

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14589

研究課題名(和文) 治療抵抗性の高い癌幹細胞亜集団を標的にした新規癌治療戦略の確立

研究課題名(英文) The treatment strategy for highly therapy resistant subfractions of cancer stem cells

研究代表者

西川 晋平 (Shimpei, Nishikawa)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：90730565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：犬の乳腺腫瘍は、最も発生の多い犬の腫瘍の一つであるが、切除不能な犬乳腺腫瘍に対する有効な治療選択肢は少ない。本研究では、犬乳腺腫瘍細胞株における無血清低接着環境下、また抗癌剤存在下での癌幹細胞マーカー発現状況、および網羅的な表面抗原解析による発現状況の検討を行い、犬乳腺腫瘍細胞株中には不均質な発現を示す表面抗原が複数存在、また抗癌剤暴露や無血清低接着培養により表現型が変化することが判明した。今後、犬臨床サンプルを用いた分子の発現状況の検討、造腫瘍能等の機能的解析を検討し、治療ターゲットとして有用な癌幹細胞マーカーの同定、創薬応用を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

浸潤・転移により切除不能な犬乳腺腫瘍に対して有効性の高い治療法はないのが現状である。近年、癌組織中に「癌幹細胞」が存在し、治療抵抗性等に関与することが、人間におけるほとんど全ての悪性腫瘍において知られている。犬乳腺腫瘍においても癌幹細胞の存在を示唆する報告が相次いでいる。本研究では、犬乳腺腫瘍幹細胞の治療ターゲットとなり得るマーカーを複数同定することができた。今後の創薬応用への展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Mammary gland tumor (MGT) is one of the most common neoplastic disease in both dogs and humans. However, therapeutic options are limited for advanced unresectable metastatic MGTs. Cancer stem cells (CSCs) have been reported to be one of the mechanism of therapeutic resistance of dog MGTs (dMGTs). However, detailed mechanism(s) of therapeutic resistance of CSCs in dMGTs is not fully understood. To elucidate the therapeutic resistance mechanism(s) of dMGTs, the screening of surface markers expression using cell lines of dMGTs was performed. The expressions of several candidate markers were detected in dMGT cell lines under adherent and sphere culture conditions, and under the presence of chemotherapeutic agent doxorubicin by using flow cytometry. Several markers showed significantly higher expression after exposure to doxorubicin. The markers identified in the screening are now further analyzed for function in therapeutic resistant CSCs of dMGTs.

研究分野：腫瘍学

キーワード：癌幹細胞 犬 伴侶動物 乳腺腫瘍 乳癌 比較腫瘍学 抗癌剤 表面抗原

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

犬の乳腺腫瘍は、最も発生の多い犬の腫瘍の一つである。手術切除により治癒も期待できるが、遠隔転移のある手術不能な進行再発乳腺腫瘍に関しては治療が困難である。具体的には、トセラニブ等の分子標的薬を含めた様々な抗癌剤による延命が試みられているものの、病巣が縮小するような奏効は一般的でなく、その有効性は限定的である。乳腺腫瘍に限らず、悪性腫瘍罹患犬が原疾患である腫瘍とその転移を原因として死亡する現状はほとんど改善していない。人乳癌においては、ホルモン療法や分子標的薬による生存期間の延長が知られているものの、長期間を経ての転移や再発などの問題は解決していない。抗癌剤治療に関しては、治療開始当初は腫瘍の縮小が得られていたとしても、いずれ治療に対する反応性が悪くなり、腫瘍の増大を抑えきれなくなる、治療抵抗性が生じることが知られており、根治的とはいえないのが現状である。

近年、癌は癌組織中に存在する少数の「癌幹細胞」によって形成・維持されていることがほとんどの悪性腫瘍において報告されている。

ヒト正常骨髄、あるいはヒト急性骨髄性白血病(AML)の患者骨髄中のLin-CD34+CD38-の未分化な細胞集団を、それぞれ、細胞の表面マーカーを利用するフローサイトメトリー法により分離し、免疫不全であるSCIDマウスに対して移植する。そうすると、ヒト正常骨髄からはヒト造血系を構成する種々の細胞が作り出されるのに対し、AML患者骨髄からは表面マーカー上も様々な分化度の白血病細胞が再現される(図1、Nature, 1994)。これらの現象はそれ以外の細胞集団(Lin+やCD34-, CD38+)では極めて低い頻度でしか見られない。両細胞群の分離操作法がほぼ同一であることを考えると、表面マーカー上は正常造血幹細胞に近い細胞がAMLを作り出していることが示唆される。

この報告を端緒に、研究代表者らによる人の胃癌、肝細胞癌、横紋筋肉腫等での報告も含め、現在ではほぼ全ての腫瘍性疾患においてマウスへの移植実験を用いた癌幹細胞の存在が報告されている。

しかしながら近年、正常幹細胞と同様に、抗癌剤投与後に生存する癌幹細胞は、癌幹細胞中のごく一部として存在する治療抵抗性癌幹細胞(図2)であることが示唆されてきている(Cell Stem Cell, 2014、Science, 2013、J Clin Invest, 2010)。

マウス正常造血幹細胞には大きく2つの集団があり、活発に分裂を行うことでより分化した細胞を産生している集団(activated stem cells)と、細胞周期がG0期にある分裂を休止した状態で維持されている集団(dormant stem cell)があることが知られている。正常個体に5FUなどの抗がん剤を投与すると、約1週間後を最低値とした白血球減少を認めるが、これはactivated stem cellsおよび骨髄芽球が抗癌剤に高い感受性を示すためである。その後、抗癌剤や放射線に抵抗性のdormant stem cellが細胞分裂を開始することで造血が再開、白血球が補充され、マウスは生存する。このように、普段細胞分裂を行わない造血幹細胞が緊急時の予備として保存されていると考えられる。

しかしながら、インターフェロン α 等を投与することでdormant stem cellの増殖を促した状態で抗癌剤を投与すると、造血幹細胞は死滅・枯渇し、結果、白血球減少症からマウスが死亡することが知られている(Nature, 2009)。マウスおよび人における癌幹細胞においても同様の現象、すなわち細胞周期の停止等の機構により抗がん剤や放射線のような治療に高い耐性を示す細胞が癌幹細胞の一部(治療抵抗性癌幹細胞)として存在することが少しずつ報告されている(図2、Cell Stem Cell, 2014、Science, 2013、J Clin Invest, 2010)。

治療ターゲットとして重要であると考えられる「治療抵抗性癌幹細胞」であるが、犬の悪性腫瘍において癌幹細胞の中の不均質性を治療抵抗性の観点から検討し、「治療抵抗性癌幹細胞」の存在を報告はまだ存在しない。

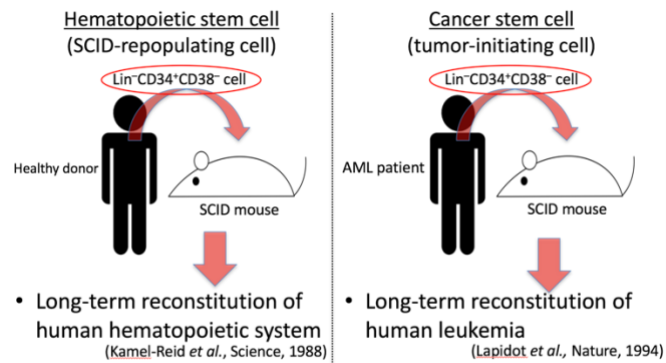


図1.正常幹細胞と癌幹細胞



図2. 癌幹細胞における不均質性

2. 研究の目的

犬における切除不能進行再発乳腺腫瘍における治療法は限られており、生存期間の延長・QOLの向上を得るためには新規治療法の開発が必要不可欠である。犬乳腺腫瘍における治療抵抗性に癌幹細胞が関与しているかどうか、現在不明な点が多い。よってこの研究の目的は、犬乳腺腫瘍幹細胞の中に存在が想定される治療抵抗性癌幹細胞を同定・解析し、新規治療法につづるための基礎知見を得ることである。

3. 研究の方法

犬乳腺腫瘍における癌幹細胞を同定可能なマーカーを探るため、犬乳腺腫瘍由来細胞株9種類 (CHMm5b、CHMm13a、CHMm、CHMp、CIPm、CIPp、CNMm、CTBm、CTBp) を用いた。細胞の接着培養はRPMI1640 (Wako)に牛胎児血清(ニチレイ)、penicillin / streptomycin、amphotericin Bを添加し、37°C、5%CO₂環境下にて行った。スフェア培養にはDMEM/Ham's F12 (Wako)に20 ng/ml mouse EGF (Biologend)、20 ng/ml mouse basic FGF (Biologend)、penicillin / streptomycin (Nakarai)、amphotericin Bを添加し、Low attachment plate (Corning) を用いて37°C、5%CO₂環境下にて行った。フローサイトメトリー法による細胞の解析は、CD44 蛍光標識抗体 (clone:IM7, Biologend)、LEGENDScreen HumanPE kit (Biologend) を用いて細胞を染色、AccuriC6 (BD), SH800 (SONY), FACS ARIA III (BD), NovoCyte (ACEA Biosciences) を用いてデータの取得を行った。フローサイトメトリーデータの解析は、Flowjo software version 10 (BD) を用いた。Cell viability は、Cell Counting Kit-8 (Dojindo) を用い、Epoch microplate spectrophotometer (BioTek Instruments) を用いて吸光度を測定した。統計解析は、GraphPad Prism 8 を用い、unpaired Student's t test にて p<0.05 を有意とみなした。

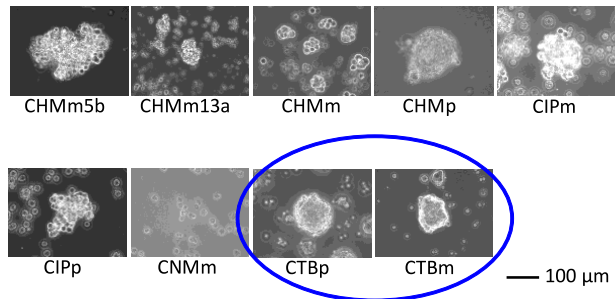


図3 犬乳腺腫瘍細胞株のスフェア培養

4. 研究成果

無血清低接着環境下でのスフェア培養は、癌幹細胞を濃縮する効果があるとされる。9種類の犬乳腺腫瘍細胞株をスフェア培養したところ、CTB-PおよびCTB-M細胞株において特に明瞭なスフェア形成がみられた(図3)。このため、その後の解析は主にCTB-PおよびCTB-M細胞株に関して行った。抗癌剤(ドキシソルビシン)を添加した状態でCTB-PおよびCTB-M細胞株を培養し、48時間後においてcell viabilityを検査すると、dose-dependentな細胞死が認められた(図4)。また、ドキシソルビシン存在下(50ng/ml)での48時間培養を行い、CD44などの癌幹細胞マーカーを含め、361種類の表面抗原の発現変動をフローサイトメトリー法を用いて検討した。その結果、82種類の表面抗原が抗癌剤暴露以前から1%以上の陽性を示し、16種類が抗がん剤暴露後に高い発現を示した(図5)。これら16種類の表面抗原のうち、7種類は抗癌剤暴露前から発現していたものの発現増強、残り9種類は陰性からの陽転であった(図5)。犬乳腺腫瘍における抗癌剤暴露前後の網羅的な表面抗原解析を行った報告は世界初であり、今後、それぞれの表面抗原マーカーの機能、それによって同定される細胞集団の癌幹細胞性、治療抵抗性との関係に関して解析を進める予定である。

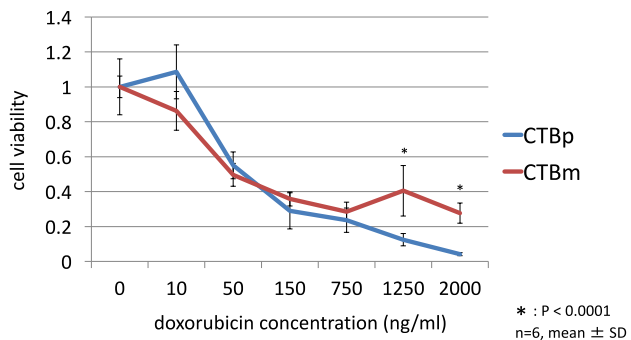


図4.抗癌剤暴露後の細胞生存

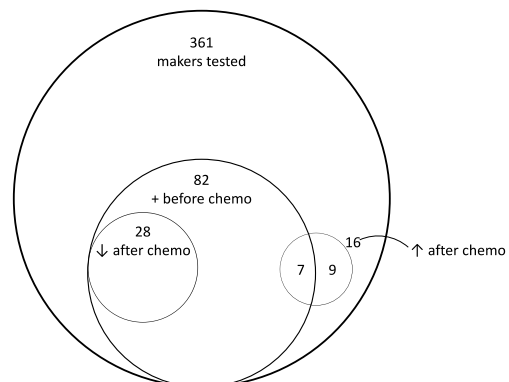


図5.抗癌剤暴露前後の表面マーカー発現変動

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 ITOH Harumichi, NISHIKAWA Shimpei, TANI Kenji, SUNAHARA Hiroshi, NAKAICHI Munekazu, ISERI Toshie, TAURA Yasuho, ITAMOTO Kazuhito	4. 巻 82
2. 論文標題 Cystine transporter expression is a marker to identify a subpopulation of canine adipose-derived stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 713～720
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.19-0373	査読の有無 無
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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shimpei Nishikawa
2. 発表標題 Biological characterization of cancer stem cells canine mammary gland neoplasms
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 Shimpei Nishikawa
2. 発表標題 Surface marker expression analysis of canine mammary gland tumor cells
3. 学会等名 The 8th Annual Congress of Asian Society of Veterinary Surgery（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shimpei Nishikawa
2. 発表標題 Biological characterization of cancer stem cells in canine mammary gland tumor
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

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