

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20822

研究課題名（和文）放射線治療耐性がん細胞の分子メカニズム解析

研究課題名（英文）Analysis of molecular mechanisms of radiotherapy-resistant cancer cells

研究代表者

林 理絵（Hayashi, Rie）

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30966536

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、大腸癌細胞株およびオルガノイドを用いて、放射線および化学療法の耐性メカニズム解明と癌幹細胞との関連の検討を行うことを目的として研究を開始した。大腸癌細胞株で放射線照射を行ったところ、CD44^{high}の集団が残ることが判明した。一方、大腸癌オルガノイドに放射線照射を行ったところ、照射量が増すにつれてCD44^{high}に加えてCD44^{low}の集団も新たに出現することが同定された。さらに、幹細胞マーカーの変化に関して、CD44は化学療法投与後に低値を示した。また、POU5F1は幹細胞性に関連して化学療法抵抗性に関与していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

術後再発や局所進行等の難治性大腸癌に対して放射線化学療法を行うが、効果に乏しい症例も多い。これらは、耐性獲得が臨床的に大きな問題であり、腫瘍細胞の可逆性および不均一性が影響していると考えられている。癌細胞株は増殖能を獲得した比較的均一な細胞であることから、実験結果と実臨床の結果が一致しないという問題がある。一方オルガノイドは臨床検体から直接樹立された初代培養細胞であり、癌の増殖や転移に関わる新しいメカニズムの解明につながるマテリアルとして期待されている。本研究ではオルガノイドを用いて放射線耐性や化学療法耐性のメカニズム解明を目指した研究であり、癌根治に繋がる意義ある研究と考えている。

研究成果の概要（英文）：This study was initiated to clarify the mechanisms of resistance to radiation and chemotherapy and to examine the association with cancer stem cells using colorectal cancer cell lines and organoids.

When irradiation was performed on colon cancer cell lines, it was found that a CD44^{high} population remained. On the other hand, irradiation of colon cancer organoids identified a new CD44^{low} population in addition to the CD44^{high} population as irradiation dose increased.

Furthermore, with respect to changes in stem cell markers, CD44 was lower after chemotherapy administration. POU5F1 was also shown to be involved in chemotherapy resistance in relation to stemness.

研究分野：消化器病

キーワード：オルガノイド 放射線療法耐性 化学療法耐性 初代培養 大腸癌 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

術後再発や局所進行等の難治性大腸癌に対して放射線化学療法を行うが、効果に乏しい症例も多い。これらは、耐性獲得が臨床的に大きな問題であり、腫瘍細胞の可逆性および不均一性が影響している。不均一性には癌幹細胞が関与しており、治療後も幹細胞が残存し再発に至るという報告もある。耐性メカニズムは、癌幹細胞と密接に関連していると考えられる。

初代培養細胞はより生体内のがんに近く、がんの増殖や転移に関わる新しいメカニズムの解明や新規治療薬の開発につながるとされている。我々のグループでは、患者の臨床検体から癌細胞の多様性を保持したまま in vitro で安定的に 2D/3D で培養するオルガノイドを構築し、研究を行ってきた。癌細胞株は増殖能を獲得した比較的均一な細胞で、生体内のがんとは異なることから、実験結果と実臨床の結果が一致しないという問題があった。一方、オルガノイドは臨床検体から直接樹立された初代培養細胞であり、臨床における癌の増殖や転移に関わる新しいメカニズムの解明や新規治療薬の開発につながるマテリアルとして近年期待されている。樹立と解析結果の再現性が乏しいことからオルガノイドを研究に使用できる施設はまだ少ないが、我々は大腸癌において安定的な培養法を確立し、その研究成果を報告してきた (特願 2016-144706)。オルガノイドでの多様性を活用することで、耐性メカニズムの解明に繋がる可能性が高い。また、自己複製能・多分化能・造腫瘍性が強い癌幹細胞は薬剤耐性や高転移性を示すことから、癌根治を妨げている要因の一つと考えられている。耐性と癌幹細胞との関連について、オルガノイドの多様性を用いて解明していく。

2. 研究の目的

放射線および化学療法耐性に関して癌細胞株での報告はあるが、臨床検体とキャラクターが異なることが実臨床への応用の障壁となっている。樹立が困難であり、生体内の癌環境に類似したオルガノイドを使用しての耐性は詳細な検討がされていない。我々のグループは、先行研究で確立した 2D/3D オルガノイドにおいて、解析手法に適した培養選択が可能となった。このオルガノイドを使用し放射線耐性を検証した結果、照射量が増加するに従い、CD44low の集団が新たに出現していることから、我々は治療によって新たな population が発現したと予想している。既報では放射線化学療法に生き延びた癌幹細胞が増殖し、腫瘍再発に至ると考えられているが、我々はそれに加えて、治療を加えたことで新たな集団が形成され、その集団が癌幹細胞をサポートし、腫瘍の再発・転移に関与していると考えている。この癌幹細胞をサポートする細胞を Prompter cancer stem cell と命名し、その機能や分化誘導の過程を特定していく。加えて、化学療法に関しても癌幹細胞と耐性の関連が報告されており、耐性獲得と Prompter cancer stem cell の関連も検討する。

3. 研究の方法

(1) 微小環境での検討

放射線耐性

オルガノイドを用いて、放射線耐性に関与すると考えられる幹細胞マーカーの特定を行う。また、現在特定している CD44high および low を分離して培養し、population 変化を検討する。CD44low 成分発現のメカニズム解明につなげる。

化学療法耐性

化学療法投与量に応じて大腸癌の癌幹細胞マーカーを同様に検討し、その high/low 集団の分布変化が起きるかを調べる。また、投与方法に関しても短期・長期投与や単剤・多剤投与の比較検討を行う。癌細胞株と異なる集団が出現した場合、その由来を同定するため、分離培養を行い、その機能的意義や治療耐性との関連について特定を進めていく。

(2) 動物実験・データ解析

単回の放射線照射で出現した CD44low の分画で腫瘍形成能が高いことが判明している。複数照射により癌幹細胞の分画変化があるか、またマウスに皮下移植を行い、腫瘍形成能を検討する。また、複数照射で耐性獲得したオルガノイドをマウスに同所移植し、腫瘍増大スピードや遠隔転移等の悪性度の変化について評価する。化学療法に関しても population 変化のある分画をマウス移植することで局所での悪性度および遠隔転移のしやすさを検討していく。

(3) 臨床応用

放射線・化学療法による CD44low・high の変化に関与する経路を障害し、腫瘍中の癌幹細胞を抑制することで治療抵抗性の解除を目指す。また、オルガノイドを用いて個人の治療効果予測が可

能となれば、「オーダーメイド医療」の提供となる。

4. 研究成果

本研究では、大腸癌細胞株および大腸癌より樹立した初代培養細胞「オルガイド」を用いて、放射線および化学療法の耐性メカニズム解明と癌幹細胞との関連の検討を行うことを目的として研究を開始した。術後再発や局所進行等の難治性大腸癌に対して放射線化学療法を行うが、効果に乏しい症例も多い。これらは、耐性獲得が臨床的に大きな問題であり、腫瘍細胞の可逆性および不均一性が影響している。不均一性には癌幹細胞が関与しており、治療後も幹細胞が残存し再発に至るといった報告もある。耐性メカニズムは、癌幹細胞と密接に関連していると考えられる。

放射線照射をした癌細胞株では、幹細胞マーカーである CD44^{high} は生き残るといった既報がある。そこで大腸癌細胞株で放射線照射を行ったところ、CD44^{high} の集団が残ることが判明した。一方、大腸癌オルガノイドに放射線照射を行ったところ、照射量が増すにつれて CD44^{high} に加えて CD44^{low} の集団も新たに出現することが同定された。この分画をソートし、マウス皮下に注入すると腫瘍形成能が高いことがわかった。

さらに、化学療法後の耐性メカニズムについても解析をすすめた。幹細胞マーカーの変化に関して、CD44 は化学療法投与後に低値を示した。CD44^{-ve} 集団を選別して培養すると、CD44⁺ve 集団が徐々に出現し、CD44^{-ve} 集団は減少した。CD44^{-ve} 集団は化学療法投与前の CD44⁺ve 集団に由来することが示された。CD44 は多くの細胞に発現しており、細胞接着や遊走、免疫反応におけるリンパ球の動態制御に関与している。腫瘍内に存在する癌幹細胞は CRC 幹細胞マーカーとされる CD44 陽性であり、これらの細胞は化学療法剤に抵抗性を示す。CD44⁺ve 細胞は癌幹細胞として化学療法抵抗性であることが報告されているが、この化学療法後に一過性に出現する特異的な CD44^{-ve} 細胞に関する報告はない。オルガノイドによって、出現する CD44^{-ve} 細胞の濃度は異なる。この集団は低用量の化学療法では出現せず、高濃度で出現するため、我々はこれが耐性の原因であると考えている。本研究では、従来の癌幹細胞に加えて CD44^{-ve} 細胞が腫瘍内に存在し、化学療法の濃度と腫瘍全体のストレスが上昇したときに出現するこれらの細胞が、腫瘍の増殖と化学療法剤投与後の抵抗性に関与しているという仮説を立てた。CD44^{-ve} 細胞は再び定着し、元の（親）集団と同様の集団を形成するが、おそらく CD44^{-ve} 集団にはがん幹細胞を誘導する細胞が含まれていると考えられた。化学療法後、CD44^{-ve} 細胞は親株内の CD44⁺ve 細胞から派生した可能性がある。これらの結果は、出現した CD44^{-ve} 細胞が化学療法前の CD44⁺ve 細胞に由来することを示しており、これまでの報告と一致している。このことは、出現した集団が薬剤耐性を引き起こす真の癌幹細胞であることを示唆している。化学療法後、CD44^{-ve} 細胞は CD44⁺ve 細胞よりも増殖能が高く、悪性度が高い。Single cell 解析では、CD44^{-ve} 細胞集団の中で POU5F1 (OCT4) を発現する細胞の割合が高く、*in vivo* での POU5F1 に対する 5-FU などの化学療法投与後に高い幹細胞性を示した。POU5F1 は一過性の CD44^{-ve} 細胞で高発現しており、POU5F1 を抑制することで、化学療法剤投与後の再発・再燃を予防する治療につながると考えられる。化学療法後の再発のような難治性腫瘍に対する治療には、増殖性癌細胞だけでなく、CD44(または CD44v9) のような新たな特異的集団を標的とする必要があり、さらなる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------