

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18145

研究課題名(和文) Total kill therapyを目指した癌の多様性維持機構の解明と制御

研究課題名(英文) Elucidation and control of cancer diversity maintenance mechanism aiming at total kill therapy

研究代表者

藤野 志季 (Fujino, Shiki)

大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：10768956

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)：本研究では大腸癌におけるPOU5F1遺伝子の機能的役割の解析、多様性維持機構の解明をおこなった。まず、POU5F1遺伝子発現を可視化させ、研究をすすめるために、POU5F1が活性化した際に緑色蛍光を発現するベクターを構築し大腸癌初代培養細胞に導入した。POU5F1を発現する細胞と発現しない細胞との網羅的遺伝子発現解析において、POU5F1発現細胞では幹細胞に関わる遺伝子がエンリッチされていることが証明された。さらにはPOU5F1を発現する細胞は細胞障害性薬剤を投与にも残存し、腫瘍の多様性を再構築するした。これらを制御することが多様性の制御、ひいては治療成績の向上につながっていく可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では大腸癌における治療抵抗性の機序を解明するために、POU5F1遺伝子に着目して研究をおこなった。その過程として、POU5F1が活性化した際に緑色蛍光を発現するベクター、またPOU5F1遺伝子を発現する場合に特異的に細胞死を誘導するベクターを構築した。これらは今後様々な研究において利用可能である。また、POU5F1発現細胞では幹細胞に関わる遺伝子がエンリッチされており、POU5F1を発現する細胞は細胞障害性薬剤を投与にも残存し、腫瘍の多様性を再構築することをしめた。これらを制御することが治療抵抗性の改善につながっていく可能性があり、今後の大腸癌治療成績の向上が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the functional role of the POU5F1 gene in colorectal cancer and elucidated the mechanism for maintaining diversity in clinical tumors. First, in order to visualize the expression of the POU5F1 gene, a vector that expresses green fluorescence when POU5F1 is activated was constructed and introduced it into primary cultured cells of colorectal cancer. Comprehensive gene expression analysis of POU5F1 positive and negative cells proved that POU5F1 positive cells were enriched with genes related to stem cells. Furthermore, POU5F1 positive cells survived after the administration of cytotoxic agents, resulting in reconstructing tumor diversity. To target these cells may lead to control of diversity and, will improve treatment outcomes.

研究分野：癌

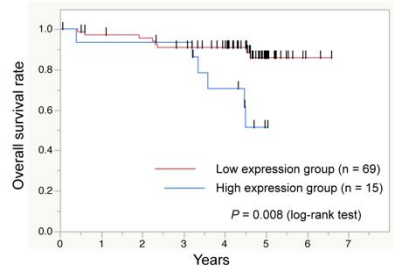
キーワード：大腸癌 幹細胞 多様性 治療抵抗性

1. 研究開始当初の背景

現在がん治療の主体は外科療法、放射線療法、化学療法であるが、治療抵抗状態になったがんは難治であり死因の第 1 位を占める。抗がん剤や分子標的治療薬の進歩により、転移や再発をきたした難治性がんにおいても予後を延長させることが可能とはなっているものの、その効果は限定的で更なる治療法の開発が望まれている。

臨床における癌は多様性があり、抗癌剤治療の前後によりその population が変化することが知られているが、多様性を持つ癌細胞集団の中の一部の抵抗性の細胞が生き残るのか、治療により抵抗性を獲得した新しい細胞が生き残るのか、未解明な部分は多い。Total kill therapy を目指すためには、**癌の多様性維持機構の解明と、治療抵抗性の細胞集団の同定と解析**が必要であると考えられる。

POU5F1 遺伝子は自己複製能の促進と未分化状態の維持に関わる転写因子で未分化胚性幹細胞に発現し多能性の維持に必須であると考えられている。我々はこれまでに大腸癌における POU5F1 遺伝子発現に着目し、報告を行ってきた (Surgery Today, 2018)。根治切除が施行された大腸癌患者において POU5F1 遺伝子発現が高い群では低い群に比較して、優位に遠隔転移再発をきたし、全生存率が低下していた (図 1)。POU5F1 遺伝子は大腸癌においても、多能性の維持に関する重要な存在である可能性があるが、現在、基礎研究で標準的に用いられているのは細胞株と呼ばれる増殖能を獲得した均一な癌細胞集団である。細胞株を用いて実際の個体内での癌のミニチュアモデルとなるような、**多様性をもつ生きた癌組織を in vitro や in vivo で構築させる**ことは難しく、多様性維持機構の解明は細胞株のみの解析では困難であると考えられた。

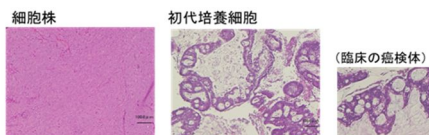


2. 研究の目的

本研究では、POU5F1 遺伝子に着目して大腸癌の多様性維持機構の解明を行い、新たな治療標的として、その制御を通じて Total kill therapy を目指すことを目的とした。

まず癌の多様性維持機構を解明するために、実際の個体内での癌のミニチュアモデルとなるような多様性をもつ初代培養細胞の樹立を、先行研究として行った。その結果、大腸癌においては樹立効率が 8 割程度と高率で、臨床と非常に近い形態の生きた癌細胞を得ることが可能となった (特願 2016-144706) (図 2)。

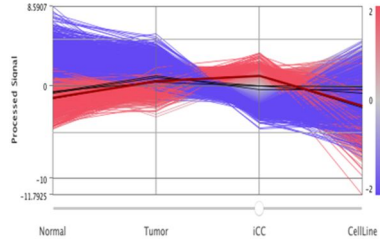
図 2. 多様性を持つ初代培養細胞



細胞株の腫瘍は比較的均一な細胞のみで構成されているが、初代培養細胞の腫瘍は腺管構造をもち粘液を産生しており、臨床の癌に酷似した形態をとっている。

この初代培養癌細胞 (isolated tumor-derived cancer cells, iCCs) は遺伝子変異や遺伝子発現において臨床の腫瘍と相関が高く、多様性を維持し、病理学的形態や抗がん剤の感受性などにおいても臨床像と酷似していることから、in vitro の環境で「癌のミニチュアモデル」を構築できていると考えている。また、マイクロアレイの解析にて iCC は POU5F1 に関する遺伝子の発現が従来の大腸癌細胞株よりも臨床の大腸癌に近いことが明らかになっている (図 3)。

図 3. POU5F1 遺伝子発現の比較



我々が確立してきた初代培養細胞 (iCC) は、臨床における癌の多様性を模倣できている可能性がある、独自性の高いマテリアルである。細胞株のみならず、iCC を in vitro や in vivo の研究に用いることが出来る点は、臨床を反映する創造性の高い結果につながる可能性があり、本研究の特色であると考えた。

3. 研究の方法

大腸癌における POU5F1 の機能的役割の解析、POU5F1 の発現により動くパスウェイを同定し、治療標的となる分子生物学的メカニズムの探索を行う。また、抗がん剤耐性において幹細胞性に関わることが報告されており、POU5F1 の発現を可視化させた細胞にて抗がん剤耐性株を

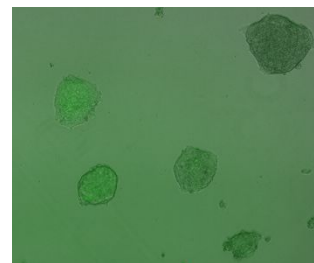
作製し、POU5F1 遺伝子発現の評価を行い、新たな治療標的としての検討を行う。具体的には下記の項目に分けて研究を進めた。

研究計画・方法について

POU5F1 可視化細胞の作製と腫瘍多様性に関わる遺伝子の解析

POU5F1 の発現意義の解析を行うため、POU5F1 のプロモーター領域と EGFP を iCC に導入し、POU5F1 の発現を緑色の蛍光にて可視化させた細胞を作製した(図 4)。POU5F1 の発現は iCC において均一ではない事、POU5F1 陽性細胞より POU5F1 陰性の細胞が生み出されることが確認された。また POU5F1 陽性の単一細胞より、様々な分化マーカーを持つ細胞が生み出されることを確認した。今後、POU5F1 を発現している細胞と発現していない細胞をセルソーターにて分離し、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行う。変化している主要な遺伝子群の評価を行い、腫瘍の多様性を形作るのに重要な遺伝子群を同定し、解析を進める。

図 4. iCC における POU5F1 遺伝子発現



POU5F1 遺伝子と治療抵抗性の関連に関する解析

また、テトラサイクリン発現誘導システムを用いて、POU5F1 の遺伝子発現を制御することが可能な大腸癌細胞株、初代培養細胞を樹立する。テトラサイクリン発現誘導システムでは、Tet リプレッサータンパク質と Tet オペレーターDNA 配列、テトラサイクリン発現誘導システムを宿主ゲノムに組み込み、テトラサイクリンに容量依存的に、POU5F1 目的遺伝子の発現を正確に制御することが可能である。前述の POU5F1 可視化細胞を用いて、まず POU5F1 が高発現な集団、低発現な集団を作成する。この集団に対して、細胞障害性薬剤を投与し、その挙動を観察する。既存の報告からも POU5F1 高発現集団は POU5F1 低発現集団に比較して薬剤抵抗性が高いことが予測されるが、これが臨床を反映したヘテロな細胞集団である初代培養細胞においても同様の挙動を示すか、確認を行う。また、POU5F1 低発現集団にはテトラサイクリン POU5F1 発現誘導システムを用いて、POU5F1 低発現集団と、強制的 POU5F1 高発現集団を作製する。

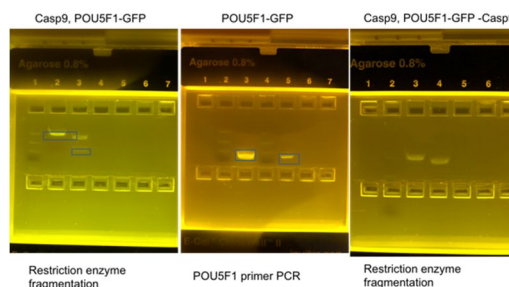
治療抵抗性細胞集団の同定と解析

これまでに、細胞障害性薬剤を投与した際に残存する細胞集団において POU5F1 の遺伝子発現が高いことが明らかになっている。しかしながら、POU5F1 の遺伝子発現が高い集団が細胞障害性薬剤を投与した際に残存するのか、もしくは細胞障害性薬剤を投与した際に POU5F1 を発現させることで抗薬剤抵抗性を獲得するのか、については定まった知見はない。

今回、この機序を明らかとするために、ダイメライザーの投与により、POU5F1 発現細胞にてカスパーゼ 9 を誘導し細胞死をおこすシステムの構築を行う。現在、POU5F1 のプロモーター領域と EGFP、カスパーゼ 9 を組み込んだベクターを作製中である。(図 5)このベクターを組み込んだ安定発現株を、大腸癌細胞株と初代培養細胞の両者において作製する。安定発現株が作製されたのち、まずダイメライザー投与にて POU5F1 の発現を欠失させ、細胞障害性薬剤を投与した際に POU5F1 の発現が再度亢進するかについて EGFP 蛍光を用いて確認する。

図 5. ベクターの構築

The construction of plasmid vector
(POU5F1 promoter-Casp9-EGFP)



POU5F1 をターゲットとした治療戦略

過去に LGR5 などの大腸癌幹細胞マーカーをターゲットとした研究が行われて来たが、LGR5 陽性細胞をターゲットとしても、LGR5 陰性細胞から陽性細胞が生み出され、再度腫瘍の構築が行われるという結果が示されている。今回着目した POU5F1 においては、PDL-1 や他の幹細胞マーカーの発現パターンが LGR5 と異なっていることから、違った知見を生み出すことができると期待している。POU5F1 をターゲットとすることによって、total kill therapy が可能で

あるかを、前述したベクターを導入した細胞を用いて、in vitro、in vivo で検証する。また、その下流で動くパスウェイにも着目し、治療標的としての可能性を検証する。

4 . 研究成果

研究計画 POU5F1 可視化細胞の作製と腫瘍多様性に関わる遺伝子の解析：POU5F1 のプロモーター領域と EGFP を iCC に導入し、POU5F1 の発現を緑色の蛍光にて可視化させた細胞のマイクロアレイによる遺伝子発現解析において、POU5F1 に関連するパスウェイなどを同定した。また、シングルセル解析にて偽時系列解析を行い、新たな分化リニアージを明らかとした。（論文投稿中）

研究計画 POU5F1 遺伝子と治療抵抗性の関連に関する解析：テトラサイクリン発現誘導システムを用いて、POU5F1 の遺伝子発現を制御することが可能な大腸癌細胞株、初代培養細胞を樹立した。この集団の解析により、治療抵抗性を改善できる可能性を示した。

（Molecular Cancer research 2021, Scientific Reports 2021, 論文投稿中）

研究計画 治療抵抗性細胞集団の同定と解析：ダイメライザーの投与により、POU5F1 発現細胞にてカスパーゼ 9 を誘導し細胞死をおこすシステムを構築した。POU5F1 のプロモーター領域と EGFP、カスパーゼ 9 を組み込んだベクターを作製し、このベクターを組み込んだ安定発現株を、大腸癌細胞株と初代培養細胞の両者において作製することができた。POU5F1 の完全抑制、不完全抑制の挙動と、抗がん剤投与後の細胞の挙動を解析することにより、幹細胞の一時的な活性化が多様性の再構築を誘導することをあきらかとした。（論文投稿中）

研究計画 POU5F1 に関連して動く、下流の遺伝子として HNF1A を同定し、大腸癌における治療標的の可能性をしめした。（Scientific Reports 2021）

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fujino, S., Ito, A., Ohue, M., Yasui, M., Mizushima, T., Doki, Y., Mori, M., Miyoshi, N.	4. 巻 May 28;513(2)
2. 論文標題 Phenotypic heterogeneity of 2D organoid reflects clinical tumor characteristics.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BBRC	6. 最初と最後の頁 332-339
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.03.173.	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 Fujino, S., Miyoshi, N.	4. 巻 7896524
2. 論文標題 Oct4 gene expression in primary colorectal cancer promotes liver metastasis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cells Int	6. 最初と最後の頁 7896524
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2019/7896524.	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 Fujino Shiki, Miyoshi Norikatsu, Ito Aya, Yasui Masayoshi, Matsuda Chu, Ohue Masayuki, Uemura Mamoru, Mizushima Tsunekazu, Doki Yuichiro, Eguchi Hidetoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 HNF1A regulates colorectal cancer progression and drug resistance as a downstream of POU5F1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10363
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-89126-2	査読の有無 無
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 Fujino Shiki, Miyoshi Norikatsu, Ito Aya, Yasui Masayoshi, Ohue Masayuki, Ogino Takayuki, Takahashi Hidekazu, Uemura Mamoru, Matsuda Chu, Mizushima Tsunekazu, Doki Yuichiro, Eguchi Hidetoshi	4. 巻 19
2. 論文標題 Crenolanib Regulates ERK and AKT/mTOR Signaling Pathways in RAS/BRAF-Mutated Colorectal Cancer Cells and Organoids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 812 ~ 822
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1541-7786.MCR-20-0600	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 0件）

1. 発表者名 藤野志季, 三吉範克, 荻野崇之, 高橋秀和, 植村守, 松田宙, 水島恒和, 森正樹, 土岐祐一郎
2. 発表標題 Crenolanib suppresses colorectal cancer progression and the tumor microenvironment
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miyoshi N., Fujino S., Sasaki M., Saso K., Takahashi H., Haraguchi N., Hata T., Matsuda C., Mizushima T., Mori M., Doki Y.
2. 発表標題 Colorectal cancer stem cell expressing POU5F1 promotes liver metastasis
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fujino S., Miyoshi N., Fujino S., Takahashi H., Haraguchi N., Hata T., Matsuda C., Yamamoto H., Mizushima T., Mori M., Doki Y.
2. 発表標題 2D organoid (2D0) as human tumor model for predicting therapeutic effect of anti-cancer drugs
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2019
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
---------------------------	-----------------------	----

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