

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430129

研究課題名(和文) 癌幹細胞の生物学的特性を加味した新しい大腸癌治療戦略の確立

研究課題名(英文) Discovery of druggable targets of colorectal cancers by genomic analysis with cancer stem-like cells

研究代表者

長山 聡(Nagayama, Satoshi)

公益財団法人がん研究会・有明病院 消化器外科・医長

研究者番号：70362499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題の成果は以下の2点である。(1)大腸癌切除検体から各患者固有の大腸癌幹細胞様細胞株213株を樹立した。各細胞株のKRAS, BRAF, PIK3CA, PTEN, APC, beta-catenin, p53などの遺伝子変異状況を明らかにした。(2)これらの細胞株の各種抗腫瘍薬剤(EGFR阻害剤、VRGF阻害剤、FGFR阻害剤、mTOR阻害剤、PI3K阻害剤、MEK阻害剤など)に対する薬剤感受性を検討したところ、Kras変異細胞株では、Krasの下流を抑制するMEK阻害剤を併用することで、薬剤感受性がいくつかの群に分別することができることがわかり、感受性良好群も見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：Aim) Using patient-derived cancer stem-like cell lines from resection samples of colorectal (CR) cancers (CRCs), this study is designed to discover a novel druggable target in the signaling pathway responsible for CRC pathogenesis by combining the drug effectiveness of various kinase inhibitors and the comprehensive proteogenomic analyses. Methods) Genomic mutations were identified by targetry sequencing using new-generation sequencer for 100 genes including KRAS, BRAF, PIK3CA, PTEN, APC and b-catenin which play critical roles in the CR carcinogenesis. Drug responses to various kinds of inhibitors including well-proven inhibitors against EGFR, VEGF, FGFR, mTOR, PI3K and MEK were assessed by in vitro analyses. Results) More than 30 patient-derived cell lines were established from resection samples. A heat map between the 30 different cancer stem-like cell lines with evidence of genomic mutations and the levels of drug sensitivity to the inhibitor library was created.

研究分野：消化器外科

キーワード：大腸癌

1. 研究開始当初の背景

大腸癌に対する治療は、分子標的治療薬の導入と相まって化学療法を中心に、この数年で目覚ましい発展を遂げてきた。再発・進行大腸癌に対する全身化学療法や、再発予防を目的とした術後補助化学療法が予後改善に大きく寄与していることが実証されている。しかしながら、転移・再発病巣の縮小効果が一定期間得られていた場合でも、次第に治療抵抗性となり病巣が再増大し、2次治療、3次治療へと全身化学療法の継続が余儀なくされることもしばしばある。また、術後補助化学療法を行っていても再発を来すことも時々経験される。さらに、どのような患者群に術後補助化学療法を行うのが最も効果的であるかもまだ明確にはされていない。したがって、大腸癌原発巣の臨床病理学的所見ならびに分子生物学的特性から再発・転移のリスクを把握し、それに応じて補助治療を計画すること、および、化学療法に対する耐性の機序を解明し、治療抵抗性を克服することが、今後の大腸癌の治療戦略を成功させるうえで急務の課題である。

現在、様々な分子標的治療薬が盛んに開発され、臨床応用されてきているが、分子標的治療薬を含め化学療法の最大の問題点は、癌細胞を一時的に減少させることは可能であるものの、多くの場合に治療に対して抵抗性(耐性)を獲得した癌細胞が出現する(あるいは、そのような耐性癌細胞群が腫瘍組織内で優勢を占めるようになる)ことであり、この現象が癌の再発・転移を来す重要な原因の一つであろうと推察されている。この現象を説明する上で、正常組織における幹細胞と同様に腫瘍内にも「癌幹細胞」という自己複製能と多分化能を持つ細胞が存在しうることが注目されている(Clevers H, Nature Med 2011)。これらの癌幹細胞は化学療法や放射線治療に対して高い抵抗性を持つと考えられ、癌の再発や転移に関与していると推測されているが、固形悪性腫瘍における癌幹細胞の割合は一般に少ないため、癌幹細胞の癌進展や再発・転移への関与を解析することはかなり困難である。したがって、癌幹細胞を分離・維持した状態で培養する系を確立すると共に、癌幹細胞特異的な治療法を探索することが癌治療を進展させる上で重要である。

マウス小腸 crypt 底部に存在する細胞で発現している Lgr5 という G タンパク質共役受容体が、大腸癌を含めた複数の悪性腫瘍の幹細胞特異的な分子マーカーとしても近年注目されている(Barker N et al. Nature 2007)。一方、大腸癌患者から得られた腫瘍組織を重度の免疫不全マウス(NOG マウス)に対して異種移植し、生着した腫瘍組織を NOG マウスで継代することで原発巣と極めて類似した構造を示す腫瘍を維持しつつ、腫瘍内の癌幹細胞の割合を高めることができ、さらにこれらのマウス Xenograft から Lgr5 発現細胞を分取することで、癌幹細胞様の性質を示す

細胞株を樹立したという報告がある(Kobayashi et al. Stem Cells 2012)。このように、NOG マウスへの異種移植と分子マーカー Lgr5 を利用することで癌幹細胞を単離し、生物学的特性や機能解析を展開することができると考えた。

2. 研究の目的

大腸癌の治療成績を向上させるためには、大腸癌の悪性度(再発・転移のリスク)を把握し、適切な治療戦略を構築すること、化学療法に対する耐性を克服すること、が重要であると考えられる。本研究の主目的は、大腸癌手術検体から各患者由来の癌幹細胞様細胞株を樹立して、以下の2点を行なうことである。

(1)様々な遺伝的背景を持つ複数の大腸癌幹細胞様細胞株のプロファイリングを行い、得られた生物学的特性と臨床病理学的所見とを組み合わせ、大腸癌の悪性度評価を試みる。
(2)樹立した細胞株を利用して癌幹細胞様細胞に特異的に分化・細胞死を誘導する方法を探索し、化学療法に対する耐性を克服する糸口をつかむ。

3. 研究の方法

本申請課題は、(1)大腸癌幹細胞様細胞株の樹立、(2)大腸癌幹細胞様細胞株のプロファイリング、(3)大腸癌幹細胞様細胞株を用いた薬剤耐性克服、という3つの研究からなる。

(1)大腸癌幹細胞様細胞株の樹立

細胞株樹立方法の検討

遺伝的背景や変異などが症例ごとに異なる大腸癌組織からの細胞様細胞株の樹立には、それぞれの特性に応じた細胞単離法と培養法が必要となるかもしれないため、効率の良い樹立法を検討した。

Lgr5 抗体の作製

今回の研究に適した信頼できる市販抗体がないために、ヒト Lgr5 の細胞外領域を抗原としたFACS等に利用可能な抗体を作成することを試みた。Lgr5 のアミノ酸配列から親水性や二次構造予測を行い、抗体作製に適したアミノ酸配列を選択した。この際に、Lgr5 には Lgr4、Lgr6 のホモログが存在するので、より Lgr5 特異的に認識する抗体を作るためにホモログとは共通性の低いアミノ酸配列を選択した。抗原にふさわしいアミノ酸配列を複数回繰り返したベクターを大腸菌に導入し、抗原ペプチドを産生し、回収・精製を行った。回収したペプチドをマウスに免疫後、脾臓細胞を回収してハイブリドーマを作製し、モノクローナル抗体を産生させた。得られた抗体の特異性について Lgr5 及び Lgr4、Lgr6 を発現させた CHO 細胞に対する結合を FACS により検討し、Lgr5 発現 CHO 細胞にのみ反応するものを選択した。

(2)大腸癌幹細胞様癌細胞のプロファイリング

遺伝子変異解析

KRAS, BRAF, PIK3CA, PTEN, APC, catenin など大腸癌において変異が報告されている遺伝子に加えて、The Cancer Genome Atlas (TCGA)、Catalog of Somatic Mutation in Cancer (COSMIC)等のデータベースに登録されている変異遺伝子から約20個を選別し、次世代シーケンサーを用いて、ターゲットシーケンスを行った。由来する大腸癌組織についても遺伝子変異解析を行い、大腸癌幹細胞様癌細胞と比較検討を行った。

遺伝子発現解析

樹立した大腸癌幹細胞様癌細胞株についてマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行い、それぞれの特性を明らかにした。また由来する大腸癌組織についても解析し、クラスタリング解析を行ない、大腸癌幹細胞様癌細胞株と元の大腸癌組織との相関を検討した。

(3) 大腸癌幹細胞様細胞株を用いた薬剤耐性克服

遺伝子変異状況の判明した大腸癌幹細胞様細胞株を用いて、各種抗腫瘍薬剤 (EGFR 阻害剤、VRGF 阻害剤、FGFR 阻害剤、mTOR 阻害剤、PI3K 阻害剤、MEK 阻害剤など) に対する薬剤感受性を評価した。遺伝子変異状況と薬剤感受性を組み合わせた heatmap を作成し、遺伝子変異状況に基づいた各薬剤に対する感受性群・耐性群の選出や、薬剤の併用による薬剤耐性克服の可能性を検証した。

4. 研究成果

(1) 大腸癌幹細胞様細胞株の樹立

細胞株樹立方法の検討

数種類の培養法を検討した結果、癌幹細胞性を持つ細胞が維持される専用培養液と最適条件 (Ohata H, Cancer Res 2012) を応用することで、効率の良い樹立法が確立でき、安定して (60-70%の成功率) 大腸癌細胞株を樹立することが可能となった。これまでに大腸癌切除検体から各患者固有の大腸癌幹細胞様細胞株 213 株を樹立した。

Lgr5 抗体の作製

ハイブリドーマを作製し、モノクローナル抗体を産生させるところまでは実施した。しかしながら、どうしても Lgr5 発現 CHO 細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体を取ることができず、本研究期間中に Lgr5 モノクローナル抗体を自主作成することは断念した。

(2) 大腸癌幹細胞様癌細胞のプロファイリング

遺伝子変異解析

KRAS, BRAF, PIK3CA, PTEN, APC, catenin を含めて合計 100 個を選択し、ターゲットシーケンスを施行した。由来する大腸癌組織についても遺伝子変異解析を行い、大腸癌幹細胞様癌細胞と比較検討を行ったところ、同様の遺伝子変異プロファイルであり、*in vitro* で株化したことによると思われる余剰の遺伝子変異は検討した範囲内では認

められなかった。

遺伝子発現解析

樹立した大腸癌幹細胞様癌細胞株についてマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行い、大腸癌幹細胞様癌細胞株と元の大腸癌組織とで、ほぼ同様の発現プロファイルを示すことを確認した。

(3) 大腸癌幹細胞様細胞株を用いた薬剤耐性克服

遺伝子変異プロファイルが明らかとなった大腸癌幹細胞様細胞株 30 種類を用いて、標的が明確となっている各種抗腫瘍薬剤 (EGFR, VRGF, FGFR, mTOR, PI3K, MEK など) を標的とした阻害剤ライブラリー) に対する薬剤感受性を評価して、薬剤感受性ヒートマップを作製した (図 1)。その結果、特に、Kras 変異細胞株では、Kras の下流を抑制する MEK 阻害剤を併用することで、薬剤感受性がいくつかの群に分別することができることがわかり、感受性良好群も見出すことができた。また、ある薬剤に対して特に感受性の高い細胞株も認められ、その原因を現在解明しているところである。

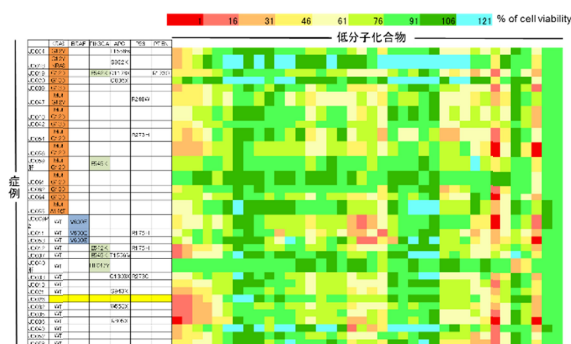


図1 薬剤感受性マップ

【結論】

本研究において樹立された大腸癌幹細胞様細胞株は、薬剤感受性群の選別や薬剤抵抗性の克服を実現するための一助になりうると思われる。さらに多くの大腸癌幹細胞様細胞株がすでに樹立されているので、同様の薬剤感受性評価を行い、大規模な薬剤感受性ヒートマップを作成中である。今回得られたデータを元に、臨床上治療に難渋しうる KRAS 変異型大腸癌症例に対する新たな治療戦略を検証している。KRAS 変異以外の遺伝子変異情報 (BRAF, PIK3CA, p53 など) に基づいた新たな個別化治療への可能性も追求しており、また KRAS 野生型の中の真の感受性群の選別など、化学療法への感受性・抵抗性のより正確な指標も探索中である。今後、リン酸化プロテオミクスも含めた包括的なプロテオゲノムプロファイリングデータを構築する予定としている。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

2017年7月 第72回日本消化器外科学会総会
(ワークショップ)

大腸癌幹細胞培養技術を利用したゲノム解析による大腸癌標的パスウェイの探索

長山聡、片山量平、福長洋介、藤本佳也、小西毅、秋吉高志、長壽寿也、上野雅資、佐野武

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長山 聡 (有明病院消化器外科・医長)

研究者番号：70362499

(2) 研究分担者

片山 量平 (がん化学療法センター・基礎研究部・研究員)

研究者番号：60435542

(3) 連携研究者

()

研究者番号：