

# 大腸がん幹細胞研究 がん幹細胞の細胞株樹立に初めて成功 ーがんの再発・転移、薬剤耐性の メカニズム解明と新たな治療薬開発へ前進ー

中外製薬株式会社 研究本部 鈴木 雅実

2012.11.16

本プレゼンテーションには、医薬品(開発品を含む)に関する情報が含まれていますが、 それらは宣伝・広告や医学的なアドバイスを目的とするものではありません。





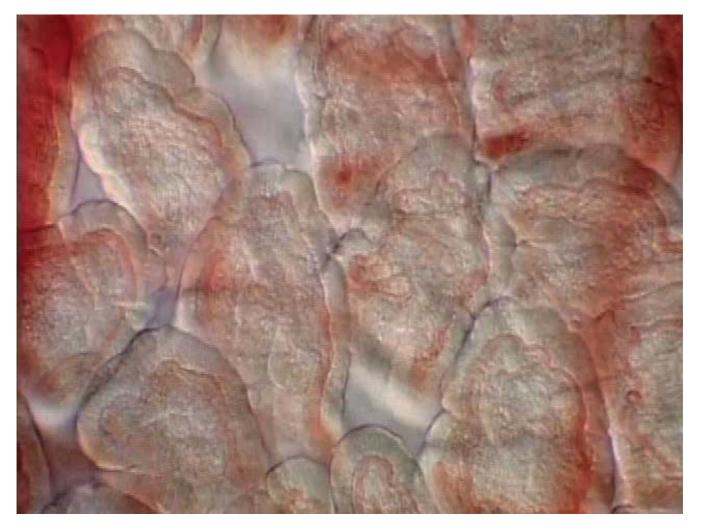
本プレゼンテーションには、中外製薬の事業及び展望に関する将来見通しが含まれていますが、いずれも、既存の情報や様々な動向についての中外製薬による現時点での分析を反映しています。

実際の業績は、事業に及ぼすリスクや不確定な事柄 により現在の見通しと異なることもあります。



## 小腸における正常幹細胞

- ◆表面を覆う上皮細胞は3日程度で新しい細胞に入れ替わっている
- ◆絶えず新しい細胞が幹細胞から生みだされている



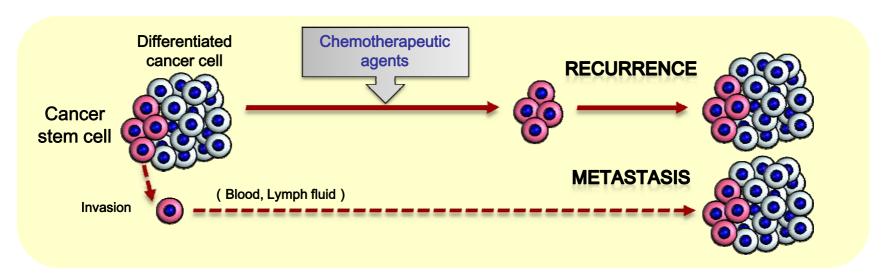
# 「がん幹細胞」とは



◆がん幹細胞の定義(2006年、米国がん学会)

腫瘍内に存在し、自己複製能と腫瘍を構成するさまざまな系統のが ん細胞を生み出す能力(多分化能)を併せ持つ細胞

- → 腫瘍組織は、正常幹細胞が何らかの変異によってがん幹細胞に変化し、出来ると言われています。出来上がった腫瘍組織はごく少数のがん幹細胞と分化したがん細胞から構成されます。この特徴を、階層性を形成すると言います。
- → 抗がん剤や放射線治療に対する抵抗性や、がんの再発や転移に 関与する一つの原因にがん幹細胞の存在が考えられています。



# CHUGAI

## 「がん幹細胞」の分離方法

がん幹細胞と分化した様々ながん細胞を含む細胞集団からがん幹細胞を濃縮・分離するために、様々な方法が用いられてきました。しかし、がん幹細胞のみで構成される細胞集団を細胞株として樹立・維持することは困難でした。

#### 今まで試みられてきた方法の例

◆Spheroid形成による分離

細胞を無血清、浮遊培養する事により球形の細胞塊 (spheroid)を形成させ、がん幹細胞を濃縮する



◆Side population分画による分離

がん幹細胞は抗がん剤抵抗性であるとの想定から、 DNA結合試薬を細胞内に取り込ませ、その排出能力 の高い細胞集団を分離・取得する



◆表面マーカーによる分離

がん幹細胞膜表面に特異的に発現していると考えられる分子に対する抗体を用い、同分子の発現細胞を 分離・取得する







# 大腸がん幹細胞株を樹立し、その性質を 明らかにした研究です

LGR5-positive colon cancer stem cells interconvert with drug-resistant LGR5-negative cells and are capable of tumor reconstitution

STEM CELLS 2012; 30: 2631-2644



# 本研究の発端

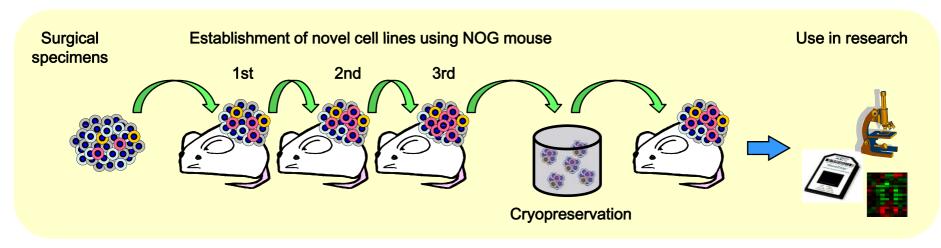
- ◆臨床大腸がん組織をNOGマウスに移植してがん組織を継代する過程で、必ず同じ構造を有するがん組織が形成されることがわかってきました。これにヒントを得て、継代されたがん組織の中にはがん幹細胞が常に存在し、かつ、濃縮されるという考えに至り、そこから安定的に培養が可能ながん幹細胞株を樹立しようと考えました。
- ◆多くの培養条件を検討する中で、今まであまり試みられたことのない付着型培養を行うことで、安定したがん幹細胞株を樹立できました。
- ◆がん幹細胞は環境によっていろいろな形態をとって生き 残るという仮説を立て、薬剤処理による変化を観察しよ うと考えました。



# NOGマウスを用いた大腸がん組織の継代

◆PharmaLogicals Research (シンガポール)にて、手術摘出組織から NOGマウスを用いて大腸がん組織を継代

Process for the establishment of colon cancer cell lines

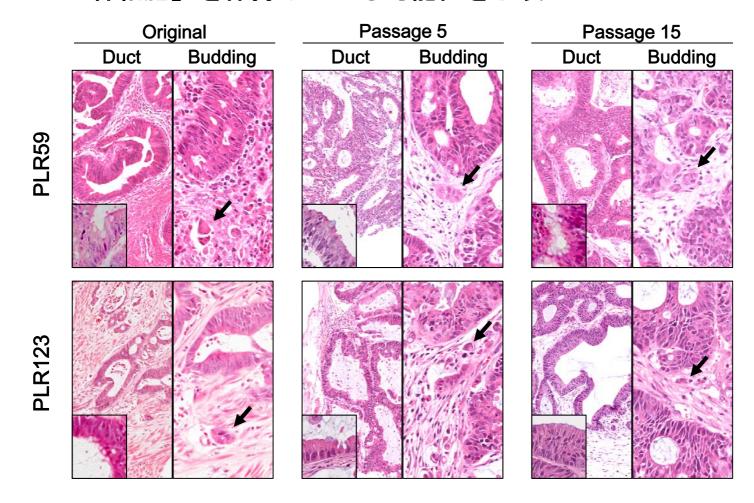


- ▶免疫不全マウスは、異種移植細胞の腫瘍形成能、形成された腫瘍組織の階層性解析というがん幹細胞研究における重要な研究ツール
- ▶本研究では、公益財団法人 実験動物中央研究所にて開発された新たな免疫不全マウス(NOGマウス)を用いた



## 継代した大腸がん組織の病理像

- ◆継代過程においても、階層性およびbuddingを含む腫瘍の組織構造が 維持された
  - ⇒「がん幹細胞」を保持している可能性を示唆





### 正常幹細胞マーカー:LGR5

- ◆正常小腸の幹細胞として、二つのタイプの細胞が報告されている
  - ▶LGR5陽性で増殖する幹細胞(LGR5+ CBC細胞)
  - ▶LGR5陰性で増殖していない幹細胞(+4細胞)

### Normal intestine Crypt base 000 6 000 0 900 +4 cell (LGR5<sup>-</sup>) LGR5<sup>+</sup> crypt base columnar cell Paneth cell that Crypt base supports the growth

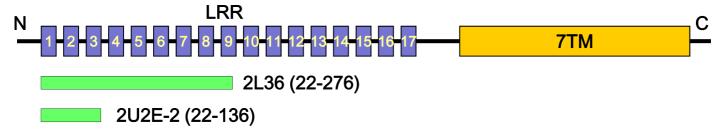
of LGR5+ cells



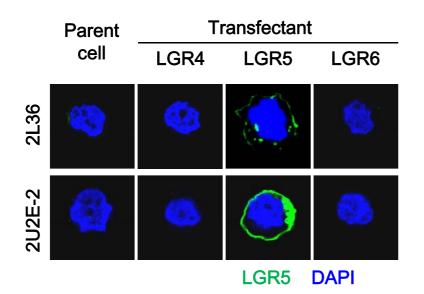
## 抗LGR5モノクローナル抗体の創出

◆ 幹細胞研究に利用可能な二つのLGR5特異的抗体 (2L36、2U2E-2) を創出した

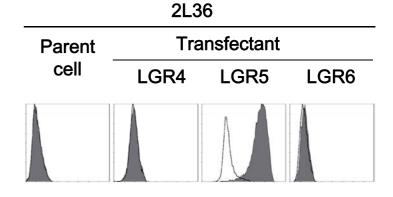
Epitopes of the anti-human LGR5 monoclonal antibodies



#### **Immunocytochemistry**



#### Flow cytometry analysis

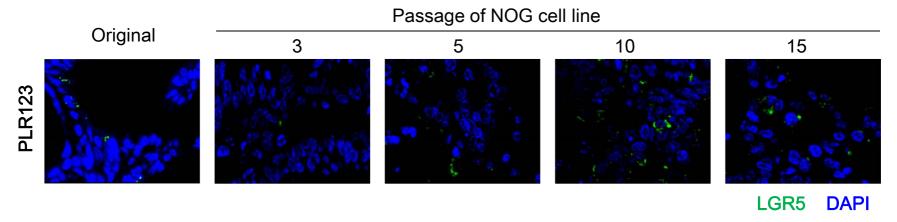


# 継代した大腸がん組織における LGR5+細胞の存在



◆LGR5<sup>+</sup>細胞は、NOGマウス継代においても安定的に観察され、継代により濃縮された

Immunostaining of LGR5 in the surgically resected tumors and xenografts



◆腫瘍形成実験によって、濃縮を示唆する腫瘍形成能の上昇が確認された

#### Tumor initiating activity of the cells from xenografts of PLR123

Passage	Cell num	ber per inocul	Estimated	
	1,000	100	10	CSC frequency
5	5/6	0/6	0/6	1/720
14	6/6	2/6	0/6	1/234

Tumor growth was determined 49 days after inoculation of tumor cells into NOG mice.

# Spheroid培養では純化された細胞株は



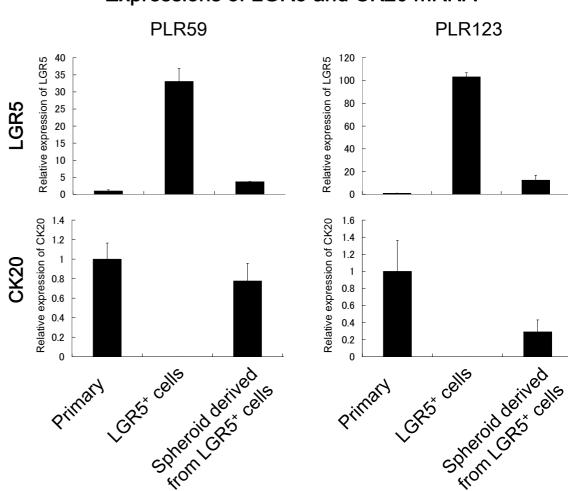
# 得られなかった

◆Spheroidには、LGR5⁺がん幹細胞に加え、分化した細胞(CK20陽性細胞)が共存していた

**Immunocytochemistry** 

# PLR123 PLR59 LGR5 DAPI CK20

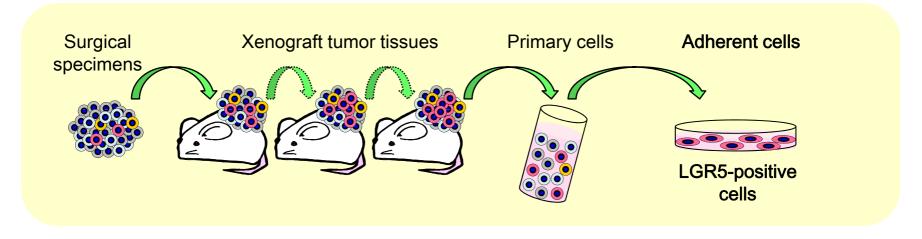
#### Expressions of LGR5 and CK20 mRNA



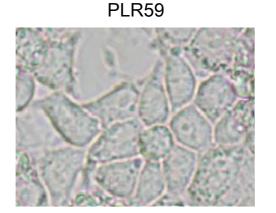
# 付着培養により、 安定したLGR5+がん幹細胞株を樹立

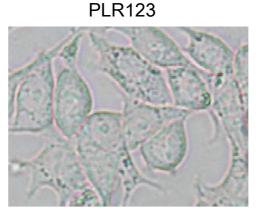


#### Process for the establishment of colon CSC lines



#### Phase contrast microscopy of the LGR5+ cell lines







## がん幹細胞株であることの確認

- ◆我々の細胞が「がん幹細胞」であるためには、以下の点を実験で確認しながら進めることが求められる
  - 1. 腫瘍形成能を有する
  - 2. 対称分裂により自己複製する
  - 3. 非対称分裂により分化細胞を生み出す
  - 4. 薬剤などに耐性を示す



## LGR5<sup>+</sup>がん幹細胞株の腫瘍形成能

#### ◆付着培養により樹立した細胞株は、高い腫瘍形成能を示した

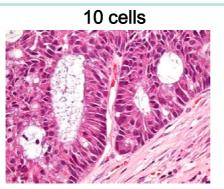
Tumor initiating activity of the cells from the primary, spheroid and adherent

Line	Preparation	Cell number per inoculation site		Estimated		
		1,000	100	10	1	density of CSCs
PLR59	PLR59 Primary		5/12	0/12	-	1/195
	Spheroid formed from primary cell	6/6	6/6	1/6	-	1/31
	Adherent (LGR5 <sup>+</sup> CSCs)	6/6	6/6	6/6	1/12	1/4
PLR123	Primary	12/12	6/12	0/12	-	1/161
	Spheroid formed from primary cell	6/6	5/6	2/6	-	1/45
	Adherent (LGR5 <sup>+</sup> CSCs)	6/6	6/6	6/6	2/12	1/4

Tumor growth was determined 70 days after inoculation of tumor cells into NOG mice.

#### ◆形成された腫瘍は、臨床大腸がんの組織構造を保持していた

Histopathology of xenograft derived from the adherent cultured cells (PLR123)

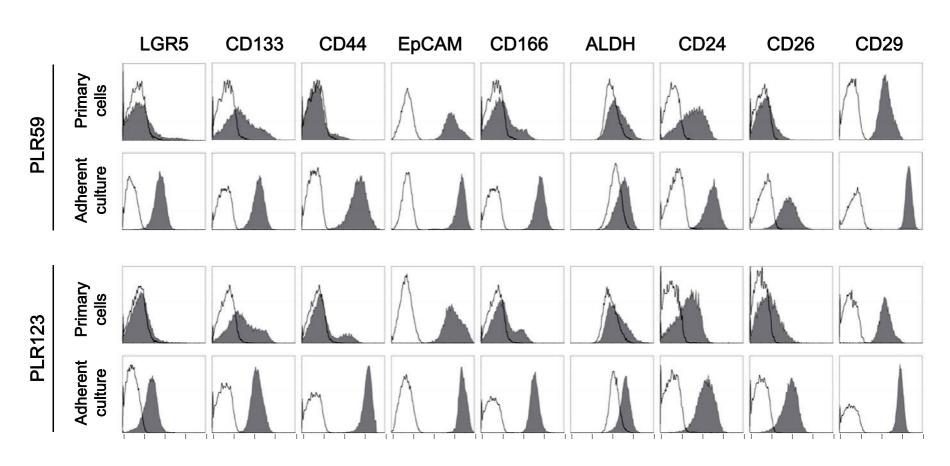




# LGR5<sup>+</sup>がん幹細胞(CSC)における CSCマーカーの発現



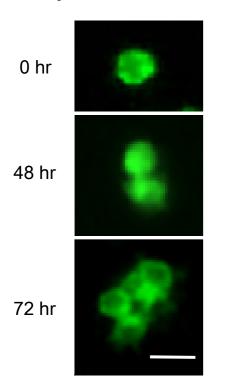
◆既報の大腸がん幹細胞のマーカーをすべて発現していた



# LGR5+がん幹細胞の自己複製能と多分化能ででする

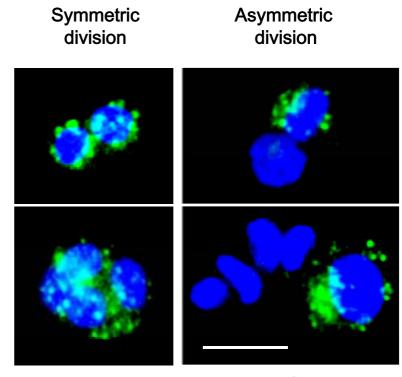
#### ◆対称分裂による自己複製能と、非対称分裂による多分化能を有していた

#### Symmetrical division



Symmetrical division of the LGR5<sup>+</sup> CSCs stained with PKH67 dye (PLR123)

#### Symmetrical and asymmetrical divisions



LGR5 DAPI

Symmetrical and asymmetrical divisions of the LGR5<sup>+</sup> CSCs in the presence or absence of matrigel and FBS (PLR123)



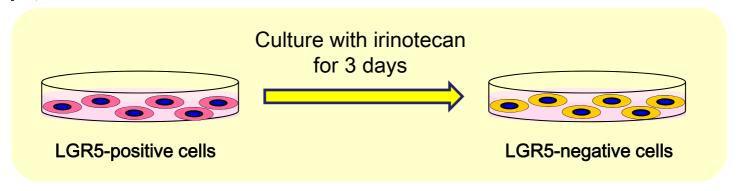
# がん幹細胞株であることの確認

- ◆我々の細胞が「がん幹細胞」であるためには、以下の点を実験で確認しながら進めることが求められる
  - 1. 腫瘍形成能を有する
  - 2. 対称分裂により自己複製する
  - 3. 非対称分裂により分化細胞を生み出す
  - 4. 薬剤などに耐性を示す

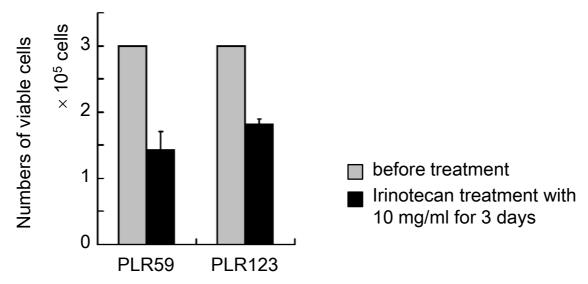
# イリノテカン処置による 薬剤耐性LGR5-細胞の誘導



◆LGR5+細胞へのイリノテカン処置により、薬剤耐性LGR5-細胞が誘導 された



#### Effect of irinotecan on survival of LGR5+ CSCs



Cells were cultured for 3 days under an adherent condition.

# イリノテカン誘導 薬剤耐性LGR5<sup>-</sup>細胞の特徴



◆薬剤耐性LGR5<sup>-</sup>細胞は、増殖性を示さず、未分化性を維持していた

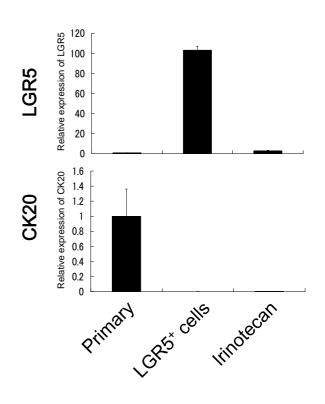
Ki67 staining of the LGR5<sup>+</sup> and LGR5<sup>-</sup> CSCs (PLR123)

Irinotecan treatment

# Before After Ki67 LGR5 DAPI

10 μg/mL of irinotecan for 3 days

# Expressions of LGR5 and CK20 mRNA (PLR123)

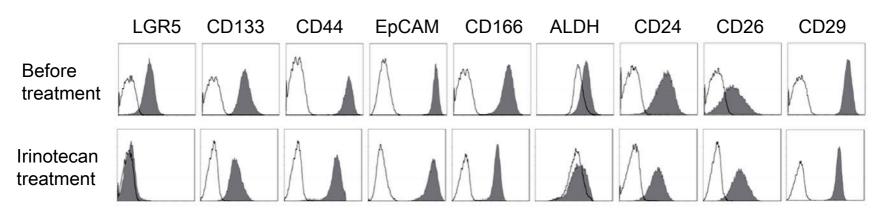


10 μg/mL of irinotecan for 3 days

# イリノテカン誘導 薬剤耐性LGR5-細胞の特徴



◆LGR5<sup>-</sup> 細胞は、LGR5以外のCSCマーカーをすべて発現していた Flow cytometry analysis of CSC markers (PLR123)



10 μg/mL of irinotecan for 3 days

#### ◆腫瘍形成能を維持していた

#### Tumor initiating activity of LGR5- CSCs

Line	Cell number per inoculation site				
	1,000	100	10		
PLR59	6/6	6/6	2/6		
PLR123	6/6	6/6	1/6		

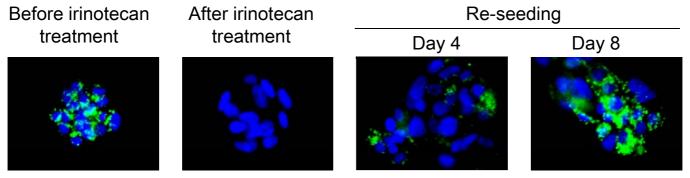
Tumor growth was determined 49 days after inoculation of tumor cells into NOG mice.



## LGR5+細胞とLGR5-細胞の相移行

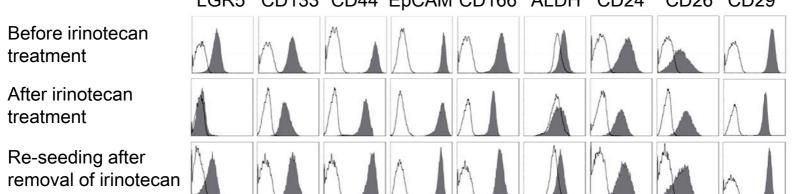
◆LGR5<sup>-</sup> 細胞は、イリノテカンを除去後、再撒種を行うと再びLGR5を 発現し、増殖した

Immunostaining of LGR5 after treatment of the LGR5+ CSCs with irinotecan (PLR123)



10 μg/mL of irinotecan for 3 days

◆再撒種後の増殖した細胞は、CSCマーカーのすべてを発現していた CSC markers of the LGR5<sup>+</sup> CSCs before and after treatment with irinotecan (PLR123) LGR5 CD133 CD44 EpCAM CD166 ALDH CD24 CD26 CD29

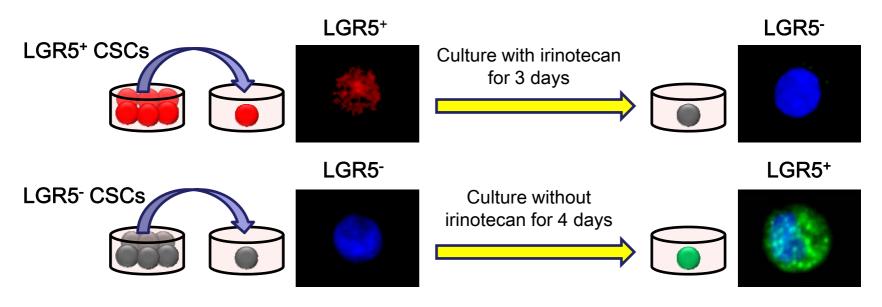




## 単一の細胞を用いた相移行の確認

◆ひとつの細胞の連続観察により、がん幹細胞がLGR5+の状態と LGR5-の状態とを相互移行することを確認

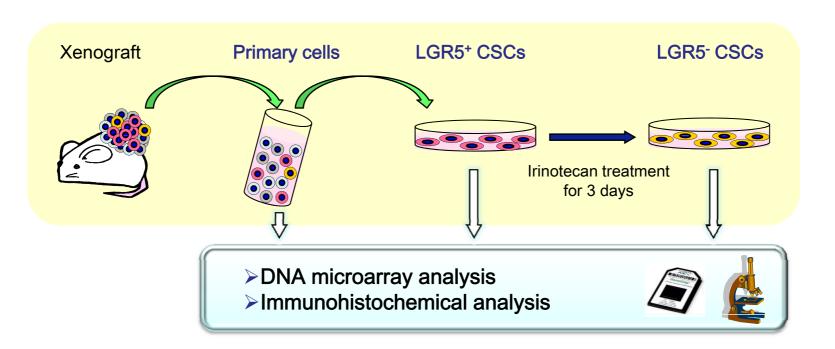
Interconversion of LGR5<sup>+</sup> and LGR5<sup>-</sup> states in vitro





# 薬剤耐性LGR5-細胞マーカーの探索

◆薬剤耐性LGR5<sup>-</sup> 細胞に特異的に発現する分子、ならびに、LGR5の発現の有無にかかわらずがん幹細胞に特異的に発現する分子を探索するために、遺伝子発現、タンパク質発現を解析した





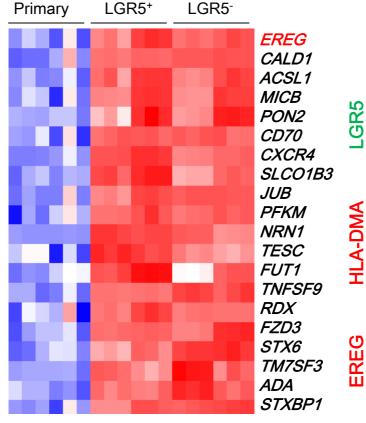
# 薬剤耐性LGR5-細胞マーカーの探索

◆薬剤耐性LGR5<sup>-</sup> 細胞に特異的に発現する分子としてHLA-DMAを、LGR5の発現の有無にかかわらず、がん幹細胞に特異的に発現する分子としてエピレグリン(epiregulin、EREG)を同定

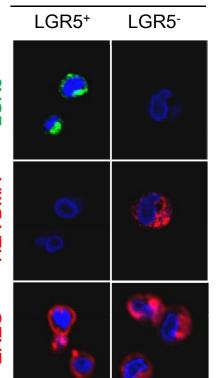
Upregulated in LGR5- CSCs

Primary LGR5<sup>+</sup> LGR5 HLA-DMA TNFSF15 AMIGO2 PROM2 GPR87 **BLNK GPR110** HLA-DMB **GPR172B** GNAI1 FAS **TMEM173** GM2A FLRT3 **STOM** GJB5 ABCA1 SLC6A14 BMPR2 CLDN1

Upregulated in LGR5<sup>+</sup> and LGR5<sup>-</sup> CSCs



Expression of HLA-DMA and EREG in CSCs CSCs

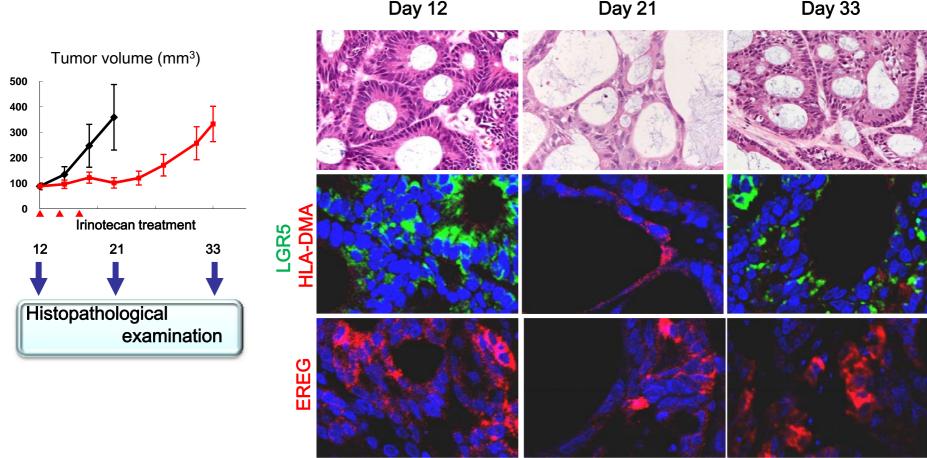


# NOGマウス移植腫瘍に対する イリノテカンの影響



- ◆イリノテカン処置によりLGR5+細胞は減少したが、LGR5-細胞が残存
- ◆イリノテカン処置終了後、LGR5+細胞が発現・増殖し、腫瘍組織が増大

Histopathology and immunostaining of the tumors after treatment of irinotecan (PLR123)



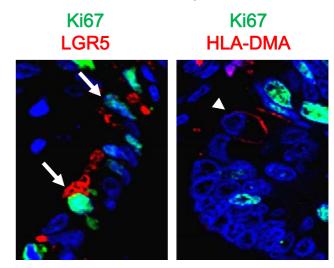
# 臨床大腸がん組織における がん幹細胞の存在



- ◆臨床大腸がん病変には、LGR5+細胞、LGR5-細胞がともに存在した
- ◆発現頻度(12症例):LGR5+細胞 0.003-1.864% LGR5-細胞 0.001-0.243%

Presence of LGR5<sup>+</sup> and LGR5<sup>-</sup> CSCs in colon cancer tissues from patients

Duct Budding LGR5 **EREG** LGR5 **EREG HLA-DMA HLA-DMA**  Ki67 staining of the LGR5<sup>+</sup> and the LGR5<sup>-</sup> / HLA-DMA<sup>+</sup> CSCs in colon cancer tissues from patients

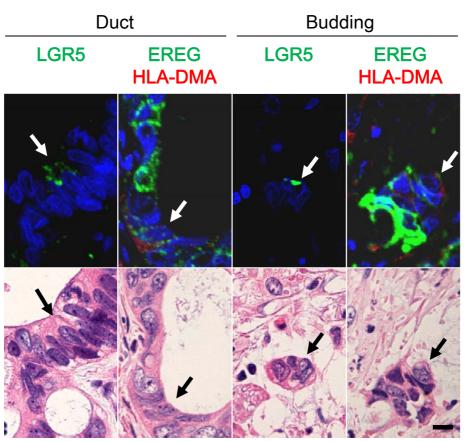


# 臨床大腸がん転移病変における がん幹細胞の存在



◆大腸がんの代表的な転移部位である肝臓の転移病変(大腸がん肝臓 転移病変)の臨床サンプルにおいても、LGR5+、LGR5-細胞がとも に存在した

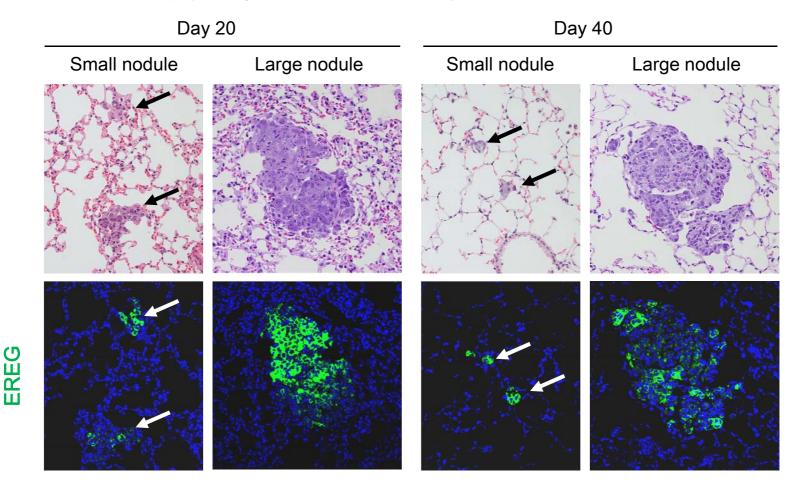
Presence of LGR5<sup>+</sup> and LGR5<sup>-</sup> CSCs in liver metastatic tumors from patients





## LGR5+細胞による肺転移モデル

- ◆LGR5+細胞は、マウスへの静脈内投与により肺に腫瘍組織を形成した
- ◆形成された腫瘍塊の細胞は、EREGを発現していた

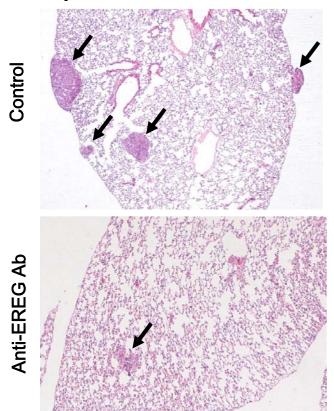




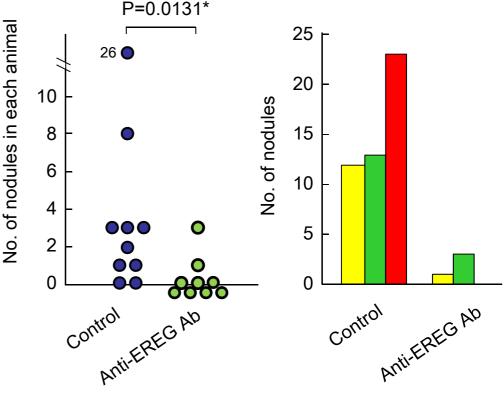
# 抗EREG抗体による大腸がん肺転移の抑制

◆抗EREG抗体を投与したマウスでは、腫瘍塊の数・サイズの減少が みられ、抗EREG抗体の抗腫瘍効果が示された

Histopathology of tumors with or without administration of anti-EREG antibody



Antitumor activity of anti-EREG antibody





## 大腸がん幹細胞研究の成果

- ◆ 大腸がん幹細胞を安定的に培養可能な細胞株として樹立した。
- ◆大腸がん幹細胞は、環境によって、増殖性の相と非増殖性の薬 剤耐性の相を相互に移行し得ることが明らかとなった。
- ◆臨床大腸がん組織にも、増殖性と非増殖性(薬剤耐性)の二つの相のがん幹細胞が存在することが明らかとなった。
- ◆増殖性と非増殖性(薬剤耐性)のどちらの相のがん幹細胞にも 発現しているエピレグリンを標的分子とする治療薬の可能性が 示された。
- これらの研究成果は、がんの再発・転移、薬剤耐性のメカニズム解明と新たな治療薬開発へ貢献しえるものと考えられる。

# お問い合わせ先:広報IR部

## 報道関係者の皆様:広報グループ

Tel: 03-3273-0881

e-mail: pr@chugai-pharm.co.jp

担当:相川、河原、宮田、荒木

## 投資家の皆様:IRグループ

Tel: 03-3273-0554

e-mail: ir@chugai-pharm.co.jp

担当:内田、時田、喜多村、蓑島