

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07337

研究課題名(和文)大腸がん幹細胞の安定維持・可塑性制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the regulation mechanisms of colorectal cancer stem cell maintenance and plasticity

研究代表者

馬島 哲夫 (MASHIMA, Tetsuo)

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター 分子生物治療研究部・主任研究員

研究者番号：30311228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：大腸がん幹細胞において、その安定維持にポリ(ADPリボース)ポリメラーゼ・ファミリーの一つタンキラーゼが関わることを見出した。また、タンキラーゼの下流において、AXINによる制御を介した受容体型チロシンキナーゼc-KITの発現制御が、がん幹細胞維持に重要な役割を果たすことを明らかにした。タンキラーゼを標的としたがん幹細胞分画の抑制は、化学療法の効果を増強するための新たな戦略となりうることを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬物療法初期の治療抵抗性に関わるとされるがん幹細胞の安定維持や可塑性制御に寄与する新たな分子経路が見出された。また同経路を標的とする新たな分子標的薬剤が明らかになり、大腸がんの治療抵抗性や再発を抑えるための新しい方法が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We identified tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase member, as a mediator of colorectal cancer stem cell maintenance. Furthermore, we showed that the AXIN-dependent regulation of c-KIT tyrosine kinase expression is a critical step in the cancer stem cell maintenance downstream of tankyrase. These data suggest that the inhibition of cancer stem cell fraction by targeting tankyrase could be a new strategy to enhance the effect of cancer chemotherapy.

研究分野：がん分子標的治療

キーワード：がん幹細胞 可塑性 大腸がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんは本邦における死亡原因の第一位を占め、患者数も増加の一途を辿る。進行がん治療では薬物療法が行われるが、治療抵抗性が大きな問題となる。腫瘍組織を構成するがん細胞には多様性があり、これが治療抵抗性や再発に深く関与することが近年、示されてきた。特にこのがん細胞多様性の要因として、腫瘍組織内にあり、高い自己複製能と分化能をもつがん幹細胞の存在が明らかにされてきた。がん幹細胞は、非がん幹細胞へと変化し、階層性ある腫瘍細胞集団を再構成するとされる。ただし最近では、その形質変化は必ずしも一方向的でなく、がん幹細胞と非幹細胞の間の相互変換性(可塑性)があることも報告されている。こうしたがん幹細胞と非幹細胞間に存在する可塑性は、腫瘍組織内の細胞の流動性や多様性を生じ、悪性形質の獲得の要因となり、がんの根治を妨げる。従って、がんの根治のためには、がん幹細胞を除去するのみでなく、がん幹細胞と非幹細胞との間の相互変換性を絶ち、両者の平衡状態を非がん幹細胞側に向かわせることが、必要と考えられる。これまで内外において、がん幹細胞の生存因子に関する研究は広く進められてきた。しかし、がん幹細胞の可塑性がどのような機序で制御されているか、については、分子機序に関する知見は乏しい。

2. 研究の目的

本研究課題では、がん幹細胞がどのような分子機序で安定に維持されるのか、またその維持機構を抑制することにより腫瘍退縮に向かわせることができるのか、を中心の問いに据える。すなわち、がん幹細胞の安定維持性やその可塑性の制御を司る分子機序を明らかにする。さらに同定された分子を抑制することによる治療効果を検証する。

3. 研究の方法

ヒト大腸がん細胞において、細胞膜表面蛋白質CD44陽性の細胞分画は、がん幹細胞の性質を示す。このがん幹細胞には可塑性が存在することが示唆された。そこで、本研究課題では、これら形質安定性の異なるがん幹細胞クローンを分離し、遺伝子発現解析とRNAi/化合物スクリーニングを統合的に進め、がん幹細胞の安定維持性やその可塑性の制御を司る分子を同定する。同定された因子については、阻害剤やshRNA、CRISPR-Cas9などを用いた機能喪失試験による検討を行い、がん幹細胞性の維持や可塑性制御への寄与やそのシグナル伝達経路を明らかにする。また同因子の抑制が制がん剤の作用を増強するかをマウス移植腫瘍モデルにより検証する。

4. 研究成果

ヒト大腸がん細胞株において、細胞表面蛋白質CD44陽性細胞は、CD44陰性細胞に比べ、がん幹細胞の性質である高い腫瘍形成能を示し、またLgr5をはじめとする幹細胞関連遺伝子群を高発現した。また、CD44陽性、陰性細胞を分離後に、継続培養すると、陽性から陰性、陰性から陽性細胞への変換性(可塑性)が観察されるが、特に、がん幹細胞性を示すCD44陽性細胞には、長期間安定に形質維持される細胞、及び、CD44陰性細胞への変換性が高い細胞が存在した。遺

伝子発現解析に加え、シグナル伝達因子阻害剤ライブラリーおよびsiRNA/shRNAライブラリーを用いた機能スクリーニングを進めた結果、CD44陽性のがん幹細胞分画の生存維持により選択的に寄与する分子として、ポリ(ADPリボース)ポリメラーゼ・ファミリーの一つタンキラーゼが見出された。タンキラーゼ阻害剤は、AXIN 2の蓄積を介し、CD44陽性がん幹細胞の増殖を選択的に抑制し、また制がん剤イリノテカンとの併用により、強い腫瘍増殖抑制効果を示した。タンキラーゼ阻害剤は、CD44陽性細胞において、細胞表面に発現する受容体型チロシンキナーゼc-KITの発現を強く抑制した。ノックアウト細胞の樹立とその解析から、c-KITは、CD44陽性細胞のがん幹細胞性の安定維持に重要な役割を果たすことを示した。さらに、c-KITノックアウト細胞の遺伝子発現解析から下流のシグナル分子経路を推定した。以上の解析により、大腸がん幹細胞の形質維持におけるタンキラーゼ/c-KIT経路の関与が明らかになった。また同分子経路を抑制することにより、制がん剤の治療効果増強が得られることが明らかになった。

本研究により、大腸がんを構成するがん細胞の不均一性の生成において、がん幹細胞とその可塑性が寄与することが再確認された。また、その制御分子経路を標的とした新たな薬物療法の有効性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9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 Kawakami R, Mashima T, Kawata N, Kumagai K, Migita T, Sano T, Mizunuma N, Yamaguchi K, Seimiya H	4. 巻 111
2. 論文標題 ALDH1A3-mTOR axis as a therapeutic target for anticancer drug-tolerant persister cells in gastric cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 962-973
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14316	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 Jang MK, Mashima T, Seimiya H	4. 巻 19
2. 論文標題 Tankyrase Inhibitors Target Colorectal Cancer Stem Cells via AXIN-Dependent Downregulation of c-KIT Tyrosine Kinase.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Cancer Ther	6. 最初と最後の頁 765-776
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1535-7163.MCT-19-0668	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 Mashima T, Iwasaki R, Kawata N, Kawakami R, Kumagai K, Migita T, Sano T, Yamaguchi K, Seimiya H	4. 巻 121
2. 論文標題 In silico chemical screening identifies epidermal growth factor receptor as a therapeutic target of drug-tolerant CD44v9-positive gastric cancer cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Br J Cancer	6. 最初と最後の頁 846-856
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41416-019-0600-9	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 Sueoka E, Watanabe T, Mashima T, Shirakami Y, Komori A, Matsuo K, Yoshikawa HY, Cho KA, Park TJ, Seimiya H, Kim EG, Suganuma M, Chung J	4. 巻 145
2. 論文標題 Meeting report of the 14th Japan-Korea joint symposium on cancer and aging research: current status of translational research and approaches to precision medicine.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Cancer Res Clin Oncol	6. 最初と最後の頁 1263-1271
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00432-019-02887-2.	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 Suenaga M, Wakatsuki T, Mashima T, Ogura M, Ichimura T, Shinozaki E, Nakayama I, Osumi H, Ota Y, Takahari D, Chin K, Seimiya H, Yamaguchi K	4. 巻 38
2. 論文標題 A phase I study to determine the maximum tolerated dose of trifluridine/tipiracil and oxaliplatin in patients with refractory metastatic colorectal cancer: LUPIN study. Suenaga M, Wakatsuki T, Mashima T, Ogura M, Ichimura T, Shinozaki E, Nakayama I, Osumi H, Ota Y, Takahari D, Chin K, Seimiya H, Yamaguchi K	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Invest New Drugs	6. 最初と最後の頁 111-119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10637-019-00749-9	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 Matsusaka S, Hanna DL, Ning Y, Yang D, Cao S, Berger MD, Miyamoto Y, Suenaga M, Dan S, Mashima T, Seimiya H, Zhang W, Lenz HJ	4. 巻 111
2. 論文標題 Epidermal growth factor receptor mRNA expression: A potential molecular escape mechanism from regorafenib.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 441-450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14273	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 Osumi H, Shinozaki E, Mashima T, Wakatsuki T, Suenaga M, Ichimura T, Ogura M, Ota Y, Nakayama I, Takahari D, Chin K, Miki Y, Yamaguchi K	4. 巻 109
2. 論文標題 Phase II trial of biweekly cetuximab and irinotecan as third-line therapy for pretreated KRAS exon 2 wild-type colorectal cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 2567-2575
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10637-019-00749-9	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 Suenaga M, Schirripa M, Cao S, Zhang W, Yang D, Ning Y, Cremolini C, Antoniotti C, Borelli B, Mashima T, Okazaki S, Berger MD, Miyamoto Y, Gopez R Jr, Barzi A, Lonardi S, Yamaguchi T, Falcone A, Loupakis F, Lenz HJ	4. 巻 17
2. 論文標題 Gene Polymorphisms in the CCL5/CCR5 Pathway as a Genetic Biomarker for Outcome and Hand-Foot Skin Reaction in Metastatic Colorectal Cancer Patients Treated With Regorafenib.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clin Colorectal Cancer	6. 最初と最後の頁 e395-e414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clcc.2018.02.010	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 Tomizawa F, Jang MK, Mashima T, Seimiya H	4. 巻 527
2. 論文標題 c-KIT regulates stability of cancer stemness in CD44-positive colorectal cancer cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 1014-1020
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.024	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12件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Tetsuo Mashima, Risa Iwasaki, Ryuhei Kawakami, Koshi Kumagai, Toshiro Migita, Takeshi Sano, Kensei Yamaguchi, Hiroyuki Seimiya
2. 発表標題 EGFR inhibitors suppress drug-tolerant CD44v+ gastric cancer cell growth and enhance the antitumor effect of irinotecan
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 Jang MK, Mashima T, Seimiya H
2. 発表標題 Tankyrase Inhibitors target colorectal cancer stem-like cells through an AXIN-dependent mechanisms
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 馬島哲夫, 岩崎里紗, 川上隆兵, 清宮啓之
2. 発表標題 EGFR阻害剤は胃がん薬剤抵抗性に寄与するCD44v発現細胞の増殖を抑制し、イリノテカンの治療効果を増強する
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 張明きゅ、馬島哲夫、清宮啓之
2. 発表標題 タンキラーゼ阻害剤による大腸がん幹細胞の増殖抑制とその分子機序
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬島哲夫、岩崎里紗、川上隆兵、清宮啓之 他
2. 発表標題 胃がんの薬剤耐性に寄与するCD44v陽性細胞を標的とする化合物のin silico探索
3. 学会等名 第22回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tetsuo Mashima, Myungkyu Jang, Hiroyuki Seimiya
2. 発表標題 Targeting colorectal cancer stem-like CD44-positive cells by tankyrase inhibitors
3. 学会等名 14th Japan-Korea Joint Symposium on Cancer and Aging Research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tetsuo Mashima, Risa Iwasaki, Koshi Kumagai, Ryuhei Kawakami, Takeshi Sano, Kensei Yamaguchi, Hiroyuki Seimiya
2. 発表標題 In silico screening for agents targeting drug-tolerant CD44v-positive cells in patient-derived gastric cancer.
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 Tetsuo Mashima, Hiroyuki Seimiya
2. 発表標題 Targeting colorectal cancer stem cells by tankyrase inhibition
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tetsuo Mashima, Ryuhei Kawakami, Koshi Kumagai, Toshiro Migita, Takeshi Sano, Kensei Yamaguchi, Hiroyuki Seimiya
2. 発表標題 ALDH1A3 as a marker and therapeutic target for residual gastric cancer cells after anticancer drug treatment.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomizawa F, Jang MK, Mashima T, Seimiya H
2. 発表標題 c-KIT maintains CD44-positive colorectal cancer stem cells.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森野峻、馬島哲夫、吉田稔、清宮啓之
2. 発表標題 shRNAスクリーニングによる大腸がん幹細胞の新規治療標的分子の探索
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会学術会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 富澤文弥、張明キュ、馬島哲夫、清宮啓之
2. 発表標題 受容体型チロシンキナーゼc-KITによる大腸がん幹細胞性の維持
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会学術会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 清宮啓之 編	4. 発行年 2019年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 324
3. 書名 進化するがん創薬	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------