

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07216

研究課題名（和文）転写調節CDK阻害薬による大腸癌の癌幹細胞性の抑制

研究課題名（英文）Suppression of colorectal cancer stemness by transcription-related CDK inhibitors

研究代表者

堀 一也 (Hori, Kazuya)

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：50749059

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）：これまでの解析から、転写調節サイクリン依存性キナーゼの一つであるCDK9またはCDK12/13に対する阻害薬により大腸がんのがん幹細胞性が顕著に抑制されることが分かった。しかし、化学療法薬である5-Fluorouracilによっては大腸がんのがん幹細胞性は抑制されないことが分かった。一方で、トポイソメラーゼ阻害薬のIrinotecanや白金製剤であるOxaliplatinは、大腸がん細胞のがん幹細胞性を抑制することが分かった。従って、IrinotecanやOxaliplatinとCDK12/13阻害薬との併用が、大腸癌の治療薬方法となる可能性があると思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌は日本において罹患率の高いがん種である。大腸癌の薬物治療では、葉酸代謝拮抗薬である5-Fluorouracil、白金製剤であるOxaliplatin、およびトポイソメラーゼ阻害薬のIrinotecanが用いられているが、薬物治療後の再発が課題となっている。がん幹細胞が再発の原因の要因のひとつと考えられており、がん幹細胞性を抑制できる抗がん薬の開発が必要である。本研究課題では、その候補として、転写調整サイクリン依存性キナーゼであるCDK9またはCDK12/13に対する阻害薬を見出した。従って、CDK12/13阻害薬とこれまでの抗がん薬の併用が、大腸癌の治療薬方法となる可能性があると思われる。

研究成果の概要（英文）：In this research project, we have aimed to develop a pharmaco-therapeutic strategy that suppresses the cancer stemness of colorectal cancer cells. We have found that inhibitors targeting CDK9 or CDK12/13, transcription-regulating cyclin-dependent kinases, significantly suppress the cancer stemness of colorectal cancer. We also found that the chemotherapeutic agent 5-Fluorouracil does not suppress the cancer stemness. On the other hand, the topoisomerase inhibitor Irinotecan and the platinum-based drug Oxaliplatin suppress the cancer stemness of colorectal cancer cells. Therefore, a combination therapy of Irinotecan or Oxaliplatin with CDK12/13 inhibitors may be a potential treatment strategy for colorectal cancer.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：大腸がん がん幹細胞性 転写CDK

## 1. 研究開始当初の背景

大腸がんは、現在、日本において罹患率の高いがん種のひとつである。大腸がんの薬物の標準治療では、葉酸代謝拮抗薬である5-フルオロウラシル、白金製剤であるオキサリプラチン、およびトポイソメラーゼ阻害薬のイリノテカンが用いられているが、薬物治療後の再発が課題となっている。がん幹細胞が再発の原因の要因のひとつと考えられており、がん幹細胞性を抑制できる抗がん薬の開発が必要である。

がん幹細胞は、がんの悪性化と再発の原因のひとつであると考えられており、がん幹細胞を標的とした分子標的治療薬の開発が試みられている。大腸がんでは、がん幹細胞性を維持する最重要因子である  $\beta$ -catenin・TCF4 複合体の阻害薬が、その候補として検討されているが、臨床適用には至っていない。したがって、 $\beta$ -catenin・TCF4 複合体に代わる標的分子を同定することが打開策と考えられる。申請者らは最近、腸上皮細胞の分化に不可欠なホメオボックス転写因子 CDX2 が、大腸がんの癌幹細胞性を抑制することや、その機序としてがん幹細胞性維持に関わる遺伝子の転写伸長の初期における保留状態 Promoter proximal pausing を直接的に強化することを発見した。重要なことに、その Promoter proximal pausing が、大腸がんのがん幹細胞性の維持に不可欠な機能であることや、安定化型  $\beta$ -catenin の下流として主要な過程であることも発見した。本研究では、上記の発見に基づいて、Promoter proximal pausing の前後の転写素過程を制御する、転写調節サイクリン依存性キナーゼや BET ファミリータンパク質に対する阻害薬などを用いて、大腸がんのがん幹細胞性の抑制を試みる。これらの研究を通じて、大腸がんの根治を達成できる薬物治療戦略の提案を目指す。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、転写調節サイクリン依存性キナーゼ CDK の阻害薬の中から、大腸がんのがん幹細胞性を抑制する薬を探索する。また、転写調節サイクリン依存性キナーゼ CDK の中から、大腸がんのがん幹細胞性の調節に働くものを同定する。とくに、CDK9 や CDK12/13 に着眼して解析を進める。次に大腸がんのがん幹細胞性を抑制するための転写調節サイクリン依存性キナーゼ阻害薬の最適な組み合わせを探索する。転写調節サイクリン依存性キナーゼ阻害薬と従来の化学療法薬との併用により、がん幹細胞性の抑制効果が、増強するのかなどを解析する。また、従来の化学療法薬抵抗性の大腸がん細胞における転写調節サイクリン依存性キナーゼ阻害薬の効果を明らかにする。

## 3. 研究の方法

実験1：大腸がんのがん幹細胞性を抑制する転写調節サイクリン依存性キナーゼ阻害薬の探索

本課題で候補とする転写調節サイクリン依存性キナーゼ阻害薬は、次の通りである。CDK7 阻害薬 (THZ1, BS181)、CDK8 阻害薬 (MSC2530818)、CDK7/8/9 阻害薬 (LY2857785)、CDK9 阻害薬

( Atuveciclib, LDC000067 )、CDK7/8/9/12/13 阻害薬 ( Dinaciclib )、CDK12/13 阻害薬 ( THZ531 )、BET 阻害薬 ( JQ1 )、および、化学療法薬 ( 5-フルオロウラシル、オキサリプラチン、イリノテカン )、また、ヒト大腸癌細胞株 ( HT29 と DLD1 ) を使用する。

まず、細胞を処理する阻害薬の濃度を決定する。これについては、化学療法薬 ( 5-フルオロウラシル、オキサリプラチン、イリノテカン ) についても実施する。生体に投与する際の有害作用の発生を低減させるために、少なくとも大腸癌細胞の増殖を完全には抑制しない濃度を用いる。

細胞を培養レベルで、転写調節サイクリン依存性キナーゼ阻害薬により処理する。一定期間の阻害薬処理により、がん細胞のがん幹細胞性を制御できるかを調べるために、大腸がん細胞株を各転写調節サイクリン依存性キナーゼ阻害薬で 6 日間処理した後、薬を除去してさらに 7-10 日間培養する。

さらに、各転写調節サイクリン依存性キナーゼ阻害薬で処理した細胞のがん幹細胞性 ( 造腫瘍性 ) を解析する。がん幹細胞性を定量的に解析するために、各転写調節サイクリン依存性キナーゼ阻害薬で処理した大腸がん細胞を免疫不全動物の皮下に異種移植し、造腫瘍性を調べる。前述の通り、各転写調節サイクリン依存性キナーゼ阻害薬で処理したがん細胞を移植した個体に阻害薬の投与はしない。1-2 ヶ月程度経過観察を行い、腫瘍の大きさや病理像を解析する。実験 1 により、THZ531 と Dinaciclib に加えて、大腸癌の癌幹細胞性を抑制する阻害薬を見つける。

#### 4 . 研究成果

CDK7 阻害薬 ( THZ1, BS181 )、CDK8 阻害薬 ( MSC2530818 )、CDK7/8/9 阻害薬 ( LY2857785 )、CDK9 阻害薬 ( Atuveciclib, LDC000067 )、CDK7/8/9/12/13 阻害薬 ( Dinaciclib )、CDK12/13 阻害薬 ( THZ531 )、BET 阻害薬 ( JQ1 )、および、化学療法薬 ( 5-フルオロウラシル、オキサリプラチン、イリノテカン ) で処理して解析したところ、とくに CDK9 または CDK12/13 に対する阻害薬で処理した大腸がん細胞株 HT29 では、大腸がんのがん幹細胞性が顕著に抑制されることが分かった。しかし、化学療法薬である 5-フルオロウラシルにより処理した HT29 細胞では、大腸がんのがん幹細胞性は抑制されることが分かった。すなわち、細胞の増殖を抑制するだけでなくがん幹細胞性を抑制できないことが分かった。一方で、オキサリプラチンまたはイリノテカンは、大腸がん細胞のがん幹細胞性を抑制することが分かった。それぞれの腫瘍を組織学的に解析した結果、細胞分化の特徴を示す腺管構造が多く観察された。したがって、抗がん薬の中には、がん幹細胞性を抑制するものと、抑制しないものがあることが分かった。また、CDK12/13 阻害薬による大腸がんのがん幹細胞性の抑制について解析したところ、CCNK の抑制により、大腸がんのがん細胞性のマーカーとなる遺伝子の発現が抑制され、細胞の増殖などが抑制されることが分かった。すなわち、CDK12/13 阻害薬とこれまでの抗がん薬の併用が、大腸癌の治療薬方法となる可能性があると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Aoki Koji, Nitta Akari, Igarashi Ayumi	4. 巻 43
2. 論文標題 NELF and PAF1C complexes are core transcriptional machineries controlling colon cancer stemness	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 566 ~ 577
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-023-02930-0	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 -

1. 著者名 Yamashita Yoshihiro, Tokunaga Akinori, Aoki Koji, Ishizuka Tamotsu, Uematsu Hideyuki, Sakamoto Hiroaki, Fujita Satoshi, Tanoue Shuichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Assessing the Safety of Mechanically Fibrillated Cellulose Nanofibers (fib-CNF) via Toxicity Tests on Mice: Single Intratracheal Administration and 28 Days' Oral Intake	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Toxics	6. 最初と最後の頁 121 ~ 121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/toxics12020121	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1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 青木耕史
2. 発表標題 Mechanism that controls colon cancer stemness, via PAF1 complex through a competition between b-catenin and CDX2
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

福井大学医学部薬理学分野ホームページ  
<https://www.med.u-fukui.ac.jp/laboratory/pharmacology/>

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	青木 耕史  (AOKI Koji)  (40402862)	福井大学・学術研究院医学系部門・教授    (13401)	

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