

がん幹細胞化に關与する Sphere 形成メカニズムを標的とした革新的治療開発

Development of Innovative Treatment Targeting the Sphere Formation Mechanism Involving Cancer Stem Cells

課題番号：15H05792

前原 喜彦 (MAEHARA YOSHIHIKO)

九州大学・医学研究院・教授



研究の概要

がん幹細胞 (CSC) の代表的な研究手法として sphere formation assay があるが、これは、培養系中の sphere 形成数により CSC の数を定量する方法である。我々は、sphere 形成により細胞に誘導される種々の細胞生物学的な変化を追求する学問分野を「Sphere biology」と命名しているが、本研究では Sphere 形成メカニズムを解明して治療に応用する。

研究分野：医歯薬学

キーワード：癌、外科、細胞・組織、薬剤反応性、トランスレーショナルリサーチ

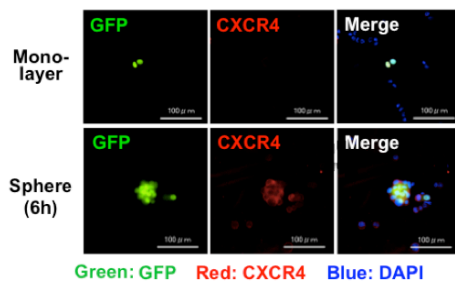
1. 研究開始当初の背景

肉眼的がん消失後の再発は、化学療法や放射線治療などに抵抗性であるがん幹細胞 (CSC) の存在を想定すると説明可能である。CSC の代表的な研究手法として sphere formation assay があるが、これは、培養系中の sphere 形成数により CSC の数を定量する方法である。しかし sphere 形成によるがん細胞の形質変化に関する具体的な分子メカニズムについては不明である。

2. 研究の目的

我々は、sphere 形成により細胞に誘導される種々の細胞生物学的な変化を追求する学問分野を「Sphere biology」と命名し、本研究ではそれをさらに発展・加速させ、がんを難治化へ導く Sphere 形成メカニズムを解明して治療に応用することを目的とする (図1)。

図1 Sphere形成とCXCR4の発現



免疫染色によってCXCR4を検出した。

3. 研究の方法

I. Sphere形成の分子生物学的機序解明

- 1). 網羅的手法による sphere 形成に必要な分子の同定
- 2). 化合物ライブラリーによる Sphere 形成阻害物質の網羅的探索

II. Sphere形成による変化とがん幹細胞の關係の解明

- 1). 下流シグナル伝達についての解析
- 2). ジェネティック、エピジェネティックな変化についての解析
- 3). 遺伝子発現の変化についての解析
- 4). 上記 mRNA, miRNA の機能解析
- 5). 上記 mRNA, miRNA 恒常的発現細胞株の造腫瘍能についての検討

III. 候補標的分子の臨床検体における発現解析

IV. Sphere形成を阻害する革新的治療法の開発

- 1). 遺伝子治療用センダイウイルス (SeV) ベクターの作成
- 2). Sphere 形成阻害剤による創薬

本研究において、Sphere 形成とがん幹細胞の關係やがん幹細胞のニッチを同定し、これらの分子生物学的特性を解析することによって、がん幹細胞を狙い撃ちすることができる治療標的分子を同定する事が可能となる。さらに、既存の治療法と組み合わせることで、がん治療のブレークスルーになりうる可能性がある。

4. これまでの成果

初めて明かされた Sphere 形成に起因する腹膜播種の全貌

がんの難治性に関わるメカニズムとして『Sphere 形成』に着目し、“Sphere Biology”研究を推進することで、その発生機序の解明が囑望されていた消化器がん並びに卵巣がんの最も進行した病態かつ極めて予後不良である腹膜播種の全容を解明するに至った (Kasagi Y, et al. *Cancer Res*, 2016)。

Sphere をターゲットにした化合物スクリーニング技術の創出

Sphere をターゲットとした薬物スクリーニングのためのシステム構築を開始、従来技術と比較して以下の特徴を持つ系を確立した：

1. Scaffoldタイプで成し得なかった均質性
2. サイズ調整でがんの進行度を反映可能
3. ハンギングドロップ法では不可能な試薬の途中添加が可能
4. 非破壊的に sphere 全体の viability を検出可能
5. 高精度

Sphere 形成抑制/破壊が可能な化合物の取得

東大創薬機構より既知化合物ライブラリの提供を受け、sphere 形成阻害/破壊を指標としたテストスクリーニングを実施した結果、およそ 3000 化合物から MEK に対する阻害剤 PD0325901 などを取得した。パクリタキセルをはじめとした種々の抗癌剤に高い抵抗性を示すマウス腹膜播種モデルに対して、PD0325901 は体重に影響を及ぼす事無く播種結節の大幅な縮小および貯留腹水量の減少を示し、顕著な生存期間の延長作用を示した。がん幹細胞株による Niche との相互作用：薬剤耐性メカニズム

平面培養された大腸がん幹細胞株はイリノテカンに暴露されると速やかに Sphere 様のクラスターを自発的に形成し、高い耐性を獲得することが分かった。このクラスター中には SP/non-SP それぞれの細胞が存在する他、複数のタンパク発現を指標とした解析からヘテロな集団であることが明らかとなった。

Sphere 内部で発現する miRNA の役割：悪性化メカニズム

HRE の下流に GFP を結合させたコンストラクトを HCT116 細胞に導入し、single cell cloning を行ったのち、Sphere を形成させ、内部を GFP で標識した状態で sorting を行った。即ち、Sphere の外郭を成す細胞と、中心部で種々のストレスに晒されている細胞とを分取した。それらを用いて発現アレイ解析を行ったところ、Sphere 内部でのみ特異的に発現する miR3148 を特定した。そこで、miR3148 を強制発現する HCT116 細胞の作成を行った。この細胞は、マウス皮下に移植すると親株と比べて増殖速度が速いにも関わらず、*in vitro* で培養した際には親株と明確な差異が観察されないことが判明した。

5. 今後の計画

1. PD0325901 true target 探索

Spheroid に対して破壊作用をもつ化合物は極めて希少であり、3,000 を超える化合物ライブラリーからもわずか2種のみが得られたに過ぎなかった。一方は MEK inhibitor の PD0325901、もう一方は Hsp70 inhibitor として知られる Triptolide である。これら化合物の作用機序には未解明な部分が多く、1). 共通のシグナルカスケードをターゲットにしている可能性、2). オフターゲット効果を含め共通の分子ターゲットを持つ可能性、などが考えられる。そこで、3D スクリーニング時の細胞から遺伝子発現プロファイルを取得し、真のターゲットを明らかにする。

2. がん幹細胞 self niche 仮説の徹底検証

これまでの成果から、極めて抗がん剤に耐性が高いと考えられる集団を濃縮する細胞膜上の分子が明らかになり、抗がん剤存在下で細胞死を誘導されない/極めてされにくい細胞と、その細胞に接触してクラスターを形成・維持している細胞とを生きたまま選別することが可能になったことから、それぞれの特徴・必要性を明らかにし、耐性メカニズムの解明と創薬ターゲットの創出を目指す。

3. Sphere に特徴的な miRNA の機能解明

Sphere 形成時のみに Sphere 内部で発現することが確認された miRNA3148 について、その機能解明のために強制発現株ならびに発現抑制株を作成している。この miRNA がどのようなシグナル伝達を介して腫瘍細胞にストレス耐性を与えるのか、またどのようにしてその発現調節が行われているのか、腫瘍組織のストレス耐性メカニズムの解明する。

4. 臨床検体での検証/普遍性の確認

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Okai E, Okano S, Saeki H, Umemoto Y, Teraishi K, Nakaji Y, Ando K, Zaitsumi Y, Yamashita N, Sugiyama M, Nakashima Y, Ohgaki K, Oda Y, Maehara Y. Protein Expression of Programmed Death 1 Ligand 1 and HER2 in Gastric Carcinoma. *Oncology*. 2017 Sep 15. [Epub ahead of print]

2. Kasagi Y, Okai E, Ando K, Ito S, Iguchi T, Sugiyama M, Nakashima Y, Ohgaki K, Saeki H, Mimori K, Maehara Y. The Expression of CCAT2, a Novel Long Noncoding RNA Transcript, and rs6983267 Single-Nucleotide Polymorphism Genotypes in Colorectal Cancers. *Oncology*. 92:48-54, 2017

3. *Kasagi Y, *Harada Y, Morodomi Y, Iwai T, Saito S, Yoshida K, Okai E, Saeki H, Ohgaki K, Sugiyama M, Onimaru M, Maehara Y, Yonemitsu Y. Peritoneal dissemination requires an Sp1-dependent CXCR4/CXCL12 signaling axis and extracellular matrix-directed spheroid formation. *Cancer Research*. 76:347-357, 2016.

ホームページ等

<http://www.kyudai2geka.com>