

令和2年度シニア・リサーチフェロー
研究成果報告書

令和3年4月1日 提出

公益財団法人 がん研究振興財団
理事長 堀田 知光 殿

報告者氏名：神田 裕介 

研究課題：抗がん剤抵抗性の休止型大腸がん幹細胞を標的とした革
新的治療法の開発
(テーマ) がんの本態解明に関する研究

研究期間： 自 令和2年4月 1日
至 令和3年3月 31日

研究指導者：岡本 康司 

公益財団法人 がん研究振興財団

I 要旨

我々は昨年度シニア・リサーチフェローの支援を受け、ヒト大腸がんオルガノイドのマウス移植腫瘍の1細胞レベルでの発現解析を行い、抗がん剤に対して抵抗性を示す休止型がん幹細胞を同定した。加えて、休止型がん幹細胞の細胞膜表面に特異的に発現するタンパク X の同定にも成功した。本年度では、抗がん剤抵抗性を改善させる新規治療法として、休止型がん幹細胞を標的とした近赤外光線免疫療法の開発を試みた。その結果、膜タンパク X を標的とした近赤外光線免疫療法と既存の抗がん剤である Irinotecan との併用により、ヒト大腸がんオルガノイドの休止型がん幹細胞が壊死する事を明らかにした。

II 序

がん組織に存在するがん細胞は不均一な細胞集団で構成されており、がんの組織不均一性はがんの難治性と関連する事が示唆されている。すなわち、難治がんにおいては、抗がん剤や放射線治療に対して抵抗性を示す幹細胞性を有した細胞集団が存在しており、これらの細胞の生存増殖が治療後の再発の本態であると予想される。特に、白血病からの報告では、がん幹細胞の中でも細胞増殖の極めて遅い休止型幹細胞が存在する事、及びこれらの休止型がん細胞が治療抵抗性の本態である事が示されている。従って、大腸がんや他の固形がんにおいても同様の治療抵抗性細胞群が存在する事を明らかにし、これを標的とした新規の治療法開発はがん征圧において重要な研究課題であると考えられる。

そこで、所属研究室において大腸がん臨床検体から樹立され、がん幹細胞と分化したがん細胞を含むオルガノイド培養系を用いて、休止型がん幹細胞の存在の有無と治療抵抗性との関係性を解明する研究に着手した。休止型細胞の同定には H2B-EGFP 融合タンパクを用いた。一過的に H2B-EGFP を発現させた細胞は、EGFP が分裂毎に希釈され蛍光強度が低下する。そのため、分裂を殆ど行わない休止型細胞は EGFP ラベル保持細胞として可視化・単離できる。そこで、Doxycycline により発現される H2B-EGFP を導入し、一過性に発現させた H2B-EGFP を維持する細胞を休止型細胞と同定する実験系を構築した。誘導型 H2B-EGFP を導入した大腸がんオルガノイドのマウス移植腫瘍を作成し、Irinotecan を腹腔内投与した。その結果、休止型細胞は、非投与の腫瘍よりも Irinotecan 投与後に残存した腫瘍でより高い割合で存在している事を明らかにした。これらの腫瘍から H2B-EGFP 高発現と低発現の細胞をそれぞれ単離し、シングルセル qPCR 解析を実施した結果、休止型細胞は LGR5 等の幹細胞マーカーを発現する事および特徴的に発現する複数の遺伝子を見出した。我々の中でも、休止型がん幹細胞の膜表面に特異的に発現するタンパク X に着目した。本年度では、抗がん剤抵抗性を改善させる新たな治療法として、休止型がん幹細胞に特異的な膜タンパク X を標的とした近赤外光線免疫療法の開発を試みた。

III 実験方法

オルガノイド培養

ヒト大腸がんオルガノイドは、国立がん研究センター中央病院（中央区、東京都）でインフォームドコンセントを受けた患者から切除されたものを使用し、既報（Cell Rep 19: 981-994, 2017., Cancer Res 80: 4451-4464, 2020.）に従い培養した。

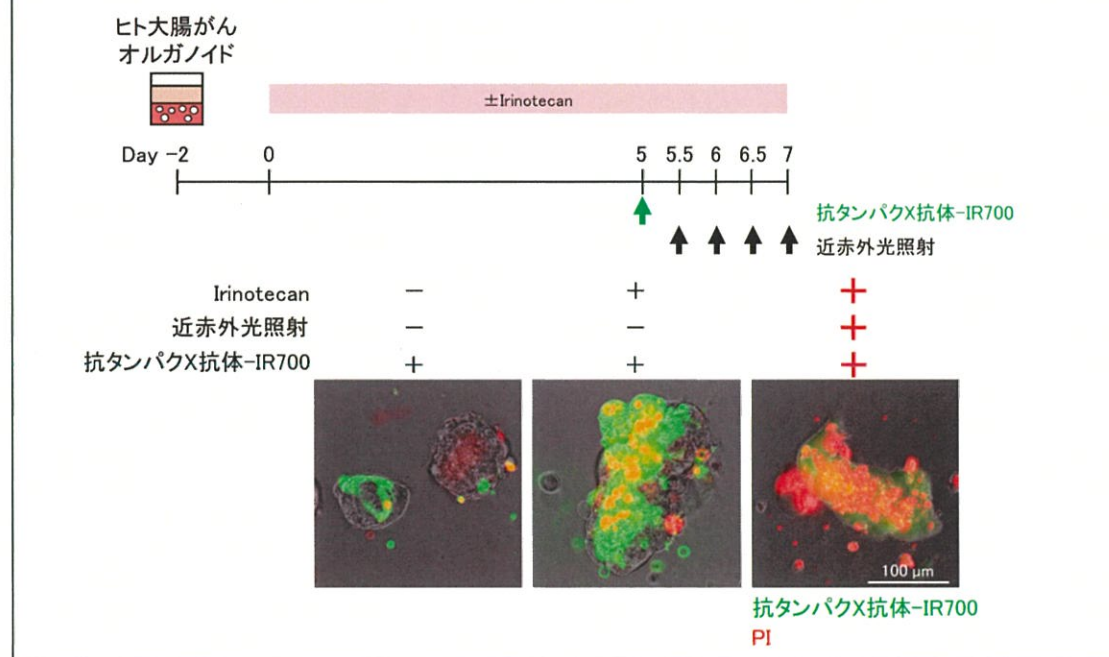
近赤外光線免疫療法

ヒト大腸がんオルガノイドに対する近赤外光線免疫療法および irinotecan 添加培養はそれぞれ既報に従い実施した (Nat Med. 2011 Nov 6;17(12):1685-91., Cancer Res. 2020 Oct 15;80(20):4451-4464.)。

IV 結果

これまでに我々は休止型がん細胞が Irinotecan 処理後に残存する事、および休止型がん幹細胞に特徴的な細胞表面マーカーXを見出してきた。今回、この膜タンパクXを標的とした近赤外光線免疫療法によって休止型がん幹細胞に細胞死を引き起こす事ができるか否かを検討した。近赤外光線免疫療法は、アメリカ国立衛生研究所の小林久隆博士によって開発された、既存のがん治療法のメカニズムとは異なる新規の方法論である。頭頸部がん患者を対象に国際共同第Ⅲ相試験が実施され、2020年には世界に先駆けて国内で製造販売が承認されている。我々は小林久隆博士との共同研究を開始した。光吸収分子 IR700 を結合させた抗体が細胞膜上の抗原に結合した状態で近赤外光を照射すると、抗体-IR700 の構造変化が引き金となり細胞膜が傷害され、細胞質の内容物が漏出して数分以内に壊死性細胞死が生じる。この IR700 を結合させた抗タンパクX抗体で処理した大腸がんオルガノイドに近赤外光を照射する事でIrinotecanとの併用効果を検討した。その結果、抗タンパクX抗体-IR700 が結合した休止型がん幹細胞が死滅する事を見出した(図1)。

図1.膜タンパクXを標的としたNIR-PITによる休止型がん幹細胞の死滅



V 考察

本研究では、休止型がん幹細胞特異的な表面マーカーX を標的とした近赤外線免疫療法によって、ヒト大腸がんオルガノイドに含まれる抗がん剤抵抗性の休止型がん幹細胞が死滅する事が明らかになった。

これまで、休止型がん幹細胞を標的とした治療法はほとんど開発されておらず、がん征圧には新規治療法の開発が必要とされている。NIR-PITはこれまでにEGFR、CD44、HER2、PSMA、CD25、PD-L1といったがん細胞表面上に発現する分子を標的とした研究が報告されてきた (Digestion. 2020 Dec 14:1-8.)。今回我々は、休止型がん幹細胞に特徴的な膜タンパクXを標的としたNIR-PITを初めて提示した。ヒト大腸がんオルガノイド培養系において、既存の抗がん剤であるIrinotecanによって増殖性のがん細胞を死滅させ、残存する休止型がん幹細胞をNIR-PITによって死滅させる事に成功したが、同様の機序でPDXでも休止型がん幹細胞を死滅できる事を検証する予定である。今回確立したNIR-PITと既存の抗がん剤との併用療法は、これまでに休止型がん幹細胞の存在が報告されているメラノーマや基底細胞がんにも応用が可能であると考えられる。

VI シニア・リサーチフェロー期間中の研究成果を、今後の研究にどのように役立てたいと考えているか

今後は、ヒト大腸がんオルガノイドで認められたNIR-PITと既存の抗がん剤との併用療法による治療効果を *in vivo* でも検証する。検証にはヒト大腸がんオルガノイドを皮下移植する事で形成されるPDXを使用する予定である。さらに、所属研究室では肺がんや卵巣がんの三次元培養系を有しており、現在、本研究で確立した治療法を他臓器がんにおいても検証する事を計画中である。まず、休止型がん幹細胞の存在の有無を誘導型H2B-EGFPとシングルセル解析により検討し、その後、同定される各臓器がんの休止型がん幹細胞特異的な表面マーカーを標的としたNIR-PITと既存の抗がん剤との併用療法の開発へと展開していく事を考えている。