

2022年7月8日

報道関係者各位

慶應義塾大学医学部

大腸がん幹細胞が化学療法後に再発するメカニズムを解明 —大腸がんの再発予防・根治療法開発に光明—

慶應義塾大学医学部坂口光洋記念講座（オルガノイド医学）の太田悠木研究員、藤井正幸専任講師、佐藤俊朗教授らの研究グループは、大腸がんの増殖を司るヒトの“がん幹細胞（注1）”が化学療法後も死滅せず、再燃・再発につながるメカニズムを初めて解明しました。化学療法を行っても死なない“がん幹細胞”の存在はがんが再燃・再発（注2）する原因と考えられてきましたが、その詳細は明らかにされていませんでした。今回研究グループは、ヒト大腸がんをマウスの体内に移植し、その振る舞いをリアルタイムに観察する技術の開発に成功しました。この技術により、一部の“がん幹細胞”は休眠状態（増殖しない状態）にあり、化学療法を生き延びてクローン増殖することを明らかにしました。さらに、“がん幹細胞”が、細胞外基質（基底膜；注3）にしがみつ়くことによって休眠状態を維持していることを見出しました。また、基底膜との接着が弱まると、休眠状態のがん幹細胞は、YAPシグナル（注4）の活性化とともに、増殖を再開することがわかりました。そこで研究グループは、YAPシグナルを阻害する薬剤が、化学療法後のがん幹細胞の再増殖を抑え、がんの再燃・再発を遅らせることを動物モデルで確認しました。今回の成果は、大腸がんの生命予後を決めているがんの再燃・再発に着目した新しい治療法の開発につながることで期待されます。

本研究成果は2022年7月7日（英国時間）、国際科学誌 *Nature* に掲載されました。

1. 研究の背景と概要

1) 背景

日本の大腸がん罹患患者数は全がんの中で第1位であり、2020年の死亡数は女性で第1位、男性では第3位と、社会に大きな影を落としています。近年の化学療法の進歩によって、切除できない進行がんの治療成績は向上しています。しかし、一部のがん細胞は化学療法後も生き残り、再燃・再発を導くため、大腸がんによる死亡数は依然として高い水準に留まっています。従って、がんの再燃・再発のメカニズムを理解し、有効な治療方法を開発することが急務ですが、技術的な課題から困難でした。

佐藤教授らは先行研究において、体外でヒトの大腸上皮細胞を増殖させる“オルガノイド技術（注5）”を開発しました。そして、その技術を応用したヒトの大腸がんオルガノイドをマウスに移植し、体内の大腸がんを模倣したがん組織を作り出すことに成功しました。その結果、これまで観察できなかったがん細胞の振る舞いを研究できるようになり、2017年には、さらにこの技術を駆使し、がんの形成・成長に重要な役割を果たすヒト大腸がんの“がん幹細胞”が存在することを示しました（Shimokawa Ohta et al. *Nature* 2017）。研究グループは、患者から採取した大腸がん細胞をオルガノイドとして培養し、LGR5と呼ばれる分子を発現する大腸がん細胞（以下、LGR5がん細胞）ががん幹細胞であることを“細胞系譜解析

(注 6)”によって実証しました。この解析によって、マークした LGR5 がん細胞が蛍光で光るがん組織を作り出す様子を描き出しました。一方、LGR5 がん細胞ではないがん細胞からは、新しいがん組織は出現しませんでした。

がん幹細胞は、がんの再燃・再発の原因の最有力候補でありながら、上記の技術をもってしても、手がかりをつかめていませんでした。その理由の 1 つは、大腸がんオルガノイドをマウスの皮下に埋め込むため、1 つ 1 つのがん細胞を観察できないことにありました。本研究では、このボトルネックを克服し、大腸がん幹細胞の一部が休眠状態にあるために、化学療法の耐性やがん再発を導くことを実証しました。さらに、大腸がん幹細胞がどのように休眠状態を維持し、がんの再燃・再発を導くか、その分子メカニズムを明らかにしました。

2) 研究の概要

ライブイメージングが明らかにした“がん幹細胞”のダイナミックな挙動

研究グループは、がん幹細胞の動態を細胞レベルで可視化するために、移植オルガノイドを覆うマウスの皮膚を取り除き、かわりに透明な窓を埋め込みました。この窓を通して、1 つ 1 つの LGR5 がん細胞が、光る腫瘍を作り出していく様子をリアルタイムで観察することができるようになりました (図 1)。この“ライブイメージング”によって、LGR5 がん細胞の動態に 3 通りのパターンがあることを確認しました。LGR5 がん細胞の約 24% は、絶え間ない増殖とともに大きな腫瘍を作り出す一方、約 54% は、途中でがん細胞が消失し、新しい腫瘍を作り出すことができませんでした。これは、細胞同士が競い合い、勝ったものは新しい腫瘍を作り、負けた方は消失してしまっただけです。興味深いことに、残りの約 21% の LGR5 がん細胞は、観察中にほとんど分裂せず、休眠状態にありました。

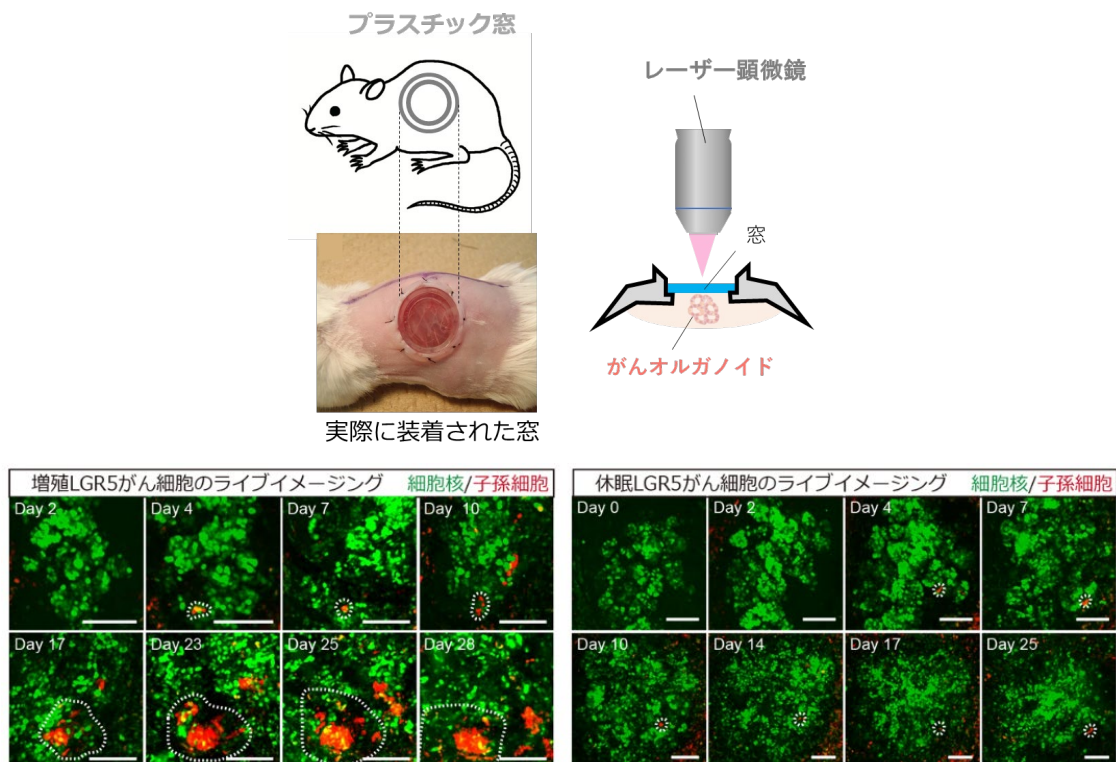


図 1 : LGR5 がん細胞が増殖する様子 (ライブイメージング)

(上) マウスに装着したプラスチック窓の下にがんオルガノイドを移植し、顕微鏡で、LGR5 がん細胞が腫瘍を作り出す様子を生きたまま観察することが可能になった。

(下) 28 日間にわたる撮影により、1 つの LGR5 がん細胞が子孫細胞 (赤色) を次々と生み出し、新しい腫瘍を作り出す様子 (左下) や、休眠 LGR5 がん細胞が増殖せずに 1 細胞のまま長期間留まる様子 (右下) が描かれた。追跡した子孫細胞を白い点線で示す。Scale bars : 100 μ m

休眠状態にある LGR5 がん細胞は化学療法に耐え、がんの再燃・再発の原因となる

研究グループは、休眠状態にある LGR5 がん細胞こそが、がんの再燃・再発の主因と考えました。まず、休眠状態の LGR5 がん細胞は、細胞周期の休止期（注 7）にあり、p27 というマーカーを発現することを見出しました。次にヒト大腸がんオルガノイドの LGR5 と p27 を発現する細胞をそれぞれ赤色蛍光と緑色蛍光で光らせるよう加工し、休眠状態の LGR5 がん細胞（以下、休眠 LGR5 がん細胞）と、p27 を発現しない LGR5 がん細胞（以下、増殖 LGR5 がん細胞）を可視化しました。このようなヒト大腸がんオルガノイドをマウスに移植し、ライブイメージングでその動態を観察しました。この実験により、休眠 LGR5 がん細胞が生体内でも休眠状態を維持する一方、増殖 LGR5 がん細胞は絶え間なく増殖することがわかりました（図 2）。また、移植したマウスに化学療法薬剤を投与すると、休眠 LGR5 がん細胞は化学療法に耐えて生き残り、増殖 LGR5 がん細胞のほとんどは消滅しました。さらに、化学療法の投与を止めた後のがん細胞を追跡したところ、休眠 LGR5 がん細胞は増殖を再開し、腫瘍を形成することがわかりました。これらから、ヒト大腸 LGR5 がん細胞は、休眠中は化学療法に耐え、覚醒後のがん幹細胞としてがんの再燃・再発に関与することが示されました。

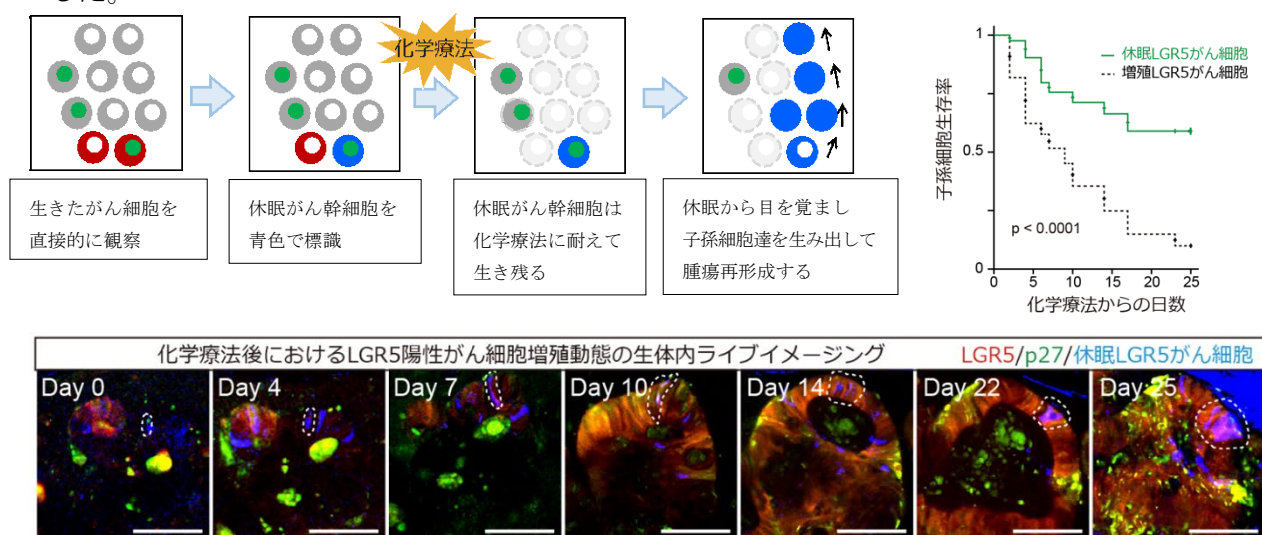


図 2：化学療法耐性と再発の過程のライブイメージング

（左上）概念図。休眠 LGR5 がん細胞を青色で標識して、LGR5 がん細胞（赤）と休眠状態（緑）を生きた状態で観察した。化学療法後には休眠 LGR5 がん細胞およびその他の休眠がん細胞（緑）は化学療法に耐えて生き残り、その後生き残った休眠 LGR5 がん細胞が休眠から目を覚まし、子孫細胞たち（青）を生み出して腫瘍を再形成した。

（右上）休眠 LGR5 がん細胞は、増殖 LGR5 がん細胞と比べて化学療法後生き残る確率が有意に高かった。 $p = 7.8 \times 10^{-8}$ 、Fisher's exact test.

（下）実際の観察像。追跡した休眠 LGR5 がん細胞とその子孫細胞（青）を白の点線で示す。休眠 LGR5 がん細胞が化学療法後も生き延び、その後腫瘍再形成する様子を捉えた。 Scale bars : 100 μm

ヒト大腸“がん幹細胞”の休眠状態を制御するコラーゲンタンパク質

さらにヒト大腸休眠 LGR5 がん細胞が“がん幹細胞”として独自の細胞周期を維持するメカニズムについて検討を進め、COL17A1（注 8）と呼ばれるコラーゲンタンパク質が関与していることを突き止めました。COL17A1 は大腸がん細胞をその真下にある基底膜に強固に繋ぎとめています。休眠 LGR5 がん細胞は増殖 LGR5 がん細胞に比べ COL17A1 の発現が増

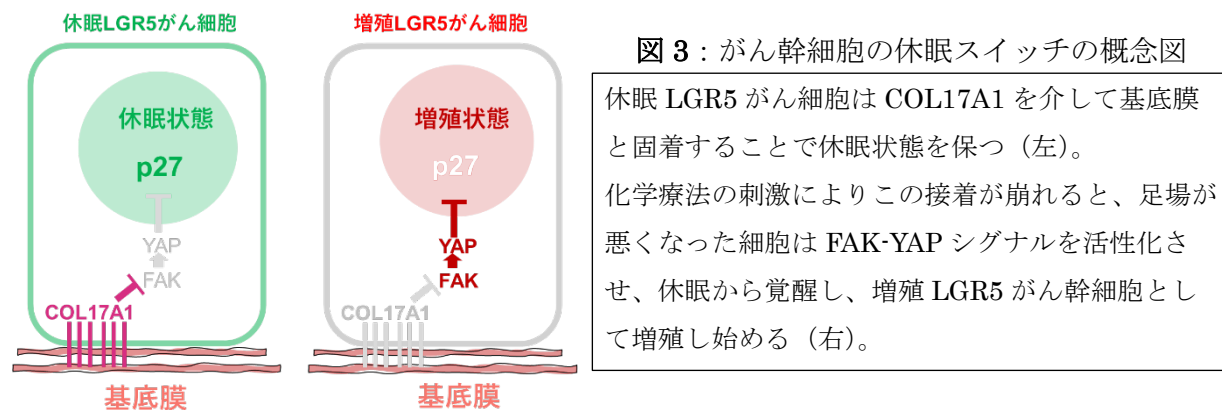
加しており、細胞と基底膜の接着状態が休眠状態を制御していると考えられました（図 3）。

次に COL17A1 が休眠状態を司るかどうかを調べるため、ゲノム編集技術を使用して大腸がんオルガノイドの COL17A1 遺伝子をノックアウトしました。COL17A1 が発現できなくなった大腸がんの LGR5 がん細胞は p27 を喪失し、休眠状態をとれず、そのオルガノイドには、化学療法が奏功しました。また、COL17A1 をノックアウトした大腸がんオルガノイドに COL17A1 を再び発現させると、休眠 LGR5 がん細胞が再び出現しました。この結果から、休眠 LGR5 がん細胞は、COL17A1 で基底膜に固着して休眠状態を維持し、化学療法に対する耐性をもつことがわかりました。

COL17A1 は YAP シグナルを抑制することにより、細胞を休眠させている

続けて、COL17A1 による接着がどのようにして休眠 LGR5 がん細胞を休眠状態に保つかを調べました。その結果、COL17A1 による接着がなくなると、FAK および YAP というシグナルが活性化し、休眠 LGR5 がん細胞は休眠から起こされて増殖を始めました。一方、この状況で、YAP シグナルを薬剤で阻害すると、休眠 LGR5 がん細胞は休眠したままでした。このことから、休眠 LGR5 がん細胞は COL17A1 を介した安定的な接着によって FAK-YAP シグナルを抑制し、休眠状態を維持していることが示唆されました。

化学療法後に生き残ったがん細胞からがんが再発する過程で、上述の COL17A1-FAK-YAP 経路がどう関与しているかを調べました。すると、化学療法に曝されたヒト大腸がん細胞オルガノイドは、コラーゲン分子を壊す酵素を産生し、COL17A1 を破壊しました。休眠状態を作り出していた COL17A1 がなくなった大腸がん細胞は、FAK-YAP シグナルを活性化させ休眠 LGR5 がん細胞を覚醒・増殖させました。従って、COL17A1 は休眠状態を作り出して化学療法からがん細胞を守る一方、化学療法によって容易に破壊され、FAK-YAP シグナルの活性化とがん細胞の再増殖を導くことがわかりました（図 3）。



YAP 標的治療は化学療法後のがんの再燃・再発を遅らせる

ここまでで、化学療法後に残存した休眠 LGR5 がん細胞が YAP シグナルを活性化し、再増殖の準備をしていることが示唆されたので、研究グループは、動物モデルを用いてこの仮説を検証しました。大腸がんオルガノイドを移植したマウスに化学療法を行い、その後に YAP シグナルを遺伝学的に減弱させたところ、化学療法後のがんの再発が有意に遅延しました（図 4）。さらに YAP 標的治療の臨床応用を視野に入れ、薬剤（低分子 TEAD 阻害剤；TEADi）による YAP シグナルの阻害を試みました。その結果、TEADi 単独治療では弱い腫瘍抑制効果しか示しませんが、化学療法（イリノテカン）の後に TEADi を投与すると、化学療法後の腫瘍再増殖が有意に抑制されました（図 4）。以上から、YAP シグナルを阻害する薬剤が、化学療法後の大腸がんの再燃・再発を防ぐ新しい治療効果を持つことが示され、がん治療のブレークスルーにつながる可能性が期待されます。

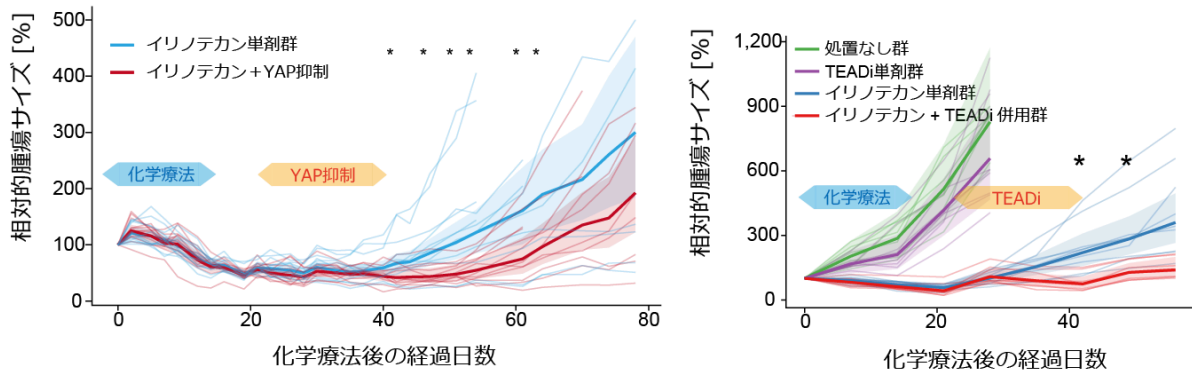


図 4：FAK-YAP シグナル抑制に着目したがん再発予防モデル

マウス皮下に移植したヒト大腸がんのサイズ変化を示したグラフ。(左) 化学療法 (イリノテカン) 後に YAP シグナルを減弱させると、化学療法のみとの群と比べて腫瘍再発が有意に抑えられた。(右) 化学療法後に YAP シグナルを減弱できる薬剤 (TEADi) を投与した。化学療法後に TEADi を投与すると、腫瘍再形成を有意に抑制した。* $p < 0.05$, mixed-effects models for repeated measures

2. 研究の成果と意義・今後の展開

本研究では、生体内イメージング、細胞系譜解析、患者由来大腸がんオルガノイドを統合し、休眠 LGR5 がん細胞が、化学療法の耐性および再燃・再発に関与することを示しました。また、コラーゲンタンパク質 COL17A1 が休眠 LGR5 がん細胞の YAP シグナルを調節することによって休眠・増殖の状態を制御することを発見しました。こうした結果に基づき、研究グループは、ヒト大腸がんオルガノイドの移植モデルを用い、次世代型 YAP シグナル阻害剤 (TEADi) による、がんの再発の阻止が可能であることを実証しました。今回の成果が今後臨床応用され、化学療法後のがんの再燃・再発を防ぐ新しい治療法となることが期待されます。

3. 特記事項

本研究は、日本医療研究開発機構 (AMED) の革新的先端研究開発支援事業 (AMED-CREST) 「生体組織の適応・修復機構の時空間的解析による生命現象の理解と医療技術シーズの創出」研究開発領域における研究開発課題「新しい 4 次元モデルシステムを用いた腸管線維化疾患の病態解明」(研究開発代表者：佐藤 俊朗)・次世代がん医療創生研究事業における研究開発課題「がん多階層フェノタイプの理解に基づいた先端的創薬システムの開発」(研究開発代表者：佐藤 俊朗)、国立研究開発法人科学技術振興機構 ムーンショット型研究開発事業「患者由来がんオルガノイド培養プラットフォームの開発とその応用展開」、JSPS 科研費 JP20K17030、慶應義塾学事振興資金の支援により行われたものです。

なお、本研究内容に関する成果は既に特許出願されています。

4. 論文

英文タイトル：Cell-matrix interface regulates dormancy in human colon cancer stem cells

タイトル和訳：細胞-マトリクス界面が大腸がん幹細胞の休眠を制御する

著者名：太田悠木、藤井正幸、高橋シラット、高野愛、南木康作、股野麻未、羽生ひかる、齋藤恵、下川真理子、錦織伸吾、籬野佳子、石井亮太、澤田和明、待永明仁、池田わたる、今村健志、佐藤俊朗

掲載誌：Nature

DOI：10.1038/s41586-022-05043-y

【用語解説】

(注 1) がん幹細胞、幹細胞：

幹細胞は多能性幹細胞と組織幹細胞の大きく 2 種類に分けて考えられています。多能性幹細胞は、ES 細胞や iPS 細胞のような体内のあらゆる細胞を作り出す能力を持つ細胞です。一方、組織幹細胞は、それぞれの組織（皮膚や大腸上皮など）の新陳代謝に必須となる細胞であり、組織が破壊された後の修復・再生の起点となります。がん組織においても、少数のがん幹細胞が存在し、がん組織の新陳代謝を担っていると考えられています。特に、化学療法の後にはがん組織を再生（つまりがんの再燃や再発）する過程で、がん幹細胞は重要な役割を果たすと考えられております。

(注 2) がんの再燃と再発：

手術や化学療法（抗がん剤）による治療により、がんが治ったかのように見えても、しばらくして、がんが再び現れることがあります。これは、最初の治療で取り除けなかったがん細胞が増え、新しいがん病巣を作り出したためです。化学療法によって小さくなったがんが、治療後しばらくして再び大きくなることを再燃と呼びます。最初の治療の時にはなかった場所に、新しくがんができた場合、再発と呼びます。本プレスリリースでは、頻繁に再燃と再発を併記しておりますが、医学的には上記の区別があります。

(注 3) 基底膜：

体表を覆う上皮細胞の底面は、基底膜という足場（マトリクス）に接着しております。皮膚の上皮では、さらに、COL17A1（注 8）というコラーゲンタンパク質の一種が発現し、基底膜との接着を補強しています。このような強固な接着により、擦過などの刺激で上皮細胞が体表から簡単にはがれないようにしています。大腸上皮は元々 COL17A1 をほとんど発現していませんが、大腸がんになると COL17A1 を発現するようになります。

(注 4) FAK、YAP および TEAD：

細胞は、どのような足場（マトリクス）と接着しているかを認識します。このような認識機構の 1 つに、FAK-YAP シグナルがあります。基底膜が壊れて足場の状態が変わると、細胞が足場の変化を感知し、FAK と YAP を活性化します。活性化した YAP は核内に移行し、TEAD とよばれるタンパク質とともに DNA に結合し、細胞の増殖などを誘導します。

(注 5) オルガノイド技術：

従来の培養技術では、体の細胞を平面状のシートにして培養・増殖させてきました。オルガノイド培養技術は、組織の細胞を立体的に培養し、体内の組織に近い状態に保つ培養技術です。オルガノイド培養技術によって、ヒトのさまざまな組織（胃、小腸、大腸、乳腺、肺など）を培養できるようになりました。また、オルガノイド技術ががん細胞にも応用され、採取した患者がん細胞を体外で効率よく培養できるようになりました。

(注 6) 細胞系譜解析：

幹細胞は自身を先祖として、たくさんの子孫を生み出す“系譜”を作ります。より大きな系譜を作り出すがん幹細胞は、がんが増大する元凶と考えられます。細胞系譜解析では、特定の先祖細胞のゲノムに細工を施し、蛍光色に光るようにします。この蛍光色に光る細工はゲノムに組み込まれているため、子孫細胞にも受け継がれます。したがって、蛍光色でマークされた幹細胞の子孫細胞の集団（クローンとも呼ばれる）の全てが蛍光色で光ることになります。本研究では、LGR5 を発現するがん幹細胞の子孫細胞を蛍光色で光らせ、腫瘍の増大の原因となるがん幹細胞の動態を調べました。

(注 7) 細胞周期の休止期：

私たちの体内の細胞の多くは細胞分裂を繰り返しています。この細胞分裂には細胞周期と呼ばれる周期があり、いくつかのステップ（G₁、S、G₂、M 期）を順番に進めていくことがわかっています。一方、細胞分裂せず、休眠状態にある細胞では、こうしたステップは踏まず、休止期（G₀期）というステップにとどまることが知られています。休止期にある細胞は p27 と呼ばれるタンパク質を特異的に発現します。

(注8) COL17A1 :

通常のコラーゲンタンパク質は細胞外マトリクスとして存在し、細胞を外側から支える構造の1つとなっています。COL17A1は特殊なコラーゲンタンパク質であり、細胞膜上に発現し、基底膜との結合を補強する役割をもっています。

※ご取材の際には、事前に下記までご一報くださいますようお願い申し上げます。

※本リリースは文部科学記者会、科学記者会、厚生労働記者会、厚生日比谷クラブ、各社科学部等に送信しております。

【本発表資料のお問い合わせ先】

慶應義塾大学医学部 坂口光洋記念講座 オルガノイド医学教室

教授 佐藤 俊朗 (さとう としろう)

TEL : 03-5363-3063 E-mail : t.sato@keio.jp

<https://organoidmed.org/>

【本リリースの配信元】

慶應義塾大学信濃町キャンパス総務課 : 山崎・飯塚・奈良

〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35

TEL : 03-5363-3611 FAX : 03-5363-3612 E-mail : med-koho@adst.keio.ac.jp

<https://www.med.keio.ac.jp>

※本リリースのカラー版をご希望の方は【本リリースの配信元】までご連絡ください。