

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06837

研究課題名(和文) 微小環境での「幹細胞型」および「分化増殖型」がん細胞の増殖機構と制御因子の解析

研究課題名(英文) Mechanisms of induction of cancer stem cells in the bone microenvironment ;
involvement of drug resistance for bone metastasis

研究代表者

二口 充 (FUTAKUCHI, Mitsuru)

長崎大学・病院(医学系)・准教授

研究者番号：60275120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨転移巣におけるがん幹細胞の関与を検索する目的で、骨および皮下微小環境の違い、TGF- β シグナルの関与および治療抵抗性との関連を検索した。骨微小環境における乳がん細胞の増殖巣において、がん幹細胞のマーカーであるCD44、SOX2およびCD166が陽性となるがん細胞が観察された。TGF- β シグナル阻害剤を投与された腫瘍組織を用いた検索では、骨微小環境におけるがん幹細胞マーカー陽性細胞の割合は皮下微小環境と同じレベルにまで低下していた。これらの結果から、骨微小環境はがん幹細胞のnicheであり、TGF- β シグナルががん幹細胞の維持に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, anti bone metastasis agents which have different targets, was examined to identify the mechanisms for the induction of CSCs in the bone MI. Treatment of bone modifying agents, targeting osteoclasts, did not change the ratio of CSCs in the bone ME as well as subQ ME and treatment of TGF- β signaling inhibitor, significantly reduced that of CSC in the bone ME. Interestingly, inappropriate treatments of anti cancer agent or androgen, targeting prostate cancer cells, significantly increased the ratio of CSCs in the bone ME in our model using androgen independent or dependent prostate cancer cells. Our results indicated that bone MI would be good niche for CSCs, and TGF- β would be involved in the induction of CSCs, and anti-cancer agents combined with those targeting CSC may plays a key role to eliminate the drug resistant bone metastasis of prostate or breast cancer.

研究分野：Pathology, 病理学

キーワード：Bone microenvironment TGF-beta Cancer stem cell

1. 研究開始当初の背景

近年の強力な抗がん剤の開発にもかかわらず、がん末期には転移巣が全身に拡大するため、その死亡率は上昇している。このため転移形成メカニズムの解明と治療標的分子の同定は急務である。原発巣を離脱したがん細胞は、浸潤/脈管循環/生着/転移臓器の微小環境に適応/再増殖といった多段階を経ることで、転移巣として顕在化することが知られている。従って転移を目的とするがん細胞はこれらの多段階を順番に、かつすべてのステップを突破しなければならない。一方で、骨転移や肺転移に關与する細胞や分子は転移先の臓器により異なることが知られている。従って、一連の転移形成メカニズムを突破したがん細胞の生物学的性質/悪性度は、転移先の臓器に特異的であり、原発巣で増殖する段階とは異なることが示唆される。臨床上、原発巣で有効であった治療薬も転移先の臓器によっては抵抗性を示すことも多い。原発巣を離脱し脈管内に侵入したがん細胞は、血流の機械的ストレスや血中の免疫系細胞の攻撃に曝され、大部分が短時間で死滅するが、血中で生存するがん細胞や転移巣において SOX2 などのがん幹細胞のマーカーが陽性となる報告もある。このことから、原発巣を離脱したがん細胞は、脈管を循環する過程で選択を受け、「がん幹細胞」に似た状態でわずかに生き延び、転移臓器の微小環境に到着すると考えられる。がん微小環境 (Tumor microenvironment) に到達後に、がん細胞は様々な物質を産生し周囲の間質組織、すなわち炎症細胞、免疫細胞の他、血管/リンパ管の構成細胞、線維芽細胞や細胞外マトリックスに影響を与え、周囲の間質細胞は、がん細胞の生存/分裂のニッチとして働き、微小環境を増殖に適した環境に整えることが知られている。このように、臓器特異的な微小環境に適応した「分化」したがん細胞が、腫瘍間質相互作用を介して「増殖」した結果、転移巣が形成される。従って、がんの転移巣においては、「幹細胞型」がん細胞と、臓器特異的に増殖する「分化増殖型」がん細胞が混在すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、「幹細胞型」がん細胞が、腫瘍間質相互作用を誘導して微小環境を増殖に適した環境に整え「分化増殖型」がん細胞として再増殖するメカニズムの解明を目的とした。動物モデルを用いて、骨微小環境および肺微小環境においてマウス乳がん細胞と野生型の間質細胞の相互作用が誘導されている組織を作製し、その組織を用いて、微小環境において「幹細胞型」および「分化増殖型」がん細胞の生存/増殖に關与する microRNA およびこれが制御する遺伝子の同定とその機能を明らかにした。

3. 研究の方法

Ex.1 骨、肺微小環境および乳腺微小環境においてがん細胞が増殖する組織の採取

Ex.1-1 骨微小環境においてがん細胞が増殖する組織の採取：マウス乳がん細胞株 4T1 を 6 匹の BalbC 雌マウスの頭蓋骨直上および下腹部乳腺皮下にそれぞれ 1.0×10^6 個移植する。移植後 30 日で増殖した腫瘍塊と頭蓋骨が接する部分では、破骨細胞が誘導され強い溶骨性変化を伴い腫瘍細胞が増殖する組織像が観察される(骨微小環境)。この組織像を示す領域を、4%パラフォルムアルデヒドで固定・パラフィン包埋組織から切り出す。同様の方法で乳腺に移植した腫瘍塊から、原発巣である乳腺でがん細胞が増殖する領域を切り出し対照領域とする。

Ex.1-2 肺微小環境においてがん細胞が増殖する組織の採取：4T1 を 6 匹の雌マウスの乳腺皮下組織に 1.0×10^6 個移植する。移植後 60 日で肺転移巣が形成されるので屠殺剖検する。肺転移巣のパラフィン包埋組織から肺微小環境でがん細胞が腫瘍間質相互作用を行う領域を切り出す。同様に乳腺でがん細胞が増殖する領域を切り出し対照領域とする。

Ex.2 「幹細胞型」および「分化増殖型」がん細胞の増殖に關与する microRNA の同定

Ex.1-1 および Ex.1-2 で採取したパラフィン包埋組織から miRNA を抽出し、

miRNA-Array (3D gene, 東レ) を用い発現低下する miRNA の候補を検索する。このうち、骨および肺微小環境で共通して発現低下する候補、骨あるいは肺微小環境に特異的に発現低下する候補にそれぞれ分類する。さらに定量的 RT-PCR を用いて (Taqman microRNA Assay)、他の個体における発現量を検索し、Array 解析の結果と検証することで、最も差の明瞭な、骨微小環境に特異的な microRNA 1 個、肺微小環境に特異的な microRNA 1 個、微小環境に関わらず共通したものの 1 個にそれぞれ絞り込む。

Ex.3 同定された microRNA の機能の検証

Ex.3-1 同定された microRNA を過剰発現する安定細胞株の作製： Ex.2 で同定した 3 個の microRNA の発現プラスミドをそれぞれ構築し (Geneticin 耐性、タカラ) それぞれをマウス乳がん細胞株 4T1 細胞に NEON transfection system (エレクトロポレーション) を用いて導入する。G418 で選択培養を行い発現を確認した microRNA 過剰発現株を作製する。これにより、骨微小環境に特異的な microRNA を過剰発現させた株、肺微小環境に特異的な microRNA の過剰発現株および微小環境に依存しないがん細胞の増殖に關与する microRNA を過剰発現株を作製する。

Ex.3-2 microRNA 過剰発現株が骨および肺微小環境において生着 / 増殖 / 腫瘍間質相互作用に及ぼす影響： Ex.1-1 および Ex.1-2 と同じ方法で、Ex.3-1 で作製した過剰発現株を動物モデルに移植する。骨微小環境で発現低下する microRNA を過剰発現させた場合、肺微小環境で発現低下する microRNA を過剰発現させた場合、微小環境に共通して発現低下する microRNA を過剰発現させた場合のそれぞれに、骨微小環境においては、がん細胞の生存 / 破骨細胞の活性化 / 溶骨性変化の誘導 / 細胞増殖率を、肺微小環境においては、肺転移巣の形成数 / 細胞増殖率を検索する。

Ex.4 microRNA が制御する遺伝子の同定と機能解析

Ex.4-1 microRNA が制御する候補遺伝子の解析 (*in vitro*)： Ex.3-1 で樹立した 3 つ

の microRNA を過剰発現させた乳がん細胞株のそれぞれにおいて、DNA microarray (東レ) を用い Mock 株に比べて microRNA の過剰発現株で遺伝子発現量が有意に減少する遺伝子を候補遺伝子群 (*in vitro*) とする。

Ex.4-2 microRNA が制御する候補遺伝子の解析 (*in vivo*)： Ex.3-2 で、microRNA 過剰発現株および Mock 株がそれぞれ骨微小環境において増殖した組織 (*in vivo*) の凍結サンプルからそれぞれ RNA を抽出し、DNA microarray (東レ) を用いて microRNA の過剰発現により遺伝子発現量が減少するものを候補遺伝子群 (*in vivo*) とする。

Ex.4-3 がん細胞による腫瘍間質細胞の誘導に關与する遺伝子の同定： *in vitro* および *in vivo* で共通して変動する遺伝子は、間質細胞ではなく、がん細胞に關与するものである。これより骨または肺微小環境において特異的に発現低下する microRNA が制御する候補遺伝子、微小環境で共通して発現低下する microRNA が制御する候補遺伝子のうち、がん細胞の増殖に關与し、間質細胞に作用して腫瘍間質相互作用を誘導する遺伝子をそれぞれ同定することができる。

Ex.4-4 同定された制御遺伝子の機能の検証： 候補遺伝子の siRNA 発現プラスミド (Hygromycin 耐性、タカラ) および候補遺伝子のプラスミド (Hygromycin 耐性、タカラ) を構築する。Mock 株では候補遺伝子は過剰発現しているため、候補遺伝子の siRNA を導入することで、この候補遺伝子を制御する microRNA 過剰発現株と同様の結果が得られるかを検索する。microRNA 過剰発現株では候補遺伝子の発現が低下しているため、候補遺伝子を強制発現させることで、microRNA 過剰発現による作用が中和され、Mock 株と同様の作用が得られるかを検索する。

4 . 研究成果

我々は骨微小環境における前立腺がんや乳がんの増殖を解析できる動物モデルを開発し、プロテアーゼにより可溶化された Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)

や骨基質由来の TGF β が骨転移巣の進展に関与すること、さらに microRNA-205 が TGF receptor 1 および RANK の発現を制御して骨微小環境に豊富な TGF β と RANKL を利用して増殖することを明らかにした。本研究では骨転移巣におけるがん幹細胞の関与を検索する目的で、骨および皮下微小環境の違い、TGF β シグナルの関与および治療抵抗性との関連を検索した。骨微小環境における乳がん細胞の増殖巣において、がん幹細胞のマーカーである CD44, SOX2 および CD166 が陽性となるがん細胞が観察された。これらのマーカーが陽性となるがん細胞の数は皮下微小環境に比べて骨微小環境で有意に多かった。TGF β シグナル阻害剤を投与された腫瘍組織を用いた検索では、骨微小環境におけるがん幹細胞マーカー陽性細胞の割合は皮下微小環境と同じレベルにまで低下していた。これらの結果から、骨微小環境はがん幹細胞の niche であり、TGF β シグナルががん幹細胞の維持に関与することが示唆された。

次に前立腺癌の動物モデルを用いて、治療抵抗性とがん幹細胞の関連を検索した結果、皮下微小環境における前立腺癌細胞の増殖巣において、ドセタキセル(DOX)投与による壊死巣の割合は有意な増加が観察されたが骨微小環境では壊死巣の割合は増大せず、骨微小環境で増殖する前立腺癌細胞に対して DOX は治療抵抗性であることが示された。さらに骨微小環境でのがん幹細胞の割合は有意に増加し、DOX 治療抵抗性の原因ががん幹細胞の増加であることが示唆された。これらの結果から、骨微小環境において増殖するがん細胞の治療標的には、分化増殖型のがん細胞を標的とした化学療法に加え、骨微小環境におけるがん幹細胞を標的とした治療薬との併用療法が必要であることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

1. Hashimoto, K., Ochi, H., Sunamura, S., Kosaka, N., Mabuchi, Y., Fukuda, T., Yao,

K., Kanda, H., Ae, K., Okawa, A., Akazawa, C. Ochiya, T. Futakuchi, M. Takeda, S. Sato, S. (2018). Cancer-secreted hsa-miR-940 induces an osteoblastic phenotype in the bone metastatic microenvironment via targeting ARHGAP1 and FAM134A.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 115, 2204-2209. , 査読あり

2. Futakuchi, M., Nitanda, T., Ando, S., Matsumoto, H., Yoshimoto, E., Fukamachi, K., and Suzui, M. (2018). Therapeutic and Preventive Effects of Osteoclastogenesis Inhibitory Factor on Osteolysis, Proliferation of Mammary Tumor Cell and Induction of Cancer Stem Cells in the Bone Microenvironment. International journal of molecular sciences 19. 10.3390/ijms19030888, 査読あり
3. Li, G. H., Akatsuka, S., Chew, S. H., Jiang, L., Nishiyama, T., Sakamoto, A., Takahashi, T., Futakuchi, M., Suzuki, H., Sakumi, K., et al. (2017). Fenton reaction-induced renal carcinogenesis in Mutyh-deficient mice exhibits less chromosomal aberrations than the rat model. Pathol Int 67, 564-574., 査読あり
4. Tamura, T., Ichikawa, T., Nakahata, S., Kondo, Y., Tagawa, Y., Yamamoto, K., Nagai, K., Baba, T., Yamaguchi, R., Futakuchi, M., et al. (2017). Loss of NDRG2 Expression Confers Oral Squamous Cell Carcinoma with Enhanced Metastatic Potential. Cancer Res 77, 2363-2374. , 査読あり
5. Kawada, M., Inoue, H., Kajikawa, M., Sugiura, M., Sakamoto, S., Urano, S., Karasawa, C., Usami, I., Futakuchi, M., and Masuda, T. (2017). A novel monoclonal antibody targeting coxsackie virus and adenovirus receptor inhibits tumor growth in vivo. Sci Rep 7, 40400. , 査読あり
6. Tuboly, E., Futakuchi, M., Varga, G., Erces, D., Tokes, T., Meszaros, A., Kaszaki, J., Suzui, M., Imai, M., Okada, A., Okada, N.,

- Boros, M., and Okada, H. C5a inhibitor protects against ischemia/reperfusion injury in rat small intestine. *Microbiol Immunol* 60, 35-46, (2016). 査読あり
7. Suzui, M., Futakuchi, M., Fukamachi, K., Numano, T., Abdelgied, M., Takahashi, S., Ohnishi, M., Omori, T., Tsuruoka, S., Hirose, A., Kanno, J., Sakamoto, Y., Alexander, D. B., Alexander, W. T., Jiegou, X., and Tsuda, H. Multiwalled carbon nanotubes intratracheally instilled into the rat lung induce development of pleural malignant mesothelioma and lung tumors. *Cancer Sci* 107, 924-935, (2016). 査読あり
8. Futakuchi, M., Fukamachi, K., and Suzui, M. Heterogeneity of tumor cells in the bone microenvironment: Mechanisms and therapeutic targets for bone metastasis of prostate or breast cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 99, 206-211, (2016). 査読あり
9. Shibata, K., Fukamachi, K., TSuji, T., Saga, T., Futakuchi, M., Nagino, M., Tsuda, H., and Suzui, M., In vivo 18F-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography/computed tomography imaging of pancreatic tumors in a transgenic rat model carrying the human KRASG12V oncogene. *Oncology Letters* 9, 2112-2118. (2015) 査読あり
10. Arimoto, K., Hishiki, T., Kiyonari, H., Abe, T., Cheng, C., Yan, M., Fan, J. B., Futakuchi, M., Tsuda, H., Murakami, Y., Suzuki, H., Zhang, D. E., and Shimotohno, K. Murine Herc6 Plays a Critical Role in Protein ISGylation In Vivo and Has an ISGylation-Independent Function in Seminal Vesicles. *Journal of interferon & cytokine research* 35, 351-358. (2015) 査読あり

〔学会発表〕(計3件)

1. 二口 充 骨微小環境におけるがん幹細胞の維持メカニズムと治療抵抗性の関連. 第26回日本癌転移学会学術総会 大阪, 2017年7月27日-28日. シンポジウム

2. Futakuchi, M. Cancer stem cell in the bone microenvironment. 2015 Seoul National University Cancer Research Institute, Cancer Symposium 2015 April 1-5 Gwanju, Korea, シンポジウム
3. Futakuchi, M. Cancer Stem cells in the bone microenvironment; therapeutic targets for bone metastasis of breast cancer. The 20th Korea- Japan Cancer Research Workshop 2015 Nov.30 - Dec.1, Tokyo, Invited Speaker

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

- 出願状況(計0件)
○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

二口 充 (FUTAKUCHI, Mitsuru)
長崎大学・病院(医学系)・准教授
研究者番号: 60275120

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 なし