと応用していく。

平成 30 年度以降

臨床試験サンプルによる検討

臨床試験において抗癌剤に対する感受性、抵抗性が明確に診断された胃癌患者由来組織検体において活性化あるいは不活化される microRNA プロファイルを miRNA アレイにより取得する。その中から感受性あるいは抵抗性を規定するクリティカルパスとなる miRNA 群をクラスタリング解析等のバイオインフォマティクス技術により同定する。さらにそれら同定された miRNA 群の抗癌剤感受性因子としての詳細なキャラクタリゼーションを実施し、診断薬プロトタイプを確立する。

miRNA ファイルデータの有効性の証明

抽出された miRNA に関して、測定対象とした組織中の RNA の発現及び活性化を組織染色、DNA チップ、リアルタイム PCR、ウェスタンブロット法による解析を行ない、miRNA アレイにより取得された特異的活性化プロファイルデータの有効性を証明する。また、抗癌剤を作用させた時の癌組織中、癌細胞中の miRNA プロファイルの経時変化を追跡することにより、抗癌剤感受性における機能解析の面からキャラクタリゼーションを行なう。それらの詳細なキャラクタリゼーションを通して miRNA プロファイルの抗癌剤感受性因子としての重要性を証明し、それらを用いた抗癌剤感受性診断薬のプロトタイプを確立する。

4 . 研究成果

(1) CD44v9 高発現群 57 例(27.9%)は低発現群 147 例(72.1%)と比較し、有意に T3 以深(p=0.0034)、リンパ管侵襲(p=0.0007)、静脈侵襲(p=0.0281)、リンパ節転移(p=0.0411)、遠隔転移(p=0.0077)を多く認め、予後不良であった(全生存率 p=0.0013,無病生存率 p=0.0014)。治療前生検標本における CD44v9 高発現群 14 例(48.3%)は低発現群 15 例(51.7%)と比較し、有意に組織学的治療効果が低かった(p=0.0253)。

(2) CD44v9 高発現胃癌細胞株(MKN45・NUGC4)において CD44v9 発現を knockdown すると、5-FU に対する薬剤感受性が上昇する傾向にあった。また CD44v9 発現を knockdown すると、細胞内の GSH level が有意に低下し(MKN45 p=0.0001, NUGC4 p=0.0252)、5-FU 投与による ROS level が有意に上昇した(MKN45 p=0.0002, NUGC4 p=0.0047)。

CD44v9 発現は癌の浸潤・転移に関わるだけでなく、薬剤の組織学的治療効果と有意に相関していた。細胞株の実験において、CD44v9 は細胞内の ROS を制御することによって、5-FU の薬剤感受性に影響を与えている可能性がある。以上より、胃癌における CD44v9 発現は化学療法感受性バイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 第 28 回日本消化器癌発生学会総会

胃癌における CD44v9 の発現と化学療法感受性バイオマーカーとしての意義についての検討

2017 年 11 月 17 日-18 日、熊本(メルパルク熊本)

城後 友望子、沖 英次、工藤 健介、中西 良太、久保 信英、安藤 幸滋、中島 雄一郎、椛島 章、佐伯 浩司、小田 義直、前原 喜彦

2. 第 90 回日本胃癌学会総会

Clinical significance of CD44v9 expression as biomarker for chemotherapy in gastric cancer

2018 年 3 月 7 日-3 月 9 日、横浜(パシフィコ横浜)

城後 友望子、沖 英次、枝廣 圭太郎、是久 翔太郎、谷口 大介、工藤 健介、中西 良太、久保 信英、安藤 幸滋、中島 雄一郎、佐伯 浩司、小田 義直、前原 喜彦

3. 第 51 回制癌剤適応研究会

胃癌における CD44v9 の発現と化学療法感受性バイオマーカーとしての意義についての検討

2018 年 3 月 23 日、下呂(下呂温泉 水明館)

城後 友望子、沖 英次、工藤 健介、中西 良太、久保 信英、安藤 幸滋、中島 雄一郎、佐伯 浩司、小田 義直、前原 喜彦

4. 第 118 回日本外科学会定期学術集会

胃癌における CD44v9 の発現と薬剤感受性マーカーとしての意義についての検討

2018 年 4 月 5 日-4 月 7 日、東京(東京国際フォーラム)

城後 友望子、沖 英次、川副 徹郎、家守 智大、春田 泰宏、藤本 禎明、松岡 弘也、佐々木 駿、

廣瀬 皓介、是久 翔太郎、谷口 大介、枝廣 圭太郎、工藤 健介、中西 良太、久保 信英、安藤 幸滋、中島 雄一郎、佐伯 浩司、小田 義直、前原 喜彦

5. 第 27 回 日本がん転移学会 学術集会・総会

胃癌とリンパ節転移巣におけるがん幹細胞マーカーCD44v9 の発現の検討

2018 年 7 月 19 日-7 月 20 日、横浜（ホテル メルパルク横浜）

城後 友望子、沖 英次、佐々木 駿、廣瀬 皓介、中西 良太、久保 信英、安藤 幸滋、中島 雄一郎、佐伯 浩司、小田 義直、前原 喜彦

6. 第 29 回日本消化器癌発生学会総会

胃癌における CD44v9 の発現と薬剤感受性バイオマーカーとしての意義についての検討

2017 年 11 月 16 日-11 月 17 日、東京（都市センターホテル）

城後 友望子、沖 英次、佐々木 駿、廣瀬 皓介、胡 慶江、津田 康雄、安藤 幸滋、中島 雄一郎、佐伯 浩司、小田 義直、前原 喜彦

7. 第 119 回日本外科学会定期学術集会

2019 年 4 月 18 日-4 月 20 日、大阪（大阪国際会議場、リーガロイヤルホテル大阪）

胃癌における CD44v9 の発現意義についての検討

城後 友望子、沖 英次、川副 徹郎、家守 智大、春田 泰宏、藤本 禎明、松岡 弘也、佐々木 駿、廣瀬 皓介、胡 慶江、津田 康雄、安藤 幸滋、中島 雄一郎、佐伯 浩司、小田 義直、吉住 朋晴

〔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：

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：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。