

平 28 年 度 委 託 研 究 開 発 成 果 報 告 書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的がん医療実用化研究事業  
(英語) Practical Research for Innovative Cancer Control

研究開発課題名： (日本語) がん幹細胞維持機構を破綻させる治療法の開発  
(英語) Anti-cancer therapy through disrupting cancer stem cell-maintenance system

研究開発担当者 (日本語) 宮城県立がんセンター研究所 がん幹細胞研究部 部長 玉井恵一  
所属 役職 氏名： (英語) Keiichi Tamai, Head, Division of Cancer Stem Cell, Miyagi Cancer Center  
Research Institute

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) がん幹細胞維持機構を破綻させる治療法の開発  
開発課題名： (英語) Anti-cancer therapy for disrupting cancer stem cell-maintenance system

研究開発分担者 (日本語) 東北大学加齢医学研究所腫瘍学研究分野 講師 菅野新一郎  
所属 役職 氏名： (英語) Shinichiro Kanno, Associated Professor, Department of Molecular Oncology,  
Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University

II. 成果の概要 (総括研究報告)

胆管癌は、胆管を由来とした悪性度の高い癌である。胆管癌は、限られた治療手段しか存在せず、手術がほぼ唯一の完治に至る手段であるが、その適応は早期に発見されたがんに限られている。胆管癌の悪性度は、近年盛んに研究されているがん幹細胞が大きな役割を果たしていると考えられる。がん幹細胞は、様々ながん種でその存在が知られており、胆管癌においてもラットにおける実験系をはじめとして報告されている。がん幹細胞は、特徴的な表面分子で細胞を分画し、免疫不全マウスの皮下における造腫瘍能を評価することでその存在を推測することが多い。多くのがん種におけるがん幹細胞は、高い ALDH 活性・低い ROS 産生能といった、特徴的な表現型が見られる。CD13 は、肝臓がんにおけるがん幹細胞マーカーとして報告されているが、この CD13 陽性細胞は静止期に偏在することがわかっている。同様

に、白血病のがん幹細胞も静止期に存在することが知られている。一方で、胆管がんにおけるがん幹細胞には不明な点が多い。私たちは最近、胆管癌におけるがん幹細胞マーカーCD274 を同定した。RBE と HuCCT1 の 2 種類の胆管癌細胞株を用いて、CD274 陰性細胞は、著しい造腫瘍能をもつことを明らかにした。詳細に解析を行った結果、CD274 低発現細胞は、高い ALDH 活性・低い ROS 産生能・静止期への偏在がみられた。これらの結果から、CD274 低発現細胞は静止期癌幹細胞に酷似していると考えられた。更に、shRNA を用いて CD274 をノックダウンすると、造腫瘍能および ALDH 活性の増大を認めた。また、胆道癌症例においては、CD274 低発現症例は予後不良であった。以上のことから、CD274 低発現細胞は胆管癌癌幹細胞であることが明らかになった。しかし、治療標的とするには、高発現分子を同定する方が応用しやすい。そこで、私たちは胆管がん幹細胞に高発現する遺伝子を再スクリーニングした。その結果、これまで知られていない癌幹細胞関連遺伝子 X を同定した。遺伝子 X をノックダウンすると、複数の癌幹細胞形質が減弱した。現在、遺伝子 X に対して阻害効果を持つ小分子化合物をスクリーニング中である。

Cholangiocarcinoma is the most common primary malignancy of the biliary tract, and one of the most difficult intra-abdominal malignancies to treat. Surgical management is the only potentially curative treatment, but it is limited to the early-stage disease. Although cholangiocarcinoma stem cells were defined in a chemically induced rat hepatocarcinoma, and the deregulated self-renewal of hepatic stem/progenitor cells is an early event in the carcinogenesis of cholangiocarcinoma, little is known about the relationship between the role of cancer stem cells (CSCs; also known as tumor-initiating cells) and the pathogenesis of human cholangiocarcinoma. CD13 is a marker of semiquiescent or dormant CSC in human liver cancer. The CD13+ CSC predominately reside in the G0 phase of the cell cycle and compared with their CD13- counterparts they exhibit less ROS-induced DNA damage, resulting in protection from apoptosis. Similarly, in acute and chronic myeloid leukemia, the CSC survive in the dormant G0 phase of the cell cycle. We recently identified CD274 as a cancer stem cell marker in cholangiocarcinoma. Using two human cholangiocarcinoma cell lines, RBE and HuCCT1, we attempted to isolate the CD274<sup>low</sup> and CD274<sup>high</sup> cells from each cell line, and xenografted them into immunodeficient NOG mice. We found that the CD274<sup>low</sup> cells isolated from both RBE and HuCCT1 are highly tumorigenic in NOG mice compared with CD274<sup>high</sup> cells. Furthermore, the CD274<sup>low</sup> cells possess several CSC-related characteristics, such as high aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity, reduced reactive oxygen species production and a dormant state in the cell cycle. Furthermore, depletion of CD274 expression by shRNA in RBE cells enhances their tumorigenicity and increases ALDH activity. These findings are compatible with our observation that clinical cholangiocarcinoma specimens are classified into low and high groups for CD274 expression, and the CD274<sup>low</sup> group shows poorer prognosis when compared with the CD274<sup>high</sup> group. These results strongly suggest that CD274 has a novel function in the negative regulation of CSC-related phenotypes in human cholangiocarcinoma, which is distinct from its immunomodulatory actions. We further investigated the high expressing gene in CD274 low fraction. We newly identified an X gene as a cancer stem cell-related gene in cholangiocarcinoma. Knockdown of X resulted in the attenuation of cancer stem cell-related phenotypes. Now we search small molecules which inhibit the X gene function.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表  
なし。

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
なし。

(4) 特許出願  
なし。