

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16716

研究課題名(和文) 静止期維持因子p57を指標としたがん幹細胞の網羅的探索とがん根治治療モデルの確立

研究課題名(英文) Exploration of cancer stem cells using a marker gene p57 and establishment of an eradicated anti-cancer therapy

研究代表者

比嘉 綱己(Higa, Tsunaki)

九州大学・生体防御医学研究所・学術研究員

研究者番号：60826238

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)：申請者らは、がん幹細胞のマーカーとして注目してきたp57遺伝子を指標として、さまざまながんにおいてがん幹細胞を網羅的に探索する遺伝子改変マウスを作製した。このマウスを用いて、白血病や大腸がん、胃がん等において新規のがん幹細胞分画を発見することができた。さらに、特に大腸がんにおいて、このp57陽性がん幹細胞の殺傷と既存の抗がん剤を用いた治療を組み合わせることにより、がん治療後の再発が顕著に抑制されることを立証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既存の抗がん剤治療においてはすべてのがん細胞を殺傷することはできず、ほとんどのがんが再発の転帰をたどる。本研究では、抗がん剤に耐性のがん幹細胞分画としてp57陽性細胞を同定し、これらを遺伝学的に殺傷することによって治療後再発を大きく抑制できることを示した。これらの結果はがん幹細胞システムの生物学的理解に貢献するのみならず、今後p57陽性がん幹細胞を標的とする薬剤を探索することで、より効果的ながん治療の開発へとつながっていく可能性を示唆するものである。

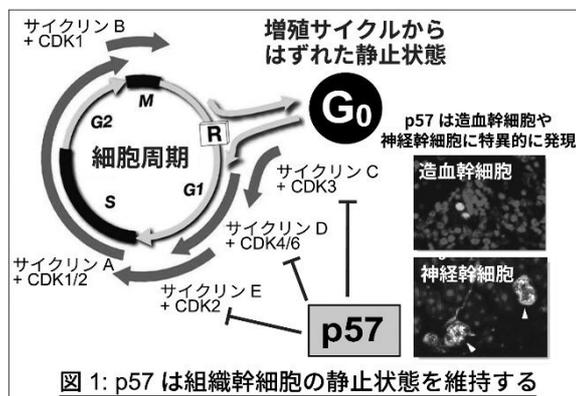
研究成果の概要(英文)：We generated a mouse model in which we can explore unidentified cancer stem cell populations in various types of cancers, with the use of a marker gene p57. Using these mice, we have identified the novel cancer stem cell populations in leukemia, colorectal and gastric cancers. In colorectal cancer, we found that the combination of conventional anti-cancer drugs and ablation of the p57-expressing stem cells significantly suppresses the post-therapy recurrence of tumors.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：がん幹細胞 組織幹細胞 がん 静止幹細胞

1. 研究開始当初の背景

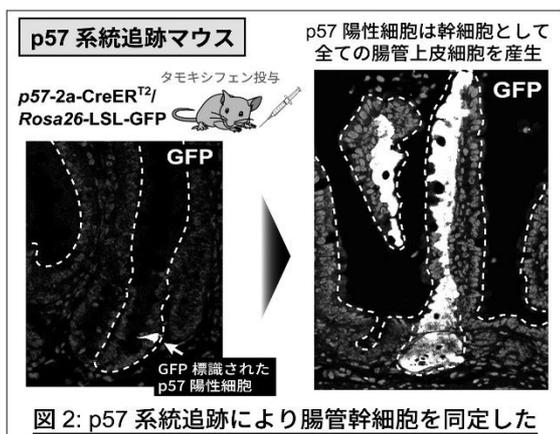
造血幹細胞や神経幹細胞などの組織幹細胞の最大の特徴は、増殖サイクルを可逆的に停止した「静止状態 (G₀期)」に維持されていることであり、それが幹細胞性の維持に重要であることが証明されてきた。また正常組織のみならず、がんにおいても静止状態のがん幹細胞が存在し、既存の化学放射線治療に対する抵抗性の原因になっていると考えられている [Giancotti *et al.*, *Cell*, 2013]。しかしながら大部分の正常組織やがん組織においては、この「静止状態幹細胞」の実体や機能に関してほとんど解析が進んでいなかった。



これまでに申請者のグループは、細胞周期の長期停止を司る分子 (CDK インヒビター) の一つである p57 が、造血幹細胞や神経幹細胞に非常に高い特異性をもって発現し、さらにその静止状態および幹細胞性の維持に必須であることを明らかにしてきた [Matsumoto *et al.*, *Cell Stem Cell*, 2011; Furutachi *et al.*, *Nat. Neurosci.*, 2015]。組織幹細胞は臓器や由来を超えて相同な性質を示すことが知られているため、p57 をマーカーとして用いることで、全身諸臓器において未発見の幹細胞を網羅的に同定・解析できるのではないかと考えた。

上述の知見を受けて、申請者は p57 陽性細胞の「系統追跡マウス」を作出した。このマウスは、タモキシフェン誘導性のゲノム組み換えにより全身の p57 陽性細胞が GFP 標識され、さらにその子孫細胞にも GFP 標識が伝わる仕組みになっている。

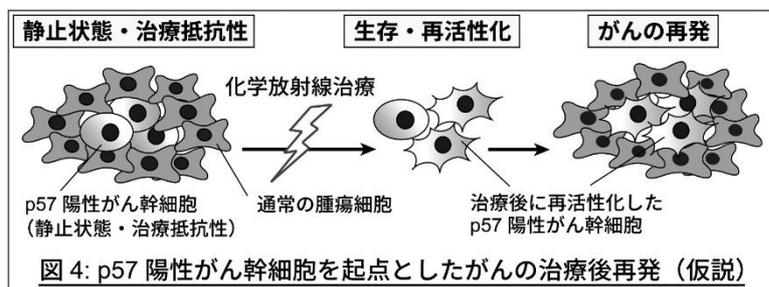
申請者はこのマウスの解析から、前述の血液や神経のみならず、腸管や胃上皮などにも p57 を特異的に発現する静止状態の細胞が存在することを発見した。さらにその GFP 標識は当該臓器を構成する全種類の細胞に受け継がれたことから、p57 陽性細胞は腸管や胃上皮における幹細胞であることが判明した [Higa *et al.*, in revision]。とくに腸管においては、p57 陽性細胞は定常状態ではほとんど系統追跡像を示さないが、5-FU 投与や放射線照射などを行うとロバストな幹細胞性を示すことから、傷害誘導性の幹細胞として機能していると考えられる。



2. 研究の目的

上記の系統追跡の結果から、p57 を指標として用いることで腸管や胃の正常組織における幹細胞を同定できることがわかった。これらの知見を踏まえて、申請者は「p57 はがん組織においても静止状態かつ治療抵抗性のがん幹細胞を同定する有用なマーカーとなるのではないかと」という仮説を立てた。

本研究では、p57 ががん組織においても幹細胞を同定する有用なマーカーとなり得るかを検証すること、腫瘍内の p57 陽性細胞が治療後再発の責任となるがん幹細胞かどうかについて遺伝学的に検証し、これを標的としたがんの根治治療モデルを確立すること、がん幹細胞の治療抵抗性や治療後再発を司る分子メカニズムを解明することの3点を目的として研究を行った。



3. 研究の方法

申請者が作製した p57 系統追跡マウスを、Apc^{Δ716} マウス (腸管腫瘍) や K19-Wnt1/C2mE マウス (胃がん) などの自然発がんマウスと交配し、腫瘍内での系統追跡実験が可能なマウスを作製した。これらが発がんする週齢において、p57 陽性細胞の系統追跡と抗がん剤や放射線による

治療を行い、治療介入あり・なしの両群間で系統追跡像の大きさを経時的に比較し、p57 陽性がん幹細胞の治療後再発への寄与を定量的に評価した。

p57 陽性細胞ががんの治療後再発における責任細胞かどうかを検証するため、p57 プロモーター制御下にジフテリア毒素 (DT) 受容体と緑色蛍光タンパク質 Venus を発現するノックインマウス (p57-DTR-Venus) を作製した。DT 受容体はマウスにおいては内在性に発現していないため、DT を投与すると p57 陽性細胞のみが特異的に殺傷される。p57-DTR-Venus マウスを上述の自然発がんマウスとかけ合わせて得られたマウスに対し、DT 投与と抗がん剤や放射線治療を組み合わせた治療介入を行い、p57 陽性がん幹細胞を標的としたがん治療モデルの確立を試みた。

正常組織やがん組織における p57 陽性細胞の活性化機構を探るため、正常腸管上皮や Apc^{Δ716} マウス由来の腸管腫瘍において、定常状態や 5-FU 投与後の 1 細胞 RNA-seq 解析を施行した。

4. 研究成果

p57 陽性細胞の系統追跡実験

まず、Apc^{Δ716} アリルを有するマウスにおいて p57 陽性細胞の系統追跡を行ったところ、定常状態において腫瘍内での系統追跡像が観察された。p57 陽性がん細胞は増殖マーカーを発現しておらず静止状態に維持されているが、これらの系統追跡像の中には増殖マーカー陽性のアグレッシブに分裂するがん細胞や、従来腸管腫瘍の幹細胞マーカーとされてきた Lgr5 で標識される細胞が含まれていた。これらの結果から、腸管腫瘍内の p57 陽性細胞は恒常的ながん幹細胞として不均一な細胞集団を産生しており、Lgr5 陽性細胞の上流としても機能し得ることが示された。

次に、上記のマウスに大腸がんの標準的治療薬である 5-fluorouracil (5-FU) を投与し、系統追跡像の変化を観察した。薬剤投与後 45 日目の時点において、5-FU 投与群では対照群と比較して、腫瘍内の系統追跡像の数や大きさが顕著に増加していた。これらの結果から、腸管腫瘍内の p57 陽性細胞は抗がん剤に耐性のがん幹細胞として機能することが示された。

大腸がん以外のがん種についても、胃がんや乳がんにおいて p57 陽性細胞に由来する系統追跡像が認められ、また胃上皮や血液などの正常組織においても同様の知見が得られた (画像未提示) ことから、p57 陽性細胞は多くのがんや正常組織において幹細胞として機能することがわかった。

p57 陽性細胞の腸管腫瘍におけるアブレーション実験

腸管腫瘍内の p57 陽性細胞が治療後再発の責任細胞かどうかを検証するため、p57-DTR-Venus マウスと Apc^{Δ716} マウスを交配して得られたマウスに DT を投与することで、腸管腫瘍内の p57 陽性細胞をアブレーションすることを試みた。しかしながら、p57 は副腎皮質にも高い発現が見られるため、このマウスに DT を投与すると急性副腎不全を呈してしまい、長期のフォローアップが不可能であることがわかった。

そこで方針を変更し、p57-DTR-Venus マウスから正常腸管オルガノイドを形成させたのち、Apc KO, Smad KO, p53 KO, Kras(G12D) の 4 つの発がん性変異を導入することにより、腸管腫瘍オルガノイドを樹立した。p57-DTR-Venus 腸管腫瘍オルガノイドを野生型 B6/129sv マウスの大腸に同所性移植したのち、DT 投与による p57 陽性細胞のアブレーションや抗がん剤治療を行った。この系において DTR はレシピエントマウスの正常組織には発現しておらず、移植した腸管腫瘍内の p57 陽性細胞にのみ発現しているため、マウスの致死性を回避しつつ長期に実験結果を追跡することに成功した。

Luciferase レポーターを介した化学発光を用いて、マウスを生かした状態で経時的に体外から腫瘍サイズを計測したところ、5-FU または DT を単独投与した群では無治療群と比較して腫瘍の縮小傾向が観察されたが、その効果は部分的であった。これらの結果は、5-FU 投与による増殖性がん細胞の殺傷や、DT 投与による p57 陽性細胞のアブレーションを単独で行っても、がんに対する治療効果は限局的であることを示唆した。一方、5-FU と DT の投与を組み合わせを行った群では、それぞれの単独投与群と比べて顕著に腫瘍サイズの増大が抑制された。P57 陽性細胞が静止状態のがん幹細胞として機能するという系統追跡実験の結果と併せて考察すると、本実験系においてはアグレッシブに増殖するがん細胞とその上流の p57 陽性がん幹細胞の両方が殺傷されたため、がんの増大を効果的に抑制することができたものと考えられる。これらの結果は、既存の抗がん剤治療と p57 陽性がん幹細胞を標的とした治療を組み合わせることで、よ

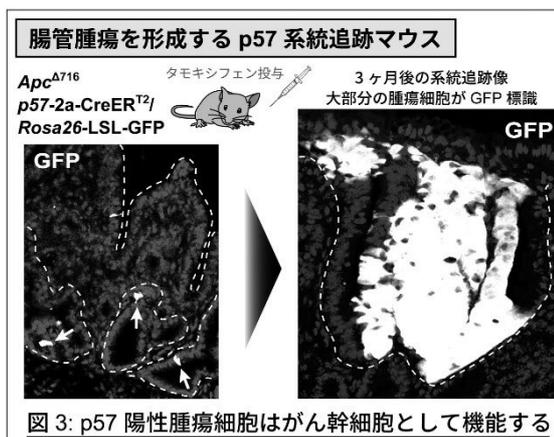
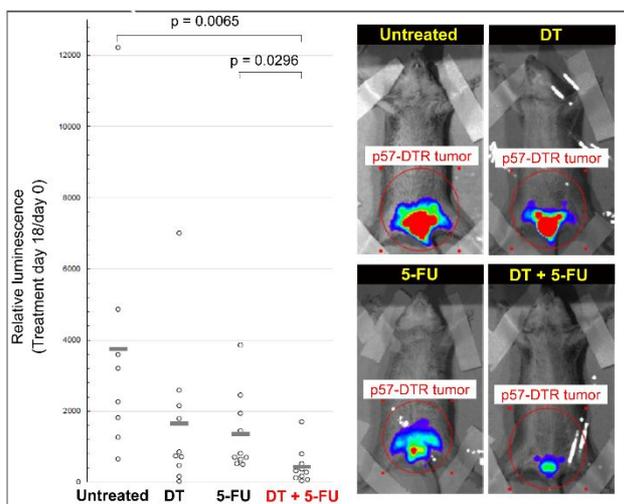


図 3: p57 陽性腫瘍細胞はがん幹細胞として機能する

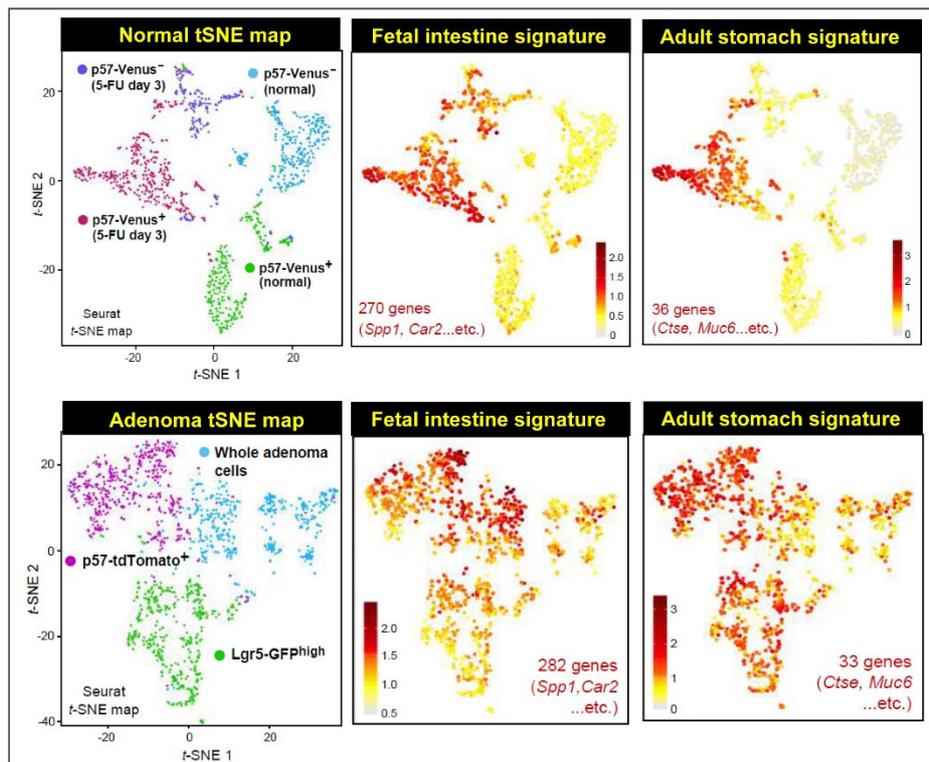
り効果的な新規のがん治療の開発につながる可能性を示唆している。

一方で、p57 陽性細胞アブレーションと 5-FU を組み合わせたマウスにおいてもがんの再発を完全に抑制することは今のところできていない。DT 投与を用いた遺伝学的アブレーションの効率は部分的であるため、p57 陽性細胞が残存してしまっているという技術的境界のほか、p57 陽性細胞以外にも幹細胞性を有する未知の細胞分画が存在している可能性も考えられる。また、遺伝学的な治療モデルはほぼ示すことができたものの、実際に薬理的に p57 陽性細胞を殺傷できるような分子標的や薬剤は今のところ存在しない。このようなポイントは、今後研究を進めていく上で克服すべき課題であると考えている。



正常腸管および腸管腫瘍における 1 細胞 RNA-seq 解析

腸管の p57 陽性幹細胞は定常状態では静止状態に維持されているが、5-FU や放射線照射によって活性化されて子孫を産生し、傷害誘導性の幹細胞として機能することを見出していた。このような p57 陽性幹細胞の活性化メカニズムを調べるため、正常腸管や腸管腫瘍組織での 1 細胞 RNA-seq 解析を行った。その結果、5-FU を投与したマウスの正常腸管における p57 陽性細胞では、対照群と比較して胎児腸管や胃上皮の遺伝子シグネチャーが高度に活性化されてくることを見出した。これらの結果は、p57 陽性細胞の傷害誘導的な活性化の際には胎児化と胃上皮化生様変化が付随して起こっていることを示すものであり、静止幹細胞の活性化機構の一端を解明した斬新な知見であると考えている。さらに、Apc^{Δ716} マウス由来の腸管腺腫における 1 細胞 RNA-seq では、このような胎児化と胃上皮化生様変化が定常状態でも恒常的に生じていることが示唆された。腸管腫瘍においては定常状態でも頻繁に系統追跡像が見られることと併せて考察すると、がん組織においては正常組織の傷害後修復の機構が恒常的に活性化しており、静止状態の幹細胞が間欠的に子孫産生に寄与しているものと考えられる。現在、一連のデータを論文として投稿するとともに、このような静止幹細胞の活性化機構についてより踏み込んだ解析を行っているところである。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 比嘉 綱己
2. 発表標題 p57陽性細胞の追跡により明らかとなった消化管上皮の非職業的幹細胞
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsunaki Higa
2. 発表標題 Spatiotemporal Reprogramming of p57+ Quiescent Stem Cells Underlies Regeneration and Neoplasia in the Intestinal Epithelium
3. 学会等名 The 29th Hot Spring Harbor International Symposium, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

本申請課題における結果は、現在国際ジャーナルに投稿しリバイスを行っているところである。

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