

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860512

研究課題名(和文)食道扁平上皮癌幹細胞を標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development of a novel therapy targeting cancer stem-like cells in Esophageal Cell Carcinoma

研究代表者

夏井坂 光輝(Natsuzaka, Mitsuteru)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：80642446

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)：癌において癌幹細胞と呼ばれる特殊な細胞集団の存在が明らかとなってきた。癌幹細胞は非常に高い腫瘍形成能を持ち、また、既存の癌治療(抗癌剤、放射線)に対し治療抵抗性である。この癌幹細胞を標的とした新たな治療法を開発することは、癌研究において非常に重要である。本研究ではノッチシグナル経路、TGF経路が食道扁平上皮癌の癌幹細胞の維持に重要であることに着目し、これらのシグナル阻害剤が癌幹細胞に対する新たな治療法として使用できないかを検証した。ノッチシグナル阻害剤、TGF阻害剤を用いることで、癌幹細胞は有意に抑制され、これらの阻害剤が癌幹細胞を標的とした新たな治療法となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem-like cells (CSCs) have been identified in many cancers and are thought to attribute to aggressive tumor behavior. CSCs can self-renew and have extremely high tumor initiating capacity. Furthermore, CSCs are highly invasive and resistant to conventional chemotherapy and radiation. Such characteristics of CSCs lead to recurrence, metastasis and inadequate response to the conventional therapies. A novel therapy targeting CSCs is needed to improve prognosis of Esophageal squamous cell carcinoma (ESCC).

We have reported that Notch and TGF pathways are important in regulation of CSCs in ESCC. We have examined effects of Notch and TGF inhibitors on CSCs in the present study. These inhibitors suppress epithelial-mesenchymal transition (EMT) and significantly reduce CSCs in ESCC both in vitro and in vivo experiments. Notch and TGF pathways could be novel therapeutic targets against CSCs in ESCC.

研究分野：消化器内科

キーワード：食道扁平上皮癌 癌幹細胞 上皮間葉転換 CD44 EMT

## 1. 研究開始当初の背景

癌幹細胞の存在が多く、固形癌においても報告され、癌幹細胞が再発、転移、治療抵抗性に深く関与していることが明らかとなってきた。癌幹細胞を標的とする新規治療法の開発は癌研究において重要な研究課題の一つである。特に食道扁平上皮癌 (ESCC) における癌幹細胞研究は少なく、ESCC における癌幹細胞研究の向上、発展が待たれていた。

代表者は複数の ESCC 細胞株を用いて、CD24Low/CD44High 細胞が ESCC における癌幹細胞であることを見出した。CD24Low/CD44High 細胞は間葉系細胞の形態、性質を有し、各種抗癌剤 (5FU, CDDP) に対し有意に治療抵抗性であった。ヌードマウス、ESCC 細胞株 TE11 を用いた連続腫瘍移植実験では、わずか 10 個の CD24Low/CD44High 細胞で腫瘍形成が認められた。重要なことに、連続腫瘍移植実験で CD24Low/CD44High 細胞は親腫瘍と同性質 (分化度) の腫瘍を再形成した。これらの結果は ESCC において CD24Low/CD44High 細胞が癌幹細胞であることを示唆した。

更に、代表者は ESCC の浸潤部において TGF- $\beta$  を介した上皮間葉移行 (EMT: epithelial-mesenchymal transition) が起こっており、この EMT が ESCC の悪性度、進展に深く関与していることを報告してきた。EMT を起こした間葉系癌細胞が癌幹細胞であることが報告されており、ESCC においても EMT を起こした間葉系癌細胞が癌幹細胞である可能性が考えられた。In vitro の実験系において、ESCC における癌幹細胞である CD24Low/CD44High 細胞の維持、増殖には EMT が重要であり、さらに興味深いことに、この EMT の過程においては TGF- $\beta$  シグナルのみならず Notch シグナルの活性が必須であった。

TGF- $\beta$  シグナルおよび Notch シグナル阻害剤が癌幹細胞を標的とした新たな治療法となる可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

ESCC における癌幹細胞を標的とした新規治療法開発を目的に本研究は遂行された。本研究では TGF- $\beta$  及び Notch シグナルが ESCC における癌幹細胞の維持、増殖に重要であることに着目し、TGF- $\beta$  及び Notch シグナル阻害剤が ESCC 癌幹細胞に与える効果を主に in vivo の実験系を用いて検証した。

## 3. 研究の方法

(1) ESCC 細胞株をヌードマウスに皮下移植し、TGF- $\beta$  及び Notch シグナル阻害剤を投与した。腫瘍増殖を経時的に測定、また、得られた腫瘍から腫瘍細胞を分離し、CD24Low/CD44High 癌幹細胞の割合を FACS にて解析した。

(2) ESCC 細胞株に TGF- $\beta$  を添加し EMT を誘導した。TGF- $\beta$  及び Notch シグナル阻害剤が EMT に及ぼす影響を検討した。

(3) 複数の ESCC 細胞株から

CD24High/CD44Low 細胞および CD24Low/CD44High 細胞をセルソーターを用いて分離。分離された細胞より total RNA を抽出、次世代シーケンサーによる RNA シーケンシング、miRNA の網羅的解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) TGF- $\beta$  及び Notch シグナル阻害剤ともにヌードマウスを用いた腫瘍移植実験において腫瘍増殖を有意に抑制した。腫瘍から腫瘍細胞を分離すると、TGF- $\beta$  及び Notch シグナル阻害剤を用いることで間葉系マーカーの発現は低下し、CD24Low/CD44High 癌幹細胞の比率は減少していた。これらの実験結果は、*in vivo* においても TGF- $\beta$  及び Notch シグナル阻害剤が EMT を抑制することで癌幹細胞を有意に減少させ、結果として腫瘍増殖が抑えられたと考えられた。一方で TGF- $\beta$  及び Notch シグナル阻害剤の効果が認められない ESCC 細胞株もあり、どのような ESCC において TGF- $\beta$  及び Notch シグナル阻害剤が有効であるのかは今後の検討課題である。

(2) TGF- $\beta$  及び Notch シグナル阻害剤ともに TGF- $\beta$  による EMT 誘導を有意に抑制した。食道扁平上皮癌において Notch シグナルは 2 方向性の働きを有し、全くの逆のプロセスである分化、EMT ともに誘導することが明らかとなった。分化と EMT の方向性を決定付けるのが TGF- $\beta$  であるが、TGF パスウェイが分化と EMT の方向性を切り変える詳細なメカニズムは不明である。

(3) 次世代シーケンサーを用いた RNA シーケンシングでは、CD24Low/CD44High 癌幹細胞において有意に発現上昇 (約 500 遺伝子)、発現低下 (約 400 遺伝子) している候補遺伝子を同定した。一方で、次世代シーケンサーを用いた網羅的 miRNA 解析では、間葉系の CD24Low/CD44High 癌幹細胞において miR-200 ファミリーが有意に上昇していた。間葉系細胞における miR-200 ファミリーの上昇は、既報の通りであり、新規の miRNA 同定には至らなかった。

これらの研究結果から、ESCC においては EMT が癌幹細胞の維持、増幅に非常に重要であり、EMT を制御する TGF- $\beta$ 、Notch シグナルは癌幹細胞に対する新規治療法の標的となりえる可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Kinugasa H, Whelan KA, Tanaka K, Natsuizaka M, Long A, Guo A, Chang S, Kagawa S, Srinivasan S, Guha M, Yamamoto K, St. Clair DK, Avadhani NG, Diehl JA, Nakagawa H. Mitochondrial SOD2 regulates epithelial-mesenchymal transition and cell populations defined by differential CD44 expression. *Oncogene*. 2015. DOI:

10. 1038/onc. 2014. 449. (査読有り)

2. Kubota Y, Kawakami H, **Natsuizaka M**, Kawakubo K, Marukawa K, Kudo T, Abe Y, Kubo K, Kuwatani M, Hatanaka Y, Mitsuhashi T, Matsuno Y, Sakamoto N. CTNNB1 mutational analysis of solid-pseudopapillary neoplasms of the pancreas using EUS-guided fine-needle aspiration and next-generation deep sequencing. *J Gastroenterol.* 2015, Volume 50, Issue 2, pp 203-210. (査読有り)

3. Vega ME, Giroux V, **Natsuizaka M**, Liu M, Klein-Szanto AJ, Stairs DB, Nakagawa H, Wang KK, Wang TC, Lynch JP, K Rustgi AK. Inhibition of Notch signaling enhances transdifferentiation of the esophageal squamous epithelium towards a Barrett's-like metaplasia via KLF4. *Cell Cycle.* 2014 Dec 15;13(24):3857-66. (査読有り)

4. Kagawa S\*, **Natsuizaka M\*** (\* contributed equally), Whelan KA, Facompre N, Naganuma S, Ohashi S, Kinugasa H, Egloff AM, Basu D, Gimotty PA, Klein-Szanto AJ, Bass A, Wong K, Diehl JA, Rustgi AK, Nakagawa H. Cellular senescence checkpoint function determines differential Notch1-dependent oncogenic and tumor suppressor activities. *Oncogene.* 2014. DOI: 10. 1038/onc. 2014. 169 . (査読有り)

5. Suda G, Yamamoto Y, Nagasaka A, Furuya K, Kudou M, Chuganji Y, Tsukuda Y, Tsunematsu S, Sato G, Terashita K, Nakai M, Horimoto H, Sho T, **Natsuizaka M**, Ogawa K, Ohnishi S, Chuma M, Fujita Y, Abe R, Taniguchi M, Nakagawa M, Asahina Y, Sakamoto N for the NORTE study group. Serum granulysin levels as a predictor of serious telaprevir-induced dermatological reaction. *Hepatology Res.* 2014. DOI: 10. 1111/hepr. 12421 . (査読有り)

6. Tsunematsu S, **Natsuizaka M**, Fujita H, Otsuka N, Terashita K, Sato F, Kobayashi T, Nakai M, Tsukuda Y, Horimoto H, Sho T, Suda G, Nakanishi M, Hashino S, Chuma M, Sakamoto N. Hepatosplenic Gamma-delta T-cell Lymphoma Associated with Epstein-Barr Virus. *Intern Med.* 2014. 2014;53(18):2079-82. (査読有り)

7. **Natsuizaka M**, Kinugasa H, Kagawa S, Whelan KA, Naganuma S, Subramanian H, Chang S, Nakagawa KJ, Rustgi NL, Kita Y, Natsugoe S, Basu D, Gimotty PA, Klein-Szanto AJ, Diehl JA, Rustgi AK and Nakagawa H. IGFBP3 promotes esophageal cancer growth by suppressing oxidative stress in hypoxic tumor microenvironment. *Am J Cancer Res.* Jan 15;4(1):29-41. 2014. (査読有り)

[学会発表] (計 6 件)

1. **Natsuizaka M**, Maehara O, Sato F, Kubota Y, Suda G, Itoh J, Tsunematsu S, Tsukuda Y, Terashita K, Nakai M, Sho T, Ogawa K, Ohnishi S, Sakamoto N. A pivotal role of KLF5 in regulation of cancer stem-like cells in hepatocellular carcinoma. AASLD the LIVER meeting 2014. John B. Hynes Veterans Memorial Convention Center (Boston, USA) , Nov 7-11, 2014. (ポスター発表)

2. Sato F, **Natsuizaka M**, Ohashi S, Kagawa S, Kuwatani M, Kawakami H, Ohnishi S, Komatsu Y, Kato M, Sakamoto M. EGFR inhibitors suppress epithelial-mesenchymal transition and diminish cancer stem-like cells in esophageal squamous cell carcinoma. 第73回日本癌学会学術総会 2014年9月25日~9月27日 パシフィコ横浜 (横浜市)、(口演発表)

3. **Natsuizaka M**, Kaimila B, Kubota Y, Hatanaka Y, Marukawa K, Terashita K, Sato F, Ohnishi S, Suda G, Ohashi S, Kagawa S, Whelan K, Rustgi AK, Nakagawa H, Sakamoto N. EGFR inhibitors eliminate esophageal cancer stem cells by suppressing epithelial-mesenchymal transition. Digestive Disease Week and the 115th annual meeting of the American Gastroenterological Association, McCormick Place Convention Center (Chicago, USA) , May 3-6, 2014. (ポスター発表)

4. **Natsuizaka M**, Kagawa S, Whelan K, Ohashi S, Ohnishi S, Suda G, Sakamoto N, Rustgi AK, Nakagawa H. TGF- $\beta$  in tumor microenvironment changes a switch of Notch1-mediated signaling to maintain cancer stem-like cells in esophageal squamous cell carcinoma. An AACR special conference on cellular heterogeneity in the tumor microenvironment. San Diego Convention Center (San Diego, USA) , Feb 26 - Mar 1. 2014. (ポスター発表)

5. **Natsuizaka M**, Ohashi S, Naganuma S, Ohnishi S, Kuwatani M, Kawakami H, Chuma M, Komatsu Y, Kato M, Sakamoto N. TGF- $\beta$  changes a switch of Notch1-mediated signaling to maintain tumor-initiating cells in esophageal SCC (ESCC). 第72回日本癌学会学術総会 2013年10月3日~5日 パシフィコ横浜 (横浜市)、(口演発表)

6. **Natsuizaka M**, Kagawa S, Whelan KA, Chang S, Kinugasa H, Ohashi S, Naganuma S, Sakamoto N, Klein-Szanto AJ, Gimotty PA, Diehl JA, Herlyn M, Rustgi AK, Nakagawa H. Transforming Growth Factor-beta and Notch1 Cooperate to Repress NOTCH3 to Facilitate Epithelial-Mesenchymal

Transition and Tumor Initiating Capability in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Digestive Disease Week and the 114th annual meeting of the American Gastroenterological Association, Orange County Convention Center (Orlando, USA) , May 18-21, 2013. (口演発表)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

夏井坂 光輝 (NATSUIZAKA, Mitsuteru)

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号：80642446

(2) 研究分担者

なし