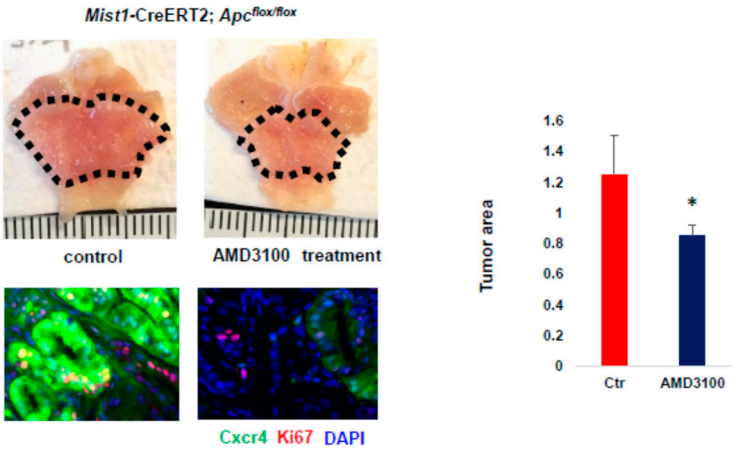
194　がん幹細胞を標的とする新規抗がん療法の開発	崎谷　康佑

【目的】我々は胃がんの幹細胞として Mist1 陽性細胞を同定し、治療標的となることを Cancer Cell 誌（2016）に報告した。その後の検討で、Mist1 を標的とする抗がん剤治療は効果を示すが、別の胃前庭部のがん幹細胞マーカー CCK2R（GUT 2015）が代償的に増加することを発見した。これらのことから、代償的増殖幹細胞やがん微小環境を含めた複数の経路を同時に標的とする新規抗がん療法の有用性が期待できると考えた。この仮説を検討することが当研究の目的である。

【方法】1. Mist1 が、胃がんのがん幹細胞であることを示す。2. Mist1 陽性細胞が CCK2R を含む他の胃がん幹細胞マーカー陽性細胞と異なることを示す。3. Mist1 陽性細胞と CXCR4 陽性細胞のオーバーラップを示す。4. CXCR4／CXCL12 シグナル阻害の抗がん作用を示す。5. Mist1 陽性がん幹細胞標的治療による代償的 CCK2R 増加を示す。同時に、Mist1 を標的とする治療時に代償的にがん細胞生存に働く経路、分子、タンパクの網羅的検索のためにマイクロアレイ、プロテオミクス解析を行う。特に、神経・血管・免疫細胞といったがん微小環境から誘導されるサイトカインに着目。6. Mist1 陽性細胞と CCK2R 陽性細胞を同時に標的とする抗がん療法の効果：胃がんマウスモデルに対する AMD3100 と CCK2R 抗体の併用療法を検討。さらに、5 の網羅的解析によって有効と考えられる代償的経路を標的として含めた併用療法を行う。同様の手法を、大腸がんモデルマウス、膵臓がんモデルマウス、肺がんモデルマウスに応用する。

【結果】進行がんに対する抗がん剤治療は精力的に研究されている。抗がん剤治療が開始初期には効果的であっても、治療経過とともに耐性を生じるケースが多く、最も進んだ Stage の胃がん、大腸がんの予後は抗がん剤治療を行っても 1 年程度に留まることが問題である（2016 Nature Rev Clin Oncology）。我々は胃がんの幹細胞（Mist1 陽性細胞）を同定、Mist1 を標的とする抗がん剤治療を行った。同治療は別の幹細胞マーカーCCK2R 陽性細胞の代償的増加を惹起した。このことから、Mist1 陽性細胞と CCK2R 陽性細胞を同時に標的とする新規の治療が効果的な可能性が高いと考えるに至った。予備的検討では下記の結果を得ている。Cxcr4 と Mist1 はオーバーラップし、double positive の細胞は *in vitro* で高い colony formation ability を示す一方 Cxcr4 と CCK2R はオーバーラップなしであった。CXCR4 阻害薬 AMD3100 は抗胃がん作用を示した。また、Tie2-Cre/Cxcl12$^{flox/flox}$ マウスの胃がんモデルは Cxcl12 シグナルの低下に伴い、幹細胞マーカーMist1 の低下、別の幹細胞マーカーCCK2R の代償的増加を示した。

Mist1 陽性細胞と CCK2R 陽性細胞を同時に標的とする新規の治療の検討



194. がん幹細胞を標的とする新規抗がん療法の開発

崎谷　康佑

朝日生命成人病研究所附属医院 消化器内科

Key words：胃がん，幹細胞，微小環境，ケモカイン

緒　言

がんは 1981 年より継続して日本人の死因の第一位であり、増加傾向にある。現在の治療では、Stage の進んだ胃、大腸がん患者の生存期間は 1 年程度にとどまる。抗がん治療の標的として、幹細胞が注目され、その同定が熾烈な競争となっているが、我々は胃がん幹細胞として Mist1 陽性細胞を同定し、治療標的となることを Cancer Cell 誌［1］に報告した。さらに、Mist1 を標的とする抗がん剤治療は効果を示すが、別の胃前庭部のがん幹細胞マーカーCCK2R［2］が代償的に増加することを発見した。これらのことから、代償的増殖幹細胞を含めた複数のがん幹細胞を同時に標的とする新規抗がん療法の有用性が期待できると考えた。この仮説を検討することが当研究の目的である。

身体を構成する臓器は、臓器ごとに異なる正常体性幹細胞により恒常性が保たれる。幹細胞は自己複製能と多分化能を有する。がん組織中にも、周辺のがん細胞を生み出すがん幹細胞があり、転移を含む腫瘍の悪性化、治療抵抗性などに重要であると示されつつある。幹細胞は単一ではなく、rapid growing、slow growing なものなど複数存在し、外部刺激に対し幹細胞が相互作用し、応答すると報告されている。脳腫瘍において slow growing の幹細胞が腫瘍増大を促進する、肺では slow growing の AT2 細胞の幹細胞機能が、AT1 細胞障害時に活性化される、小腸でも slow growing の Bmi1 陽性幹細胞が放射線障害時に rapid growing の Lgr5 陽性細胞の機能を代償する、胃において slow growing の Troy 陽性幹細胞が、抗がん剤による DNA damage に対し、reserver として機能する、等である。

大腸がんや膵臓がんの現在の分子標的治療の効果が乏しい理由を、1. がん幹細胞に対する効果不十分、2. がんが生存の代償的経路を活性化させる、と考える。この考えに基づき、大腸がんのオートファジー阻害時の小胞体ストレス応答の代償的活性化を発見、両経路の阻害が効果的であることを示した［3］。Mist1 を標的とする抗がん剤治療は効果を示すが、別の胃前庭部のがん幹細胞マーカーCCK2R が代償的に増加することを発見した。これらのことから、代償的増殖幹細胞を含めた複数のがん幹細胞を同時に標的とする新規抗がん療法の有用性が期待できると考え研究を進めている。

方　法

1.　Mist1 が胃がんのがん幹細胞であることの検討

Mist1 陽性細胞を標識できる Mist1-CreERT／Rosa26TdTomato マウスに化学発がん物質 MNU を投与した。

2.　Mist1 陽性細胞が CCK2R を含む他の胃がん幹細胞マーカー陽性細胞と異なることの検討

Mist1-CreERT／Rosa26TdTomato マウスの CCK2R 抗体等による免疫染色を実施した。

3.　Mist1 陽性細胞と CXCR4 陽性細胞のオーバーラップを示すことの検討

Mist1 と CXCR4 を標識できる Mist1-CreERT／CXCR4-GFP／Rosa26TdTomato マウスを作製し、臓器を観察した。予備的検討の結果、Cxcr4 と Mist1 はオーバーラップし、double positive の細胞は高い colony formation ability を示す一方、Cxcr4 と CCK2R はオーバーラップなしであった。

4. CXCR4／CXCL12 シグナル阻害の抗がん作用を示すことの検討

CXCR4 阻害薬 AMD3100 による治療効果を検討した。同時に、Mist1 を標的とする治療時に代償的にがん細胞生存に働く経路・分子・タンパクの網羅的検索のためにマイクロアレイ、プロテオミクス解析を行った。特に、神経・血管・免疫細胞といったがん微小環境から誘導されるサイトカインに着目した。

結　果

1. Mist1 が胃がんのがん幹細胞であることが示せた（図 1）。
2. Mist1 と他の幹細胞マーカー（CCK2R、CXCR4）との関連を示せた。Cxcr4 と Mist1 はオーバーラップし、double positive の細胞は高い colony formation ability を示し、CXCR4 と CCK2R はオーバーラップしなかった（図 2）。
3. CXCR4 阻害薬 AMD3100 による胃がんに対する治療効果と Mist1 陽性がん幹細胞標的治療による代償的 CCK2R 増加が示せた（図 3）。これらの結果を英文専門誌に報告した［4］。

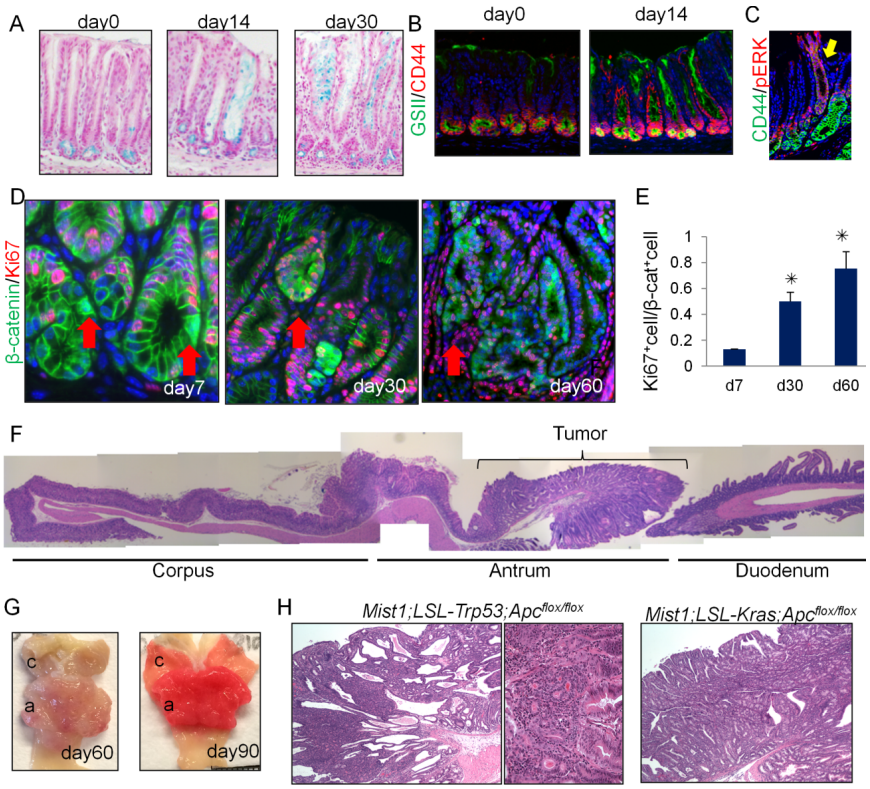


図 1. マウス胃上皮における Mist1 陽性細胞

Mist1 は胃がんの幹細胞マーカーであることを遺伝子改変マウスの lineage tracing によって示した。有意差は t 検定による統計処理による。スケールバー：100 μm。

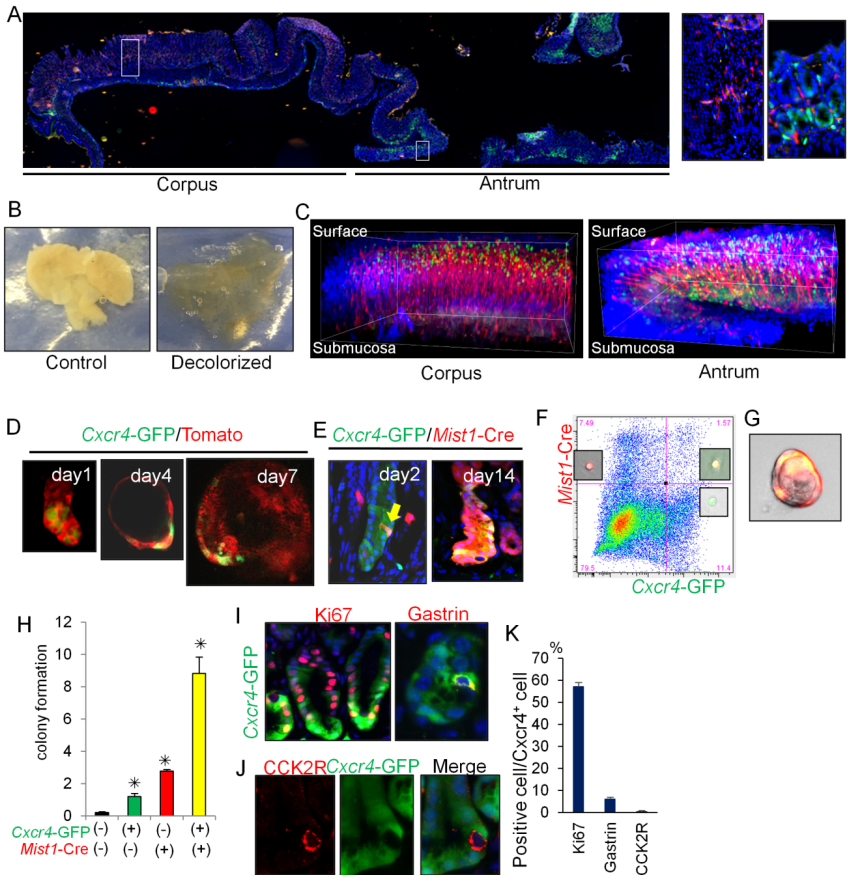


図 2. マウス胃上皮における CXCR4 陽性細胞

CXCR4 は胃がんの幹細胞マーカーであることを蛍光免疫染色によって示した。

有意差は t 検定による統計処理による。スケールバー：100 μm。

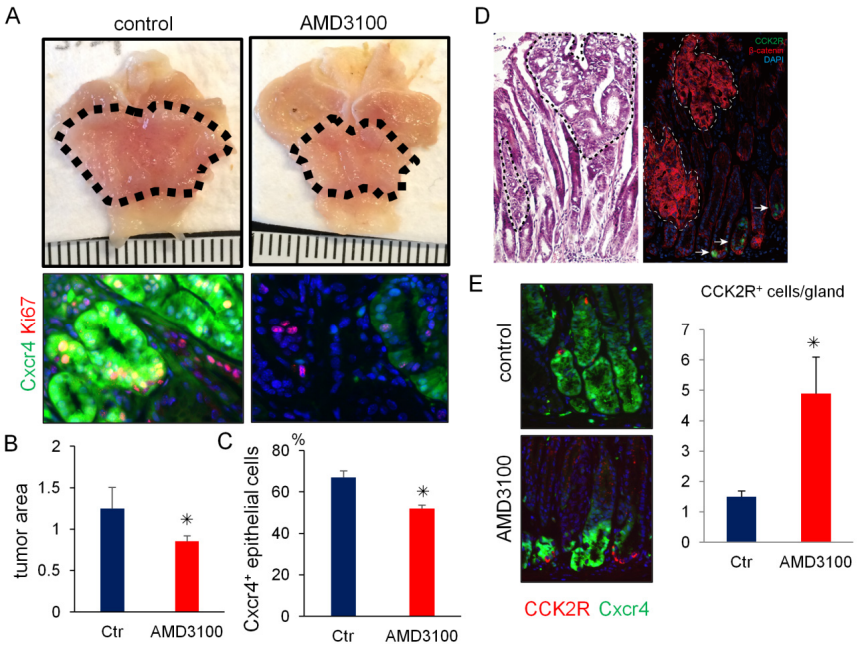


図 3. マウス胃上皮における CCK2R 陽性細胞

CCK2R は胃がんの幹細胞マーカーであり、治療標的となることを AMD3100 による治療によって示した。

有意差は t 検定による統計処理による。スケールバー：100 μm。

考　察

iPS 細胞の開発に山中伸弥教授が成功した鍵は、細胞の初期化の遺伝子を 1 つや 2 つでなく、4 つ組み合わせた点である。がん細胞を無力化するために必要な標的遺伝子も、2 つ以上の複数であることが十分に考えられる。複数のがん幹細胞を標的とする点がこの研究のユニークさである。今回の研究では幹細胞 Mist1 を標的とした治療が別の幹細胞 CCK2R の増加を惹起することが示せたので、今後、これらを同時に阻害する治療の効果の検討や、どのように複数の経路を阻害するのが効果的であるか、網羅的な解析を進めていきたい。

共同研究者

本研究は、東京大学、コロンビア大学の共同研究者と行った。

文　献

1) Hayakawa Y, Sakitani K, Konishi M, Asfaha S, Niikura R, Tomita H, Renz BW, Tailor Y, Macchini M, Middelhoff M, Jiang Z, Tanaka T, Dubeykovskaya ZA, Kim W, Chen X, Urbanska AM, Nagar K, Westphalen CB, Quante M, Lin CS, Gershon MD, Hara A, Zhao CM, Chen D, Worthley DL, Koike K, Wang TC.Cancer Cell. 2017 Jan 9;31(1):21-34. doi: 10.1016/j.ccell.2016.11.005.

2) Hayakawa Y, Jin G, Wang H, Chen X, Westphalen CB, Asfaha S, Renz BW, Ariyama H, Dubeykovskaya ZA, Takemoto Y, Lee Y, Muley A, Tailor Y, Chen D, Muthupalani S, Fox JG, Shulkes A, Worthley DL, Takaishi S, Wang TC. CCK2R identifies and regulates gastric antral stem cell states and carcinogenesis. Gut. 2015 Apr;64(4):544-53. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307190.

3) Sakitani K, Hirata Y, Hikiba Y, Hayakawa Y, Ihara S, Suzuki H, Suzuki N,Serizawa T, Kinoshita H, Sakamoto K, Nakagawa H, Tateishi K, Maeda S, Ikenoue T, Kawazu S, Koike K. Inhibition of autophagy exerts anti-colon cancer effects via apoptosis induced by p53 activation and ER stress. BMC Cancer. 2015 Oct 24;15:795. doi: 10.1186/s12885-015-1789-5.

4) Sakitani K, Hayakawa Y, Deng H, Ariyama H, Kinoshita H, Konishi M, Ono S,Suzuki N, Ihara S, Niu Z, Kim W, Tanaka T, Liu H, Chen X, Tailor Y, Fox JG,Konieczny SF, Onodera H, Sepulveda AR, Asfaha S, Hirata Y, Worthley DL, Koike K, Wang TC. CXCR4-expressing Mist1(+) progenitors in the gastric antrum contribute to gastric cancer development. Oncotarget. 2017 Nov 10;8(67):111012-111025. doi: 10.18632/oncotarget.22451.