

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09049

研究課題名(和文) 肝胆膵領域癌におけるLGR5を標的としたSTAT3活性抑制による新規治療の開発

研究課題名(英文) Development of a new therapy targeting LGR5-induced STAT3 activation in hepato-biliary-pancreatic cancer

研究代表者

久保木 知 (Satoshi, Kuboki)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：50571410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肝内胆管癌において、LGR5発現は -catenin活性・OLFM4発現・STAT3活性と正の相関、GRIM19発現と負の相関を示し、独立した予後不良因子であった。細胞実験では、Wntシグナル抑制により -catenin活性が低下し、OLFM4発現低下およびGRIM19発現増強を介してSTAT3活性が亢進した。同様の結果が肝細胞癌でも得られた。以上より、肝胆膵領域癌において、LGR5を介したWnt- -cateninシグナルがOLFM4-GRIM19カスケードを介してSTAT3活性を亢進し、腫瘍悪性度を高めることが示され、LGR5は有用な予後予測因子および治療標的因子となりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

STAT3活性は肝胆膵領域癌を含む様々な癌腫でEMTや癌幹細胞能を亢進して腫瘍進展を促進する強力かつ主要な因子として知られるが、STAT3活性を根本的に抑制することは個体死を引き起こすため治療に結びついていない。LGR5はWnt- -cateninシグナルを亢進させることでいくつかの癌種で腫瘍進展を促進することが示唆されており、それにはSTAT3活性調節が関与することが指摘されているが、肝胆膵領域癌におけるLGR5発現およびその意義に関する報告は今まで存在しなかった。今回、LGR5を介したSTAT3活性調節が腫瘍進展を制御できることを示したため、新たなSTAT3活性調節治療の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：In patients with ICC, LGR5 expression was correlated with activation of -catenin and STAT3, and negatively correlated with GRIM19 expression. Moreover, high LGR5 expression was an independent predictor for poor prognosis. In vitro, inhibition of Wnt signaling suppressed -catenin activation, which resulted in decreased OLFM4 expression and increased GRIM19 expression, leading to STAT3 inactivation. Similar results were seen in HCC. These results suggested that LGR5-induced Wnt- -catenin signaling activated STAT3 through OLFM4-GRIM19 cascades, which resulted in enhanced tumor progression; therefore, LGR5 was an excellent factor for poor prognosis and a useful therapeutic target in patients with hepato-biliary-pancreatic cancer.

研究分野：肝胆膵外科

キーワード：STAT3 LGR5 OLFM4 GRIM19 EMT 癌幹細胞能 Pin1

1. 研究開始当初の背景

肝胆膵領域癌は外科手術が進歩した現在でも未だ予後不良な疾患であり、新たなバイオマーカーの探索や分子標的治療の開発が急務である。STAT3 活性亢進は cell cycle 亢進を介して腫瘍細胞増殖を促進し、apoptosis を抑制することで cell survival を維持し、EMT を誘導することで腫瘍浸潤を誘導する結果、腫瘍悪性度を高める。また、STAT3 活性亢進は anoikis 耐性を誘導することで cancer stem cell-like property を高め、化学療法抵抗性や術後再発に関与することが示唆される。本研究施行に先立った我々のデータでも STAT3 活性が高い肝細胞癌患者のほうが予後不良であること、胆嚢癌において STAT3 活性亢進は Vimentin 発現を増強させ、EMT を誘導する結果、MMP-9 発現を亢進させて腫瘍浸潤能を高めること、が示されていた。しかし STAT3 の完全抑制は個体死を惹起するため、現時点では STAT3 を調節する因子を標的とした癌治療は臨床応用に至っていない。我々は腫瘍特異的に STAT3 活性を抑制する上流因子として OLFM4-GRIM19 シグナルに着目し、肝細胞癌において OLFM4 は GRIM19 を抑制することで STAT3 活性を亢進することを報告し、同シグナルは有用な新規治療標的となり得ることを示した。しかし腫瘍特異的に OLFM4 を抑制する薬物は存在せず、同シグナルの腫瘍進展促進機序は解明されておらず、本研究では OLFM4 発現を調節することが示唆される Wnt- β -catenin シグナルを β -catenin 活性亢進を介して促進する LGR5 を標的として LGR5 の OLFM4-GRIM19-STAT3 シグナル調節を介した抗腫瘍効果の詳細を評価した。また、LGR5 は stemness marker としても知られるため、LGR による STAT3 活性の cancer stem cell-like property や癌免疫への関与も検討した。

2. 研究の目的

本研究では、LGR5 を介した Wnt- β -catenin シグナル亢進が OLFM4-GRIM19 シグナルを介して STAT3 活性を亢進させ得ることを証明し、STAT3 が増殖・浸潤・転移能を高め、cancer stem cell-like property を促進し、宿主の癌免疫を抑制することで腫瘍悪性度を高める機序の解明を目指した。更には同シグナル抑制が腫瘍進展を抑制し得るかを *in vitro* および *in vivo* で評価し、新規分子標的治療の開発を目指した。

3. 研究の方法

根治手術を施行した肝胆膵領域癌の癌部及び非癌部組織を採取し、whole tissue lysate を抽出した。LGR5・ β -catenin・p-STAT3(Tyr705)・OLFM4・GRIM19・Pin1 などの発現を免疫染色・western blot にて評価。腫瘍内 LGR5 発現と臨床病理学的因子や根治手術後の予後との関連を比較した。免疫染色や western blot などで Ki-67・cyclin D・CD34 などを評価し、cell cycle や腫瘍血管新生に及ぼす影響を検討した。EMT や浸潤能への影響を Vimentin・E-cadherin・MMP-9 などの発現にて評価した。さらには CD133・EpCAM 発現などを評価することで LGR5 の cancer stem cell-like property や癌転移への関与を評価した。癌部における PD-L1 発現・周辺部での CD8+ T リンパ球発現を評価し、細胞性免疫能を予後・臨床病理学的因子・LGR5 発現などと比べることで LGR5 による PD-L1 発現を介した癌免疫逃避機序を解明した。

また、代表的な肝細胞癌細胞株 (HuH-7・HepG2)、肝内胆管癌細胞株 (HuCCCT・HuH28)、胆嚢癌細胞株 (NOZ-1103・OCOG-1)を使用し、LGR5 を siRNA knockdown して、cell lysate 及び nuclear extract を抽出し、EMSA や western blot にて前述の各因子を評価しすることで、cell cycle・EMT・apoptosis・stemness などへの影響を評価した。さらには、LGR5 overexpression 細胞における腫瘍進展能も評価した。癌細胞株における PD-L1 発現を評価し、炎症性シグナル亢進と PD-L1 発現との関連を LGR5 に着目した。

そして、Wnt- β -catenin シグナルの inhibitor である IWP-2 による癌細胞刺激が、LGR5 knockdown と同様の抗腫瘍効果を発揮することを示し、Wnt inhibitor による LGR5- β -catenin シグナル抑制の分子標的治療としての可能性を追求した。

4 . 研究成果

HCC における OLFM4 高発現は腫瘍径増大、Ki-67 高値、門脈浸潤陽性と相関し、全生存率・無再発生存率ともに有意に不良であった。一方 GRIM19 高発現は腫瘍径増大、Ki-67 高値、門脈浸潤陽性と逆相関し、全生存率・無再発生存率ともに有意に良好であった。OLFM4 発現と GRIM19 発現は逆相関し、OLFM4 高発現は HCC 術後の独立した予後不良因子であった。HCC における STAT3 活性は OLFM4 発現と正相関、GRIM19 発現と逆相関を示した。また、Wnt シグナルレセプターである LGR5 発現や HCC 癌幹細胞マーカーである CD133 発現と正相関を示した。HCC 細胞株にて臨床検体の結果を確認すると、OLFM4 は GRIM19 発現を低下させることで STAT-3 活性を亢進し、腫瘍増殖能及び anoikis 抵抗性を増強して apoptosis を抑制して HCC 細胞の悪性度を高めた。さらには LGR5 抑制や Wnt シグナル阻害剤投与により OLFM4 発現は低下し、癌幹細胞能が抑制された。

肝内胆管癌の臨床検体において、LGR5 発現は β -catenin 活性・OLFM4 発現・STAT3 活性と正の相関、GRIM19 発現と負の相関を示した。LGR5 高発現症例では EMT や cancer stem cell (CSC)-like property が増強しており、多変量解析にて LGR5 高発現は独立した予後不良因子であった。細胞実験では、IWP-2 による Wnt シグナル抑制により β -catenin 活性が低下し、OLFM4 発現低下および GRIM19 発現増強を介して STAT3 活性が亢進した。その結果、vimentin、MMP-2、EpCAM、CD133 の発現低下を認め、3D culture、invasion assay、anoikis assay において浸潤能、stemness の低下を認めた。よって、Wnt- β -catenin シグナルが OLFM4-GRIM19 カスケードを介して STAT3 活性を亢進し、EMT や CSC-like property を促進する結果、腫瘍悪性度を高めることが示された。LGR5 ノックダウン細胞では β -catenin 活性が著明に抑制され、その結果、STAT3 活性低下を介して浸潤能、stemness が低下した。以上より、LGR5 は Wnt シグナルによって細胞内で複合体より遊離された β -catenin の活性化に重要な役割を担っていると考えられ、LGR5 により活性化された β -catenin シグナルが OLFM4-GRIM19 カスケードを介して STAT3 活性を亢進し、EMT や CSC-like property を促進すると考えられた。また、Pin1 が β -catenin の安定化に寄与するため、同シグナル亢進に必須であった。更には、胆嚢癌において転写因子活性亢進は PD-L1 発現を誘導するが示された。

以上より、肝胆膵領域癌において、LGR5 を介した Wnt- β -catenin シグナルが OLFM4-GRIM19 カスケードを介して STAT3 活性を亢進し、EMT や CSC-like property を促進する結果、腫瘍悪性度を高めることが示され、LGR5 は肝胆膵領域癌において有用な予後予測因子および治療標的因子となり得ることが示唆された。また、Pin1 を抑制すること

で、間接的に LGR5-STAT3 シグナルを制御できる可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 0件）

1. 著者名 Kawasaki K, Kuboki S, Furukawa K, Takayashiki T, Takano S, Ohtsuka M	4. 巻 4
2. 論文標題 LGR5 induces -catenin activation and augments tumour progression by activating STAT3 in human intrahepatic cholangiocarcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Liver International	6. 最初と最後の頁 865-881
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/liv.14747.	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 Sato N, Sakai N, Furukawa K, Takayashiki T, Kuboki S, Takano S, Ohira G, Miyauchi H, Matsubara H, Ohtsuka M.	4. 巻 12
2. 論文標題 Tumor-suppressive role of Smad ubiquitination regulatory factor 2 in patients with colorectal cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5495
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-09390-8.	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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤 豊, 久保木 知, 古川 勝規, 高屋敷 吏, 高野 重紹, 鈴木 大亮, 酒井 望, 賀川 真吾, 細川 勇, 三島 敬, 小西 孝宜, 大塚 将之
2. 発表標題 進行胆嚢癌におけるPD-L1発現の臨床的意義
3. 学会等名 第121回日本外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久保木 知, 古川 勝規, 高屋敷 吏, 高野 重紹, 鈴木 大亮, 酒井 望, 細川 勇, 三島 敬, 小西 孝宜, 西野 仁恵, 大塚 将之
2. 発表標題 肝胆道癌において炎症性シグナルを介した転写因子活性亢進は浸潤・転移能を高めることにより腫瘍進展を促進する
3. 学会等名 第122回日本外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川崎 圭史, 久保木 知, 吉富 秀幸, 古川 勝規, 高屋敷 史, 高野 重紹, 鈴木 大亮, 酒井 望, 賀川 真吾, 三島 敬, 中台 英里, 小西 孝宣, 大塚 将之
2. 発表標題 LGR5-WntシグナルはSTAT3活性亢進を介して肝内胆管癌のstemness及びEMTを促進することにより腫瘍悪性を高める
3. 学会等名 第120回日本外科学会総会
4. 発表年 2020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
研究分担者	高屋敷 史 (Takayashiki Tsukasa) (30456024)	千葉大学・大学院医学研究院・講師 (12501)	
研究分担者	酒井 望 (Sakai Nozomu) (70436385)	千葉大学・医学部附属病院・助教 (12501)	
研究分担者	大塚 将之 (Ohtsuka Masayuki) (90334185)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	
研究分担者	鈴木 大亮 (Suzuki Daisuke) (90422229)	千葉大学・大学院医学研究院・助教 (12501)	

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