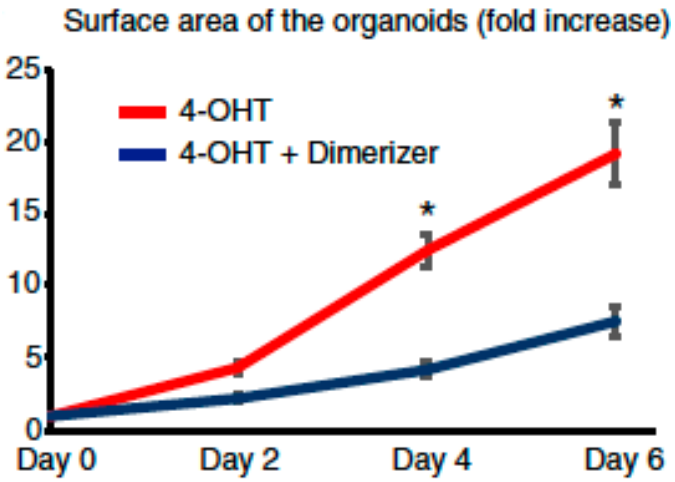
216　ヒト生体外モデルを用いた大腸癌幹細胞標的治療の検討	妹尾　浩

【目的】進行大腸癌に対する新しい視点からの治療ストラテジー開発が切望されるなか、癌幹細胞を標的とする新規治療法の開発が注目されている。研究代表者らは、DCLK1 陽性細胞の選択的排除により、正常大腸およびその他の臓器に傷害を起こすことなく、大腸癌（腫瘍）が劇的に退縮することを示してきた。そこで本研究では、様々な大腸癌幹細胞高発現因子を標的に、大腸癌幹細胞を傷害、排除する具体的な方策を検討することとした。

【方法】樹立済みのヒト大腸癌オルガノイド・ライブラリーのうち、DCLK1 陽性細胞を多く含むものを選択し、新たな癌幹細胞特異的なマーカー候補として研究代表者らが独自に絞り込んだ IL17RB、CRL4、TRPM5 などの下流に cre を挿入したコンストラクトを CRISPR-Cas9 技術により、tdTomato レポーターおよび inducible Caspase-9 コンストラクトをレンチウイルスにより挿入した。それらのオルガノイドを中心に、細胞系譜解析、癌幹細胞選択的排除、シグナル阻害および抗体治療の可能性を検討した。

【結果】ヒト大腸癌のオルガノイドにおいて、種々の癌幹細胞特異的なマーカー候補陽性細胞からの細胞系譜解析を行った。その結果、癌由来オルガノイドにおいては IL17RB 陽性癌幹細胞から子孫癌細胞が供給されることを可視的に観察した。また、inducible Caspase-9 コンストラクトを挿入して、dimerizer/inducible Caspase-9 系により癌由来オルガノイドが退縮するかを検討した。すると癌由来オルガノイドにおいては、IL17RB 陽性癌幹細胞の選択的排除によりオルガノイドの退縮が得られることが示された（下図）。さらに種々の癌幹細胞特異的なマーカー候補そのものの阻害により、それら因子が陽性の癌幹細胞が傷害され、癌由来オルガノイド／PDX（patient-derived xenograft）が退縮するかを確認したが、IL17RB についてはその機能的阻害により癌由来オルガノイド／PDX が退縮せず、IL17RB は直接の標的とならない可能性が示された。また抗 IL17RB 抗体を用いたヒト大腸癌細胞株に対する単独の増殖抑制効果は乏しかった。そのため、今後は抗体薬物複合体を用いた癌幹細胞標的治療を見据えた抗 IL17RB 抗体のブラッシュアップと、新たな細胞内シグナルの阻害による癌幹細胞標的治療の開発の双方を視野に入れた研究が必要と思われた。

IL17RB 陽性ヒト大腸癌幹細胞の選択的傷害、排除による癌由来オルガノイドの退縮効果



(Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Jun 25;116(26):12996-13005)

216. ヒト生体外モデルを用いた大腸癌幹細胞標的治療の検討

妹尾　浩

京都大学 大学院医学研究科 消化器内科学

Key words：癌幹細胞，オルガノイド，PDX，マウス，大腸腫瘍

緒　言

大腸癌は本邦の癌死の第 2 位を占め、生活習慣の欧米化に伴って今後さらに増加が見込まれている。集学的治療の進歩により、その治療成績は徐々に向上しつつあるが、進行癌に対する新しい視点からの治療ストラテジー開発が切望されている。

一般に癌の難治性、再発性を規定するメカニズムのひとつとして、癌幹細胞の存在が提唱され、癌幹細胞を標的とする新規治療法の開発が注目されている。大腸癌でそれを実現するためには、解決すべき問題が二つある。一つは、これまでに大腸癌で報告されている CD133、LGR5 などの癌幹細胞マーカーの多くは正常組織幹細胞にも発現しているため、それら癌幹細胞マーカーを標的として治療を行った場合、正常組織幹細胞も傷害を受け、重大な副作用が生じる可能性が高いことである。そこで、正常組織幹細胞に発現せず癌幹細胞特異的に発現し、両者を区別するマーカーが必要である。もう一つは、癌幹細胞の大部分は dormant な状態にあり、増殖する癌子孫細胞を標的とする通常の抗癌剤は癌子孫細胞の排除には有用でも、原理的に癌幹細胞に対する効果が乏しいことである。したがって、癌幹細胞の選択的な排除へ向けた新しい方策が必要である［1〜3］。

この二つの問題の解決へ向けて、研究代表者らが過去に大腸癌幹細胞マーカーとして報告した DCLK1 は有力な示唆を与えてくれる［4］。すなわち、独自に作出した大腸癌モデルマウスで行った細胞系譜解析では、DCLK1 陽性癌幹細胞は通常 dormant な状態で存在しつつも、効率的に癌子孫細胞を供給する。その一方正常大腸では DCLK1 は一部の分化した細胞のみに発現している。そのため、DCLK1 陽性細胞の選択的排除により、正常大腸およびその他の臓器に傷害を起こすことなく、大腸癌（腫瘍）が劇的に退縮することが確認された。さらにその後、同じく細胞系譜解析により、ヒト大腸癌由来オルガノイド／PDX（patient-derived xenograft）においても同様に DCLK1 陽性大腸癌細胞が幹細胞性を示すことを確認した。

したがって今後は、ヒト大腸癌治療への応用に向けて、DCLK1 陽性大腸癌幹細胞を傷害、排除する具体的な方策が必要と考えた。本研究では、ヒト大腸癌を可能な限り忠実に模倣した実験系として、ヒト大腸癌オルガノイドまたは PDX モデルを用い、ヒト大腸癌幹細胞と正常組織幹細胞を区別する、癌幹細胞標的治療の実現へ向けた知見を獲得することを目的とした。

方法および結果

本研究では、ヒト大腸癌を可能な限り忠実に模倣した実験系として、ヒト大腸癌オルガノイドまたは PDX モデルを用いた。研究代表者らは、樹立済みのヒト大腸癌オルガノイド・ライブラリーのうち、DCLK1 陽性細胞を多く含むものを選択した。それらに対して、新たな癌幹細胞特異的なマーカー候補として研究代表者らが独自に絞り込んだ IL17RB、CRL4、TRPM5 などの下流に cre を挿入したコンストラクトを CRISPR-Cas9 技術により、tdTomato レポーターおよび inducible Caspase-9 コンストラクトをレンチウイルスにより挿入することを計画した［5〜9］。そのうえで、以下のような結果を得た。

1. IL17RB 陽性癌幹細胞からの細胞系譜解析

ヒト大腸癌のオルガノイドにおいて、種々の癌幹細胞特異的なマーカー候補陽性細胞からの細胞系譜解析を行った。その結果、癌由来オルガノイドにおいては IL17RB 陽性癌幹細胞から子孫癌細胞が供給されることを可視的に観察した。

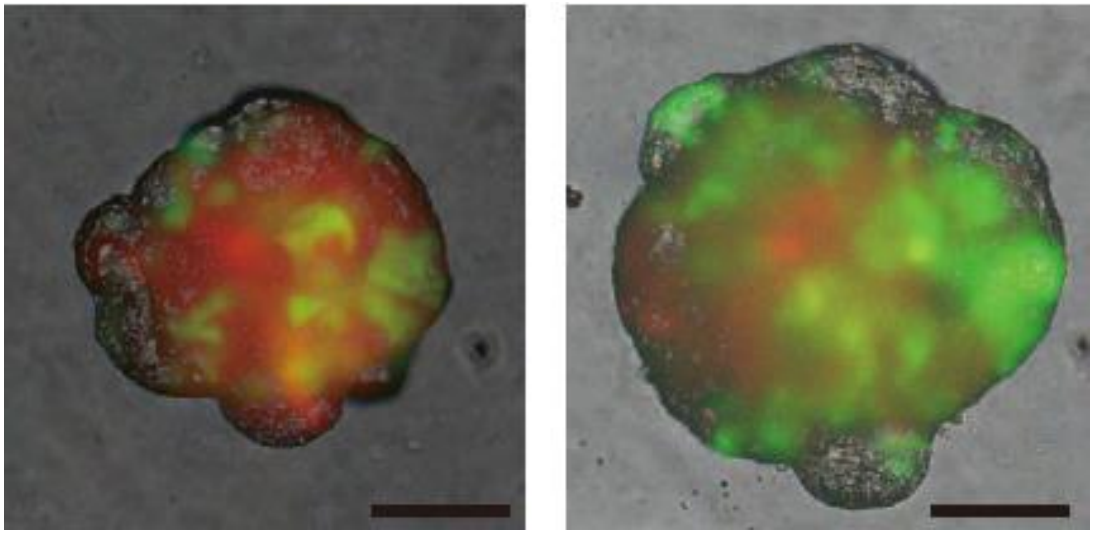


図 1. IL17RB 陽性ヒト大腸癌幹細胞からの癌由来オルガノイドを用いた細胞系譜解析［6］
左）タモキシフェン投与によるインダクション 4 日後。
右）タモキシフェン投与によるインダクション 7 日後。
スケールバー：100 μm。

2. 癌幹細胞の選択的排除によるオルガノイド退縮

種々の癌幹細胞特異的なマーカー候補陽性細胞を dimerizer/inducible Caspase-9 系により選択的に傷害、排除するために、inducible Caspase-9 コンストラクトを挿入し、癌由来オルガノイドが退縮するかを検討した。その結果、癌由来オルガノイドにおいては IL17RB 陽性癌幹細胞の選択的排除により、癌由来オルガノイドの退縮が得られることが示された。

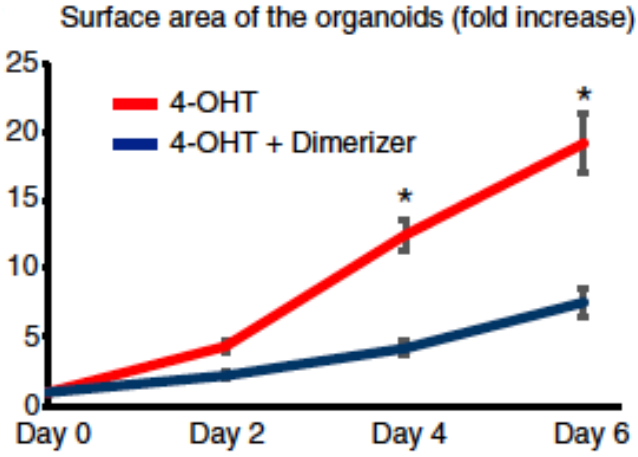


図 2. IL17RB 陽性ヒト大腸癌幹細胞の選択的傷害、排除による癌由来オルガノイドの退縮効果［6］
赤線：コントロール、青線：癌幹細胞選択的排除、* $P<0.05$（two-tailed unpaired Student's t test）。

3. 癌幹細胞特異的なシグナル阻害の可能性

種々の癌幹細胞特異的なマーカー候補そのものの阻害により、それら因子の陽性癌幹細胞が傷害され、癌由来オルガノイド／PDX が退縮するかを確認した。様々な検討を行った結果、IL17RB についてはその機能的阻害により癌由来オルガノイド／PDX が退縮せず、IL17RB は直接の標的とならない可能性が示された。このことは、*IL17RB* ノックアウトマウスと腸腫瘍モデルマウス Apc^{Min} マウスを交配した実験系でも確認された。そのため、今後は新たな細胞内シグナルの阻害による癌幹細胞標的治療の開発が必要と思われた。

4. 癌幹細胞特異的な抗体治療の可能性

上記 1〜3 結果を踏まえて、癌幹細胞をマークすることが示された IL17 に対する抗 IL17R 抗体を用いた治療法の開発を志した。諸家の報告では抗 IL17RB 抗体単独による抗癌効果が示されているが［10］、ヒト大腸癌細胞株に対する抗 IL17RB 抗体単独の効果は乏しかった。また同様にこれらの効果は Apc^{Min} マウスを用いた実験系でも確認された。そのため、今後は抗体薬物複合体を用いた癌幹細胞標的治療を見据えた抗 IL17RB 抗体のブラッシュアップと、新たな細胞内シグナルの阻害による癌幹細胞標的治療の開発の双方を視野に入れた研究が必要と思われた。

これらの検討を通じて、ヒト大腸癌幹細胞と正常組織幹細胞を区別する、癌幹細胞標的治療の実現へ向けた一定の知見を獲得することができた。

考　察

癌幹細胞を排除して、薬物療法や放射線療法への抵抗性、dormant な癌細胞による再発性を解決しようとの試みは、新しい世代の癌治療法のひとつとして注目されている。事実これまでに、既存の治療法と組み合わせることで、補完的に癌の治療効果を改善する可能性が諸家から報告されている。その実現へ向けて、癌幹細胞を選択的に傷害するストラテジーを国内外の研究者達が模索し、しのぎを削るなか、研究代表者らは大腸癌幹細胞特異的なマーカーとして DCLK1 を報告した。当初はマウス良性腸腫瘍モデルにおける意義付けにとどまっていたが、その後の検討により DCLK1 陽性大腸癌細胞がヒト大腸癌由来オルガノイド／PDX において癌幹細胞性を示す知見を得た。

本研究を通じて、これまでの独自の取り組みをブレークスルーし、「マウスからヒトへ」さらに「ヒトにおける実用化」を視野に入れたデータを獲得したことは、将来的な臨床応用へ道を拓く基礎を固めたものと期待される。実際、CD300LF、CRL4、TRPM5 の下流では、いくつかの癌関連シグナルの活性化が示されており、既存の抗体医薬やシグナル伝達阻害薬開発のプラットフォームを利用した創薬への展開も期待しうる。

また DCLK1 陽性細胞は、ヒト大腸癌だけではなく、胃癌、胆嚢癌、膵癌など、多くのヒト消化器癌に広く存在している。そのため将来的には、より普遍性の高い「消化器癌幹細胞標的療法」への道を拓く可能性も考えられる。本研究で得られた治療シーズを広く検証し、一層広範な展開を期待したい。

共同研究者

本研究の共同研究者は、京都大学大学院医学研究科消化器内科学の福田晃久、丸野貴久、中西祐貴、平松由紀子、後藤規弘らである。

文　献

1) Soteriou D, Fuchs Y. A matter of life and death: stem cell survival in tissue regeneration and tumour formation. Nat Rev Cancer. 2018 Mar;18(3):187-201. Epub 2018 Jan 19. PMID: 29348578 DOI: 10.1038/nrc.2017.122.

2) Yoshioka T, Fukuda A, Araki O, Ogawa S, Hanyu Y, Matsumoto Y, Yamaga Y, Nakanishi Y, Kawada K, Sakai Y, Chiba T, Seno H. Bmi1 marks gastric stem cells located in the isthmus in mice. J Pathol. 2019 Jun;248(2):179-190. DOI: 10.1002/path.5244. Epub 2019 Feb 20. PMID: 30689202.

3) Hiramatsu Y, Fukuda A, Ogawa S, Goto N, Ikuta K, Tsuda M, Matsumoto Y, Kimura Y, Yoshioka T, Takada Y, Maruno T, Hanyu Y, Tsuruyama T, Wang Z, Akiyama H, Takaishi S, Miyoshi H, Taketo MM, Chiba T, Seno H. Arid1a is essential for intestinal stem cells through Sox9 regulation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Jan 29;116(5):1704-1713. Epub 2019 Jan 11. PMID: 30635419 DOI: 10.1073/pnas.1804858116.

4) Nakanishi Y, Seno H, Fukuoka A, Ueo T, Yamaga Y, Maruno T, Nakanishi N, Kanda K, Komekado H, Kawada M, Isomura A, Kawada K, Sakai Y, Yanagita M, Kageyama R, Kawaguchi Y, Taketo MM, Yonehara S, Chiba T. Dclk1 distinguishes between tumor and normal stem cells in the intestine. Nat Genet. 2013 Jan;45(1):98-103. Epub 2012 Dec 2. PMID: 23202126 DOI: 10.1038/ng.2481.

5) Yamaga Y, Fukuda A, Nakanishi Y, Goto N, Matsumoto Y, Yoshioka T, Maruno T, Chiba T, Seno H. Gene expression profile of Dclk1+ cells in intestinal tumors. Dig Liver Dis. 2018 Dec;50(12):1353-1361. Epub 2018 Jun 22. PMID: 30001952 DOI: 10.1016/j.dld.2018.06.011.

6) Goto N, Fukuda A, Yamaga Y, Yoshikawa T, Maruno T, Maekawa H, Inamoto S, Kawada K, Sakai Y, Miyoshi H, Taketo MM, Chiba T, Seno H. Lineage tracing and targeting of IL17RB+ tuft cell-like human colorectal cancer stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Jun 25;116(26):12996-13005. Epub 2019 Jun 10. PMID: 31182574 DOI: 10.1073/pnas.1900251116.

7) Tsuda M, Fukuda A, Roy N, Hiramatsu Y, Leonhardt L, Kakiuchi N, Hoyer K, Ogawa S, Goto N, Ikuta K, Kimura Y, Matsumoto Y, Takada Y, Yoshioka T, Maruno T, Yamaga Y, Kim GE, Akiyama H, Ogawa S, Wright CV, Saur D, Takaori K, Uemoto S, Hebrok M, Chiba T, Seno H. The BRG1/SOX9 axis is critical for acinar cell-derived pancreatic tumorigenesis. J Clin Invest. 2018 Aug 1;128(8):3475-3489. Epub 2018 Jul 16. PMID: 30010625 DOI: 10.1172/JCI94287.

8) Chen R, Sugiyama A, Seno H, Sugimoto M. Identification of modules and functional analysis in CRC subtypes by integrated bioinformatics analysis. PLoS One. 2019 Aug 30;14(8):e0221772. eCollection 2019. PMID: 31469863 DOI: 10.1371/journal.pone.0221772.

9) Maruno T, Fukuda A, Goto N, Tsuda M, Ikuta K, Hiramatsu Y, Ogawa S, Nakanishi Y, Yamaga Y, Yoshioka T, Takaori K, Uemoto S, Saur D, Chiba T, Seno H. Visualization of stem cell activity in pancreatic cancer expansion by direct lineage tracing with live imaging. Elife. 2021 Jan 4;10:e55117. PMID: 33393460 doi: 10.7554/eLife.55117.

10) Wu HH, Hwang-Verslues WW, Lee WH, Huang CK, Wei PC, Chen CL, Shew JY, Lee EY, Jeng YM, Tien YW, Ma C, Lee WH. Targeting IL-17B-IL-17RB signaling with an anti-IL-17RB antibody blocks pancreatic cancer metastasis by silencing multiple chemokines. J Exp Med. 2015 Mar 9;212(3):333-49. Epub 2015 Mar 2. DOI: 10.1084/jem.20141702.