

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16313

研究課題名(和文) 難治性大腸癌のPDXモデルを用いた薬剤耐性に関わる新規バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Real-time imaging and PDX based treatment strategy for poor-prognosis mesenchymal-type colorectal cancer

研究代表者

矢野 修也 (Yano, Shuya)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：50794624

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)：EMTバイオセンサーで間葉型EMT能力を有する大腸癌を抽出した。間葉型大腸癌はEMTにより化学療法に抵抗し、化学療法が終了するとMETで元に戻る可塑性を有していた。化学療法中のみ上昇するEMTマーカー群を抽出した。これらはEMT阻害剤で抑制された。殺細胞剤とEMT阻害剤は間葉型大腸癌の治療戦略として適していた。EMTマーカーで間葉型大腸癌PDXモデルを作成した。PDXマウスモデルでも化学療法中にEMTマーカーが上昇し抵抗性を示し、EMT阻害剤でEMTが抑制された。EMTリアルタイムイメージングと間葉型大腸癌PDXモデルを用いる事で予後不良間葉型大腸癌への新しい治療戦略を構築が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界的な大腸癌の遺伝子変異、遺伝子発現により分子サブタイプは決定したが、予後不良間葉型大腸癌に対し期待されたほど治療戦略は定まらなかった。これは保存された試料だけでは間葉型大腸癌の本態に迫れないからである。これらを克服するため、EMTイメージングを用いた動的な解析と患者由来組織片(PDX)マウスモデルで実際の臨床を模倣した独自の評価モデルを構築した。我々のイメージング技術とPDXモデルを用いると、予後不良間葉型大腸癌は殺細胞剤では逆にEMTを惹起して抵抗性になるため、EMT阻害薬と殺細胞剤の併用療法が新しい治療戦略となることが示された。また、この解析系は他臓器固形腫瘍にも応用可能である。

研究成果の概要(英文)：The latest subtypes of colorectal cancer (CRC) indicates that mesenchymal-type (M-type) CRC has the poorest prognosis. M-type CRC cells has epithelial-mesenchymal plasticity (EMP). However, it is difficult to monitor in real time dynamic EMP. Here, using a reversible EMT-MET biosensor, we demonstrated that only M-type CRC has instinct EMP. Time-lapse real-time imaging demonstrated M-type CRC cells survive chemotherapy and then they returned to E-state after cessation of chemotherapy. In contrast, inhibition of EMP by EMT inhibitors sensitized M-type CRC cells to chemotherapy. Furthermore, patient-derived xenograft (PDX) from M-type CRC also had EMP, which worked during chemotherapy. In contrast, EMP of PDX was easily inhibited by EMT inhibitors. Thus, real-time imaging and PDX model indicates that inhibition of EMP of is an Achilles' heel for poor-prognosis M-type CRC, thus would be one of the most effective strategies for precision medicine.

研究分野：癌の分子イメージング

キーワード：大腸癌 上皮間葉転換 分子イメージング 患者由来腫瘍組織片

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プレジジョンメディシンとは各種悪性腫瘍の分子サブタイプに応じた治療戦略である。大腸癌での分子サブタイプは、遺伝子発現の特性に基づく Consensus Molecular Subtypes (CMS1-4) が提唱され、実臨床への応用が期待されている。免疫型 CMS1 はマイクロサテライト不安定性型 MSI-H 型で免疫チェックポイント阻害薬が著効するサブタイプ、高分化型腺癌で KRAS 野生型の CMS2、KRAS 変異型の CMS3 は比較的予後が良く従来の治療法が効果的なサブタイプ、一方 CMS4 は間質が多く上皮間葉転換(EMT)能力を有する癌細胞からなるサブタイプで最も予後不良と判明した。

しかし、予後不良 CMS4 の化学療法における耐性機序や、奏功・耐性予測マーカーの確立に関する知見はいまだ乏しい。その理由としては、間葉型 CMS4 大腸癌は、腫瘍内で癌細胞よりも間質の方が多いため癌細胞と間質との相互作用が重要で、さらに間葉型大腸癌細胞がいつどのような状況で上皮間葉転換(EMT)を起こすかをモニタリングすることが必要であるが、従来の方法では本来の間葉型大腸癌モデルの作成が困難であった。

申請者は、癌のイメージング技術を用い腫瘍不均一性や薬剤耐性メカニズムの解明を試み、また患者由来腫瘍組織を移植したマウスモデル(Patient-Derived Xenograft: PDX)を用いて前臨床モデルの開発を行ってきた。また、我々の研究室では、リアルタイムに E-M の状況をイメージング出来る EMT 可視化バイオセンサーを世界で初めて開発した。

癌細胞と間質の相互作用が保全されている PDX マウスモデルと、EMT をリアルタイムモニタリング出来る EMT バイオセンサーを用いる事により間葉型 CMS4 大腸癌の解明に迫る事が出来ると仮説をたてた。

2. 研究の目的

予後不良な間葉型 CMS4 大腸癌組織由来の PDX モデルと、我々が独自開発した EMT 可視化 CMS4 大腸癌細胞株モデルを用い、間葉型 CMS4 大腸癌の薬剤耐性のメカニズムと新たな治療戦略の構築を図ること。

3. 研究の方法

(1)EMT 可視化間葉型 CMS4 大腸癌細胞株の作成

各種大腸癌細胞株に EMT を可視化できる EMT バイオセンサーを導入し EMT 能力のある細胞株を抽出し、CMS4 の代表的細胞株とする。

(2)EMT 可視化間葉型 CMS4 大腸癌細胞株に化学療法を行い、EMT の化学療法耐性への寄与リアルタイムイメージングで明らかにする 化学療法抵抗性の EMT の状況を把握し、そのタイミングでどのような分子メカニズムが働いているのかを明らかにする。

(3)EMT 阻害薬が化学療法抵抗性から感受性へと転換出来るかを検証

リアルタイムイメージングを用い EMT 阻害薬のスクリーニングと EMT 阻害薬が化学療法抵抗性を減弱させるかを検証する。さらには併用療法の可能性を探る。

(4)CMS4-PDX の作成

(2)で得られた化学療法抵抗性時に増加するマーカーを用いて、高度進行大腸癌の切片に免疫組織学的染色を行い、CMS 別-PDX ライブラリーを作成する。

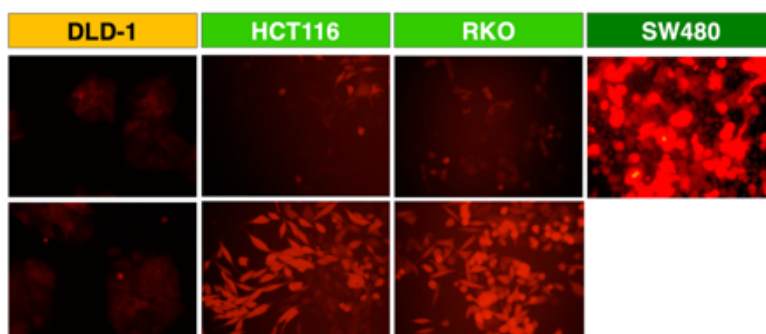
(5)CMS4-PDX に殺細胞剤と EMT 阻害薬の併用を行い、前臨床試験モデルを作成

CMS4-PDX に化学療法を行い、上記マーカーが化学療法抵抗時に増加するかを免疫組織学的染色で検証し、さらに EMT 阻害薬がそれら抵抗性マーカーが減弱するかを PDX で検証する事により今後の前臨床試験モデルのプラットフォームになりうるかを検証する。

4. 研究成果

(1)EMT 可視化間葉型 CMS4 大腸癌細胞株の作成

EMT バイオセンサーを導入したところ、CMS1 の DLD-1、LoVo、CMS3 の LST174T、HT29 は EMT 能力がなかった。一方、CMS4 の HCT116 と RKO は EMT 刺激剤で EMT が誘導され、SW480 は常時 EMT を起こしている事が判明した。

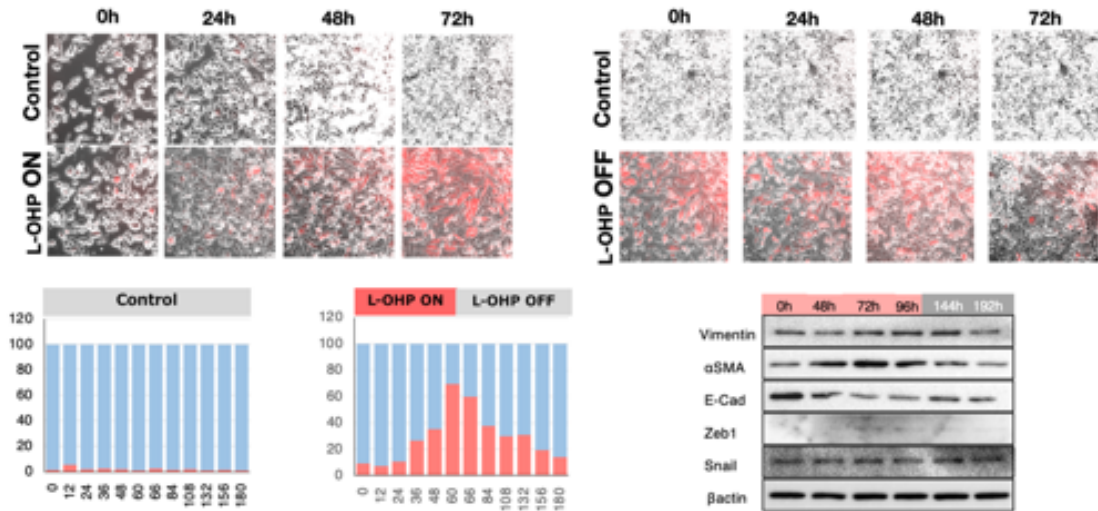


(2) EMT 可視化間葉型 CMS4 大腸癌細胞株に化学療法を行い、EMT の化学療法耐性への寄与リアルタイムイメージングで明らかにする

リアルタイムイメージングで、化学療法は EMT を起こし赤色を発するようになった。一方で化学療法を除去すると速やかに赤色はなくなり、MET を起こした。

ウェスタンブロッティングでも MET マーカー、癌幹細胞マーカーは同様の動きを示した。

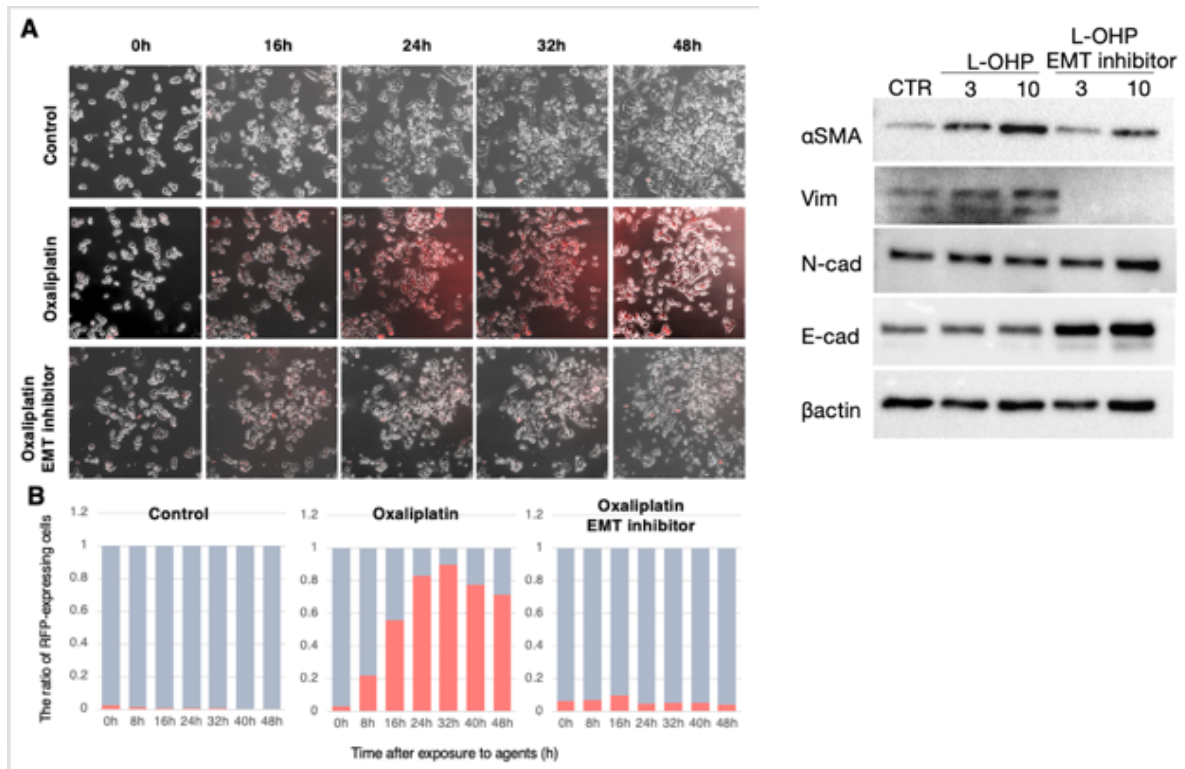
上記から EMT 能力のある癌細胞は EMT を起こし化学療法抵抗性を示し、一方なくなると速やかに MET を起こすように、epithelial-to mesenchymal plasticity(EMP)を有している事が示された。



(3) EMT 阻害薬が化学療法抵抗性から感受性へと転換出来るかを検証

リアルタイムイメージングを用い、殺細胞剤によって引き起こされる EMT が EMT 阻害剤で抑制されることを確認した。ウェスタンブロッティングにも EMT マーカーは有意に抑制させられていた。さらに、In vitro、in vivo ともに併用療法は細胞障害性、抗腫瘍効果を示した。

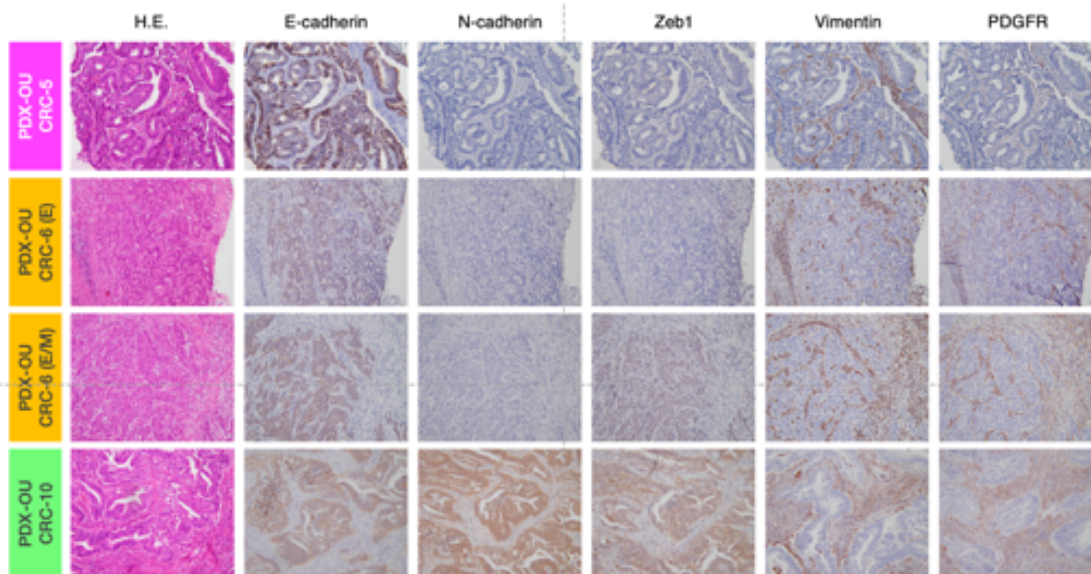
よって間葉型大腸癌の化学療法の感受性を回復させるには EMT 阻害薬が重要であることが示唆された。



(4) CMS4-PDX の作成

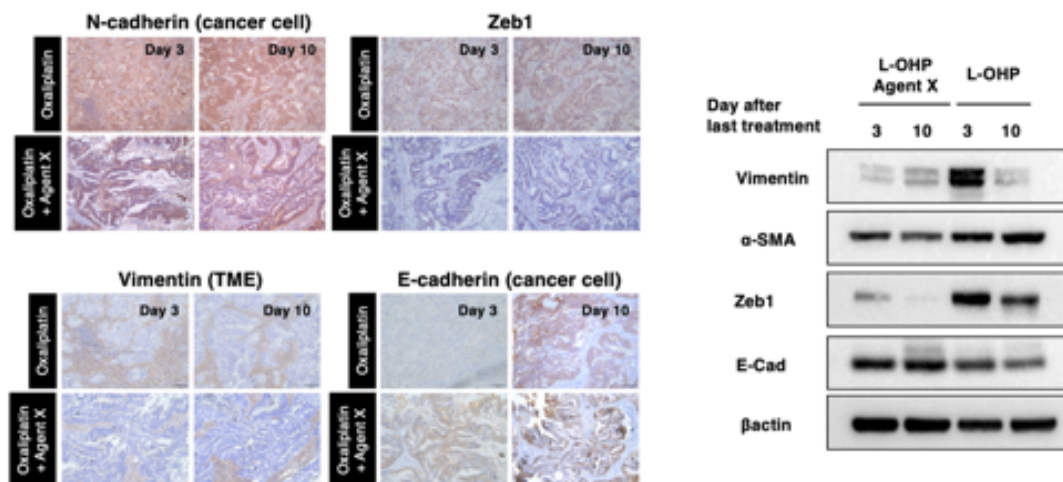
高度進行大腸癌の PDX を作成し、大腸癌 PDX ライブラリーを作成した。

(2) で得た EMT マーカーを基に免疫組織学的染色を行ったところ、やはり間質の多い腫瘍で間葉系マーカーが陽性であった。イメージングから得た化学療法抵抗性間葉マーカーが実際の臨床サンプルでも有用であることが示された。



(5) CMS4-PDX に殺細胞剤と EMT 阻害薬の併用を行い、前臨床試験モデルを作成

CMS4-PDX マウスモデルに殺細胞剤オキサリプラチンを投与すると、リアルタイムイメージングで得た結果と同様に、Vimentin、N-Cad、PDGFR、Zeb1 が増加し、E-Cad が減弱した。また化学療法が終了して一週間経つと元に戻り、コントロールとあまり変わらなくなった。これこそが間葉型 CMS4 大腸癌の薬剤耐性の機序が解明出来ない理由である。すなわち、間葉型 CMS4 大腸癌は化学療法に抵抗性を示すほんの僅かな期間だけ EMT を発動させ、生存出来たら MET を起こし元に戻るため、前後を比べただけだと変わらないからと判明した。また EMT 阻害剤との殺細胞剤の併用療法を行うと、EMT を起こす事なく E 状態のままで化学療法への感受性が回復することが示唆された。



(6) まとめ

EMT バイオセンサーを用いる事で間葉型 EMT 能力を有する大腸癌を抽出できた。これらの間葉型大腸癌は EMT により化学療法に抵抗し、化学療法が終了すると MET で元に戻る可塑性(EMP)を有している事が判明した。化学療法中のみ上昇する EMT 化学療法抵抗性マーカー群を抽出出来た。これらは EMT 阻害剤で抑制された。殺細胞剤と EMT 阻害剤は間葉型大腸癌の治療戦略として適していると考えられた。EMT 化学療法抵抗性マーカーで、高度進行大腸癌の臨床サンプルでも CMS4 を抽出することが可能であり、CMS4-PDX モデルを効率良く作成することが出来た。CMS4-PDX マウスモデルでも、化学療法中に M マーカーが上昇し抵抗性を示す事、EMT 阻害剤で EMT が抑制される事が証明された。以上より、EMT リアルタイムイメージングと間葉型大腸癌 PDX モデルを用いる事で予後不良間葉型大腸癌への新しい治療戦略を構築が可能となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takeda S, Shigeyasu K, Okugawa Y, Yoshida K, Mori Y, Yano S, Noma K, Umeda Y, Kondo Y, Kishimoto H, Teraishi F, Nagasaka T, Tazawa H, Kagawa S, Fujiwara T, Goel A.	4. 巻 444
2. 論文標題 Activation of AZIN1 RNA editing is a novel mechanism that promotes invasive potential of cancer-associated fibroblasts in colorectal cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer letters	6. 最初と最後の頁 127-135
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.canlet.2018.12.009.	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 Yano S, Tazawa H, Kishimoto, H, Kagawa S, Fujiwara T, Hoffman RM.	4. 巻 22
2. 論文標題 1.Yano S, Tazawa H, Kishimoto, H, Kagawa S, Fujiwara T, Hoffman RM. Real-time fluorescence image-guided oncolytic virotherapy for precise cancer treatment.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 879
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22020879.	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 Yano S, Tazawa H, Kagawa S, Fujiwara T, Hoffman RM.	4. 巻 12
2. 論文標題 FUCCI real-time cell-cycle imaging as a guide for designing improved cancer therapy: A review of innovative strategies to target quiescent chemoresistant cancer cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers (Basel)	6. 最初と最後の頁 2655
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers12092655.	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 Tazawa H, Hasei J, Yano S, Kagawa S, Ozaki T, Fujiwara T	4. 巻 12
2. 論文標題 Bone and Soft-Tissue Sarcoma: A New Target for Telomerase-Specific Oncolytic Virotherapy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers (Basel)	6. 最初と最後の頁 478
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers12020478.	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 Yano S, Hoffman RM	4. 巻 7
2. 論文標題 Real-time determination of the cell-cycle position of individual cells within live tumors using cell-cycle imaging.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells7100168.	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5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Shuya Yano, Hiroshi Tazawa, Kunitoshi Shigeyasu, Shunsuke Kagawa, Toshiyoshi Fujiwara
2. 発表標題 細胞周期の可視化から見えてきた難治性がん細胞の存在と新規治療戦略 Novel therapeutic strategy for therapy-refractory tumor cells identified by cell cycle imaging
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会 シンポジウム がん組織の生体イメージング:現場を押さえる!
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 SHUYA YANO, Hiroyuki Kishimoto, Fuminori Teraishi, Kunitoshi Shigeyasu, Yoshiko Mori, Yoshitaka Kondo, Shunsuke Kagawa, Yasuhiro Shirakawa, Toshiyoshi Fujiwara
2. 発表標題 The Surgical Strategy for wider D3 area due to Skew and Distortion of a base of Transverse Mesocolon
3. 学会等名 第74回消化器外科学会総会 シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢野修也, 近藤喜太, 寺石文則, 重安邦俊, 母里淑子, 藤本卓也, 香川俊輔, 白川靖博, 藤原俊義
2. 発表標題 中結腸動静脈根部の上下左右のズレと 副右結腸静脈のねじれの位置を意識した 結腸右半切除D3郭清
3. 学会等名 第32回内視鏡外科学会総会 ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢野修也 近藤喜太 寺石文則 黒田新士 重安邦俊 菊地覚次 母里淑子 藤本卓也 岸本浩行 香川俊輔 白川靖博 藤原俊義
2. 発表標題 進行横行結腸癌に対する複雑な幅広いID3郭清手技を結腸の成り立ちから理解することにより単純化し血管の変異に影響されない定型手術として言語化する
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会 ワークショップ
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naoki Mimura, Shuya Yano, Hiroshi Tazawa, Takeshi Ieda, Daiki Okabayashi, Kunitoshi Shigeyasu, Sho Takeda, Kazuhiro Yoshida, Fuminori Teraishi, Yuzo Umeda, Shunsuke Kagawa, Toshiyoshi Fujiwara
2. 発表標題 Reversible EMT-MET biosensor-mediated imaging visualizes inducible resistance to chemotherapy with hybrid E/M phase
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会 シンポジウム
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Hoffman RM, Yano S	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Humana Press, New York, NY	5. 総ページ数 329
3. 書名 Methioninase Cell-Cycle Trap Cancer Chemotherapy. In: Hoffman R. (eds) Methionine Dependence of Cancer and Aging. Methods in Molecular Biology	

1. 著者名 Hoffman RM, Yano S	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Humana Press, New York, NY	5. 総ページ数 329
3. 書名 Tumor-Specific S/G2-Phase Cell Cycle Arrest of Cancer Cells by Methionine Restriction. In: Hoffman R. (eds) Methionine Dependence of Cancer and Aging. Methods in Molecular Biology, vol 1866	

〔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
---------	---------