

論文の内容の要旨

論文題目 患者由来胃がん細胞の不均一性と薬剤抵抗性細胞の治療標的分子
(Heterogeneity in patient-derived gastric cancer cells and therapeutic targets of drug-tolerant persister cells)

氏名 川上 隆兵

【序論】

胃がんは世界的に見ても主要ながん種であり、特にアジアに多く、日本では肺がん・大腸がんに次いで年間（2017年）4万5千人以上が胃がんで死亡している。病期が浅く切除可能な胃がんには内視鏡・手術治療が適用されるが、手術困難な進行・再発がんに対しては、細胞傷害性抗がん剤や分子標的薬などの薬物療法が施行される。しかし、薬物療法は延命には寄与するものの根治療法としては不完全であり、がん細胞が耐性を示すことで病勢の進行や再発をきたす（図1）。がん細胞が薬剤耐性となる機序として、遺伝子変異や休眠状態による不応答性、がん組織への薬剤未到達、がん微小環境の影響などがある。さらに、近年注目を集めている因子としてがん組織の不均一性とがん幹細胞の存在が挙げられる。胃がん組織はとりわけ高い不均一性を有しており、自己複製能や多分化能、高い腫瘍形成能を有するがん幹細胞が細胞ヒエラルキーのトップに位置し、薬剤抵抗性に寄与すると推定されている。しかし、がん組織の不均一性やがん幹細胞が実際にどの程度薬剤抵抗性に寄与するかは不明である。加えて、不均一性に基づく治療標的分子として確立されたものは未だ存在しない。一方、薬物療法の初期に残存する耐性がん細胞（persister細胞）に関して最近研究報告がなされているが、その詳細な性質および分子基盤は明らかでない。私は当専攻修士課程の学位研究『がん幹細胞性と薬剤耐性の結びつきを検証する患者由来胃がん細胞モデル』（2017年3月）において、細胞傷害性抗がん剤に抵抗性を示す胃がん persister細胞は、マーカー分子の発現などにおいてがん幹細胞と共通のプロファイルを部分的に有するものの、腫瘍形成能などの性質においてがん幹細胞とは同義でない可能性を提唱した。そこで本研究では、患者由来胃がん細胞集団の不均一性に対する抗がん剤の影響を調べ、persister細胞を減少・殲滅させるための治療標的候補因子とその分子機序を解明することを目的として以下の研究を行った。

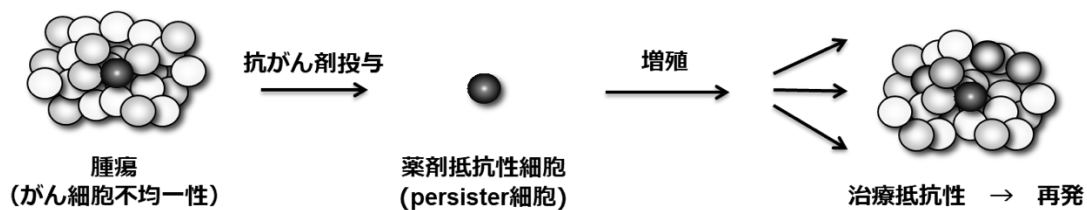


図1. 腫瘍組織の不均一性と薬剤抵抗性（persister）細胞による治療抵抗性・再発

【結果】

1. 患者由来胃がん細胞の不均一性に対する抗がん剤の影響、persister細胞におけるALDH1A3遺伝子の発現上昇と細胞増殖への寄与

公益財団法人がん研究会・所内倫理委員会の承認のもと同意を得て樹立した患者由来胃がんJSC15-3細胞において、細胞傷害性抗がん剤5-フルオロウラシル（5-FU）の処理前後で、胃系譜関連因子・幹細胞関連因子ならびに抗がん剤5-FUおよびトポイソメラーゼII阻害剤イリノテカン

の活性代謝体 SN38 処理後の残存 persister 細胞で高発現していた因子、計 47 遺伝子の発現を指標とし、フリーダタイム C1/Biomark システムを用いてシングルセル解析を行った。その結果、細胞集団の不均一性が認められ、さらに 5-FU 処理によってそのパターンに変化が認められた (図 2A)。5-FU 処理後の細胞の特徴として、LGR5・TROY・ALDH1A3 など、幹細胞マーカーとして報告のある遺伝子群の発現の亢進が観察された。解析した全細胞を大別すると、5-FU の処理前後で 2 つのクラスターに分割されたが、その中でも 5-FU 処理後の一部の細胞群で 5-FU 処理前と類似した発現様式を示したものや、5-FU 処理前の一部の細胞群で 5-FU 処理後と類似した発現様式を示したものが認められ、それぞれの細胞集団内に抗がん剤抵抗性に寄与する分画が存在する可能性が示唆された (図 2B)。

そこで、5-FU 処理後の胃がん細胞で顕著な発現亢進が認められた遺伝子群について、JSC15-3 細胞内での発現を siRNA でノックダウンし、細胞の生存増殖に対する影響を観察した。その結果、アルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) ファミリーの一員であり、がん幹細胞マーカーの 1 つとしても知られている ALDH1A3 の発現抑制が細胞コロニーの形成能を低下させること、特に 5-FU 添加時のコロニー形成能を顕著に低下させることが見出された (図 2C, D)。

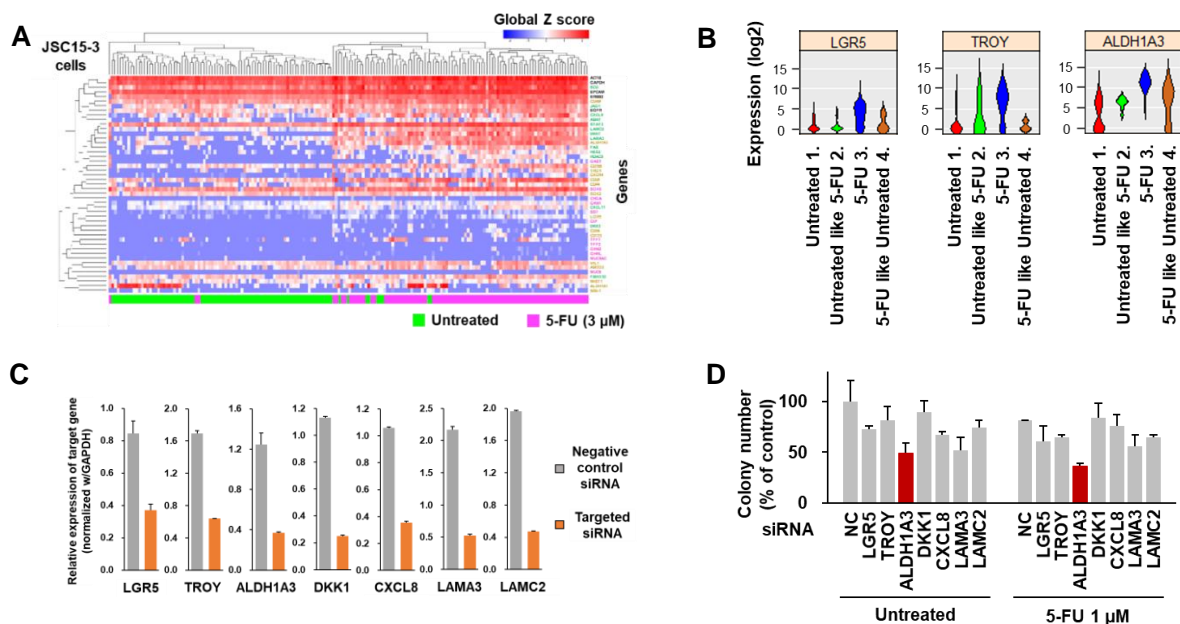


図 2. 患者由来胃がん細胞に 5-FU 処理した際の不均一性変化と ALDH1A3 の細胞増殖への寄与
A: 患者由来胃がん細胞 JSC15-3 のシングルセル解析データを用いたクラスター解析、B: 代表遺伝子の発現量分布を示すバイオリンプロット、C: JSC15-3 細胞における各種遺伝子の siRNA によるノックダウン効率、D: 各種遺伝子をノックダウンした JSC15-3 細胞 (薬剤未処理および 5-FU 処理) のコロニー増殖

2. 抗がん剤による ALDH1A3 の発現における不均一性の変化と特異的発現亢進

患者由来胃がん細胞 JSC15-3・JSC17-2・JSC17-7 (いずれも承認・同意を得て樹立) において、5-FU を処理した際の ALDH ファミリー遺伝子群の発現変化を Affymetrix HG U133 plus 2.0 GeneChip マイクロアレイで解析した。その結果、5-FU 処理により ALDH1A3 の発現が全ての細胞で共通かつ特異的に亢進することが見出された (図 3A)。この結果は、逆転写リアルタイム PCR 法でも再現性が得られた。同様に、SN38 を処理した際にも ALDH1A3 の発現が亢進した (図 3B)。免疫蛍光染色の結果、ALDH1A3 タンパク質の発現には細胞ごとの不均一性が認められた一方、5-FU 処理によって、その不均一性が緩和され、かつ、発現が顕著に亢進し、バイオリンプロットのパターン (図 2B) がタンパク質レベルでも再現されることが確認された。

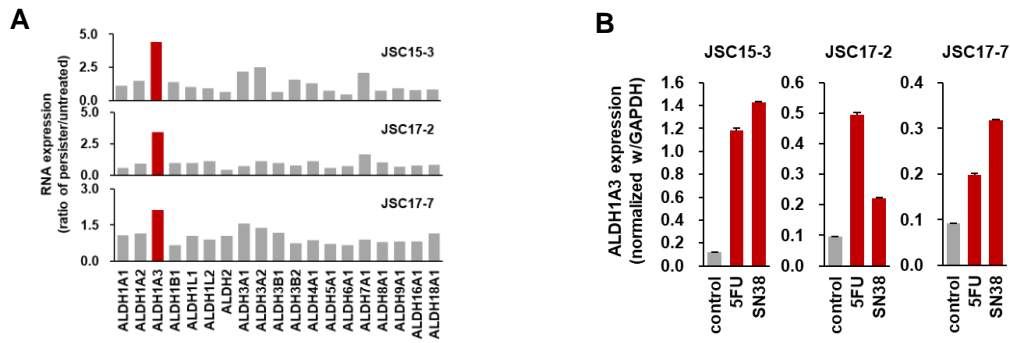
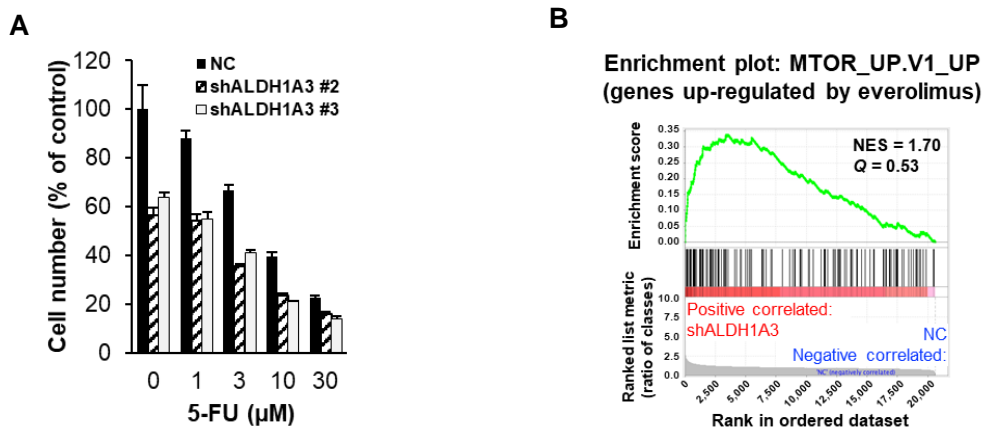


図 3. 胃がんにおける抗がん剤処理後の ALDH1A3 の発現亢進、病期・予後との関係

A: 患者由来胃がん細胞 (JSC15-3, JSC17-2, JSC17-7) に亜致死濃度の 5-FU をそれぞれ 7, 6, 6 日間処理した際の ALDH ファミリー各遺伝子 RNA の発現変動、B: 細胞傷害剤抗がん剤 5-FU・SN38 処理後の ALDH1A3 遺伝子の発現亢進

3. ALDH1A3 発現と連関する mTOR 経路の同定、抗がん剤耐性 persister 細胞数の減少

JSC15-3 細胞の増殖・生存と抗がん剤処理後の persister 細胞数に対する ALDH1A3 の寄与を詳細に調べるため、JSC15-3 細胞の ALDH1A3 発現を shRNA により恒常的に抑制した。その結果、顕著な細胞増殖抑制が観察されたのに加えて、そこに 5-FU を添加すると、さらなる細胞増殖の抑制が観察された (図 4A)。但し、ALDH1A3 のノックダウンと 5-FU の細胞増殖抑制効果は相加的であり、相乗的には働いていないことが判明した (データは示さず)。さらに、GeneChip マイクロアレイを用いて ALDH1A3 ノックダウン JSC15-3 細胞の包括的遺伝子発現解析を行った。取得した遺伝子発現データについて Gene set enrichment analysis (GSEA) を実施したところ、ALDH1A3 と mTOR 経路の関連性が示された (図 4B)。そこでウェスタンブロット法でタンパク質レベルの解析を行ったところ、mTOR 経路の介在因子である p70S6K の活性化の指標となるリン酸化レベル (p-T389) が、ALDH1A3 ノックダウン細胞で低下していることが明らかとなった (図 4C)。この現象の機能的意義を検証するため、mTOR 阻害剤テムシロリムスと 5-FU の併用について検討した。その結果、2 剤の併用は相乗的効果を示さなかったものの (データは示さず)、テムシロリムス単剤に比べ、より強く細胞増殖を抑制することが明らかとなった (図 4D)。以上の結果から、ALDH1A3-mTOR 経路は胃がん細胞の生存・増殖に寄与し、この経路の抑制と 5-FU の併用が有効な治療法となる可能性が示唆された。



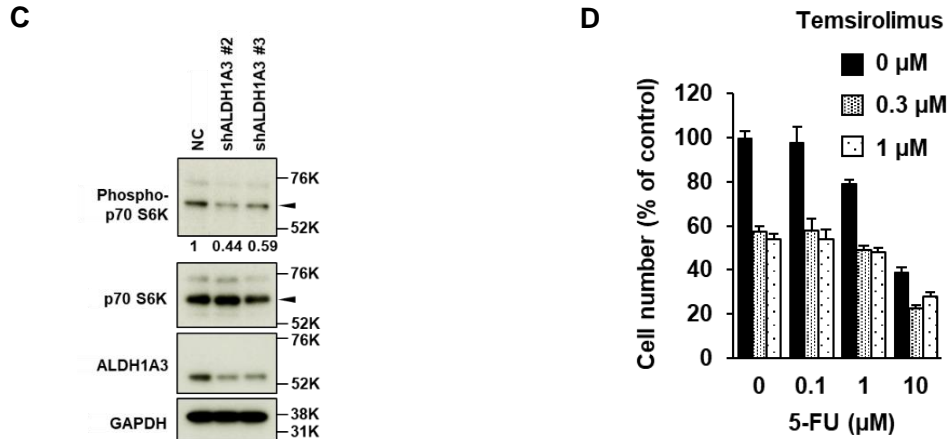


図 4. 抗がん剤抵抗性 persister 細胞に対する ALDH1A3 および mTOR 経路の関与

A: 抗がん剤 5-FU 抵抗性 persister 細胞 (JSC15-3) に対する ALDH1A3 ノックダウンの影響、NC: non-silencing control. B: ALDH1A3 ノックダウンと正の相関を示した mTOR 経路関連遺伝子群 (mTOR 阻害剤エベロリムス処理により発現上昇する遺伝子セット)、C: ALDH1A3 ノックダウン JSC15-3 細胞における p70S6K リン酸化の低下、D: mTOR 阻害剤テムシロリムスによる JSC15-3 細胞の増殖抑制と 5-FU 耐性 persister 細胞数の減少

【考察】

胃がん患者由来細胞において、5-FU 処理後に残存した細胞では LGR5、TROY、ALDH1A3 などの幹細胞関連因子の発現亢進が認められたが、これをシングルセルのレベルで精査したところ、LGR5 や TROY のように発現亢進のレベルに不均一性が認められた遺伝子と、ALDH1A3 のようにもともと発現レベルが不均一であった状態から均一な高発現パターンへとシフトする遺伝子に大別された (図 2B: 1 と 3 の比較)。これらのことから、後者すなわち ALDH1A3 型の発現パターンを示す遺伝子の方が 5-FU 耐性に寄与している可能性が高いと推論した。この場合、薬剤未処理の細胞群で 5-FU 処理後と類似した発現プロファイルの細胞画分 (図 2B: 2) はもともと薬剤抵抗性であった可能性があり、persister 細胞は「もともと存在していた薬剤抵抗性細胞」と「特定遺伝子の発現誘導などで適応応答した細胞」の双方から生じる可能性が示唆された。

以上の推論に基づき、候補遺伝子の機能を検証した結果、胃がん薬物療法後に残存する persister 細胞のマーカー候補および機能因子として ALDH1A3 を同定した。ALDH ファミリー遺伝子の中でもがん幹細胞マーカーとして報告が多いのは ALDH1A1 であったが、胃がんにおける ALDH ファミリー遺伝子の発現やその役割は十分明らかではなかった。本研究により、5-FU 処理後の persister 細胞で発現上昇するのは ALDH1A1 でなく ALDH1A3 であり、後者が実際に persister 細胞の生存増殖に寄与することが明らかになった。ALDH1A3 は ALDH1A1 と比較してレチノール酸合成経路への寄与が大きく、レチノール酸合成経路はがん幹細胞の自己複製能や生存増殖に寄与するとの報告もある。同経路が抗がん剤処理後の persister 細胞にも関与するのか興味深い。

最後に、ALDH1A3 は mTOR 経路を制御することが示された。この結果と一致して、ALDH1A3 を阻害する代わりにテムシロリムスによって mTOR 経路を阻害しつつ、5-FU を処理することで、より強い細胞増殖抑制効果が得られた (図 4D)。現時点でテムシロリムスあるいはエベロリムスといった mTOR 阻害剤の胃がんへの適応はないが、これらの薬剤は腎細胞がんなどの治療で既に使用されており、細胞傷害性抗がん剤との併用薬として胃がんに適応される可能性も期待できる。加えて、シトラールという ALDH1A3 特異的阻害剤と細胞傷害性抗がん剤との併用効果が非臨床レベルで報告されており、ALDH1A3 を直接標的としたアプローチも有望かもしれない。これらは、薬物療法で根絶しきれない進行・再発胃がんの新たな治療法になり得ると期待され、今後さらに臨床の場でも検証されることが望まれる。