

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10139

研究課題名(和文)人工大腸癌幹細胞の特性維持機構の解明に基づいた、大腸癌幹細胞の新規分子標的の同定

研究課題名(英文) Application of induced colon cancer stem cells to elucidation of the molecular basis of cancer stem cell property in colon cancer stem cells

研究代表者

大嶋 野歩 (OSHIMA, NOBU)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：70571454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：癌幹細胞は、癌組織での存在割合が僅かであるために入手・解析が容易でなく、その生物学的特性を決定づける分子機構は未だ明らかとなっていない。

本研究は、特定の転写因子(群)をSW480に導入する手法で人工大腸癌幹細胞を樹立し、その生物学的特性の獲得・維持に係る分子機構を明らかにすることで、大腸癌幹細胞を標的とし得る分子を探索するという新たな系の確立を目的として行った。人工大腸癌幹細胞を作製し、獲得した種々の生物学的特性に対して各導入因子がどのように関与しているかについて調べ、さらに、マイクロアレイにて遺伝子発現プロファイリングを行い、癌幹細胞特性の維持に必須の遺伝子についての解析をすることができた。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanisms underlying the acquisition and maintenance of cancer stem cell (CSC) properties in cancer cells is still unclear because of their rarity in clinical samples.

For establishing a system to develop new therapies and diagnostic technology targeting CSCs, this study aimed to uncover the molecular basis of CSC properties in induced colon CSCs derived from SW480 cells by introducing defined transcriptional factors. In this study, we elucidated the impact of each transduced factor on acquired biological properties in the induced colon CSCs, and also investigated essential genes for maintenance of CSC properties in the cells, using global gene expression profiling with microarray analysis.

研究分野：大腸癌

キーワード：癌幹細胞 人工癌幹細胞 大腸癌 幹細胞生物学 iPS細胞技術

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌幹細胞研究とその問題点

癌組織中に少数ながら存在する癌幹細胞は、多様な細胞からなる癌組織を繰返し再構成する能力(多様性形成能と自己複製能)を持ち、癌予後不良の責任細胞であると考えられている。ゆえに癌治療における新たな治療標的として現在盛んに研究されているが、癌幹細胞の生物学的特性を決定づける分子機構は未だ不明であり、これを標的とする治療法も未確立である。

この一因として、癌幹細胞が癌組織に僅かのみしか存在しないために充分量の癌幹細胞入手が容易でなく、ひいてはその解析が困難であるという問題が挙げられる。したがって、癌幹細胞を標的とする治療法開発のためには、この問題を克服できる研究手法を確立する必要があると考えられる。

(2) 幹細胞生物学における新たな細胞技術: iPS 細胞技術

山中らは、特定の転写因子(OCT3/4:0, SOX2:S, KLF4:K, (C-MYC))を体細胞へ導入し、さらにES細胞培養環境の下で培養することによって体細胞にES細胞の生物学的特性を誘導するという新しい細胞技術、すなわち“iPS細胞技術”を報告した(Cell. 2007, 861-72.)。その後、これらの因子導入後に神経スフェロイドの培養環境を用いることで神経幹細胞特性の誘導が可能である事も報告された(Stem Cells. 2012, 1109-19.)。これらの報告は、この転写因子群の導入が、様々な種類の幹細胞特性を誘導する可能性を持っていることを示唆している。

(3) iPS細胞技術を応用して人為的に作製できる“人工大腸癌幹細胞”

研究代表者・分担者・連携研究者らは、人為的に癌幹細胞を作製することができれば、量的制限なく充分量のサンプルを用いる癌幹細胞の解析が可能となり、上述の癌幹細胞研究の問題点を解決することができると考え、人工大腸癌細胞の作製とその選択的回収法の開発に成功し報告した(PLoS ONE 9(7): e101735.)。この報告では三つの転写因子(OCT3/4, SOX2, KLF4)を同時に大腸癌細胞株SW480に発現させたのち、癌細胞の培養条件で培養することで、一部の細胞が癌幹細胞特性を獲得することを明らかにした。

人工大腸癌幹細胞は、高度な抗癌剤耐性能(5-FU)/sphere形成能/腫瘍形成能(異種異所移植)を獲得しているが、得られた腫瘍の病理学的検討の結果、Mock導入株由来腫瘍が比較的均一な異型細胞から構成され免疫組織学的にCK20(大腸上皮分化マーカー)陰性・CK7陰性・CDX2陽性であるのに対して、人工大腸癌細胞由来腫瘍では細胞極性や腺管様構造がみられ、CK20陽性・CK7陰性・CDX2陽性であったことからヒト大腸癌組織と類似した組織学的特徴のある腫瘍を形成する能力も獲得していることが示された。つまり、人工大腸癌幹細胞は、(親株が持たない)ヒト大腸癌組織の

病理学的特性を持つ腫瘍を形成する能力、*in vivo*での分化能、さらに、(マウス連続移植実験でこれらの表現系が繰返し再現されることから、)自己複製能も有することが明らかとなっている。

このように、人工大腸癌幹細胞は大腸癌の遺伝子背景を持つ細胞株であると同時に、*in vitro/in vivo*で実際の大腸癌幹細胞と同じ表現系を持つ細胞であり、癌幹細胞研究の新たな研究マテリアルとして期待できる。

(4) 癌幹細胞の生物学的特性維持に必須の分子機構

幹細胞と非幹細胞では、特異的転写因子ネットワークが固有に存在し、それぞれの細胞の特性を決定づけていると考えられている(Nat. Genet. 2009, 553-62 / PNAS. 2013, 6412-7)。この概念に基づくと、人工大腸癌幹細胞においても、導入因子の下流で惹起される転写因子ネットワークが存在し、これらが導入因子非依存的に自律的に作用している可能性がある。したがって、人工大腸癌幹細胞に固有の分子ネットワークを明らかにすることができれば、実際の大腸癌幹細胞における癌幹細胞特性維持に必須の遺伝子を明らかにできる可能性がある。

人工大腸癌幹細胞における癌幹細胞特性獲得・維持に必須の分子機構を明らかにし、これらが実際の大腸癌幹細胞と共通の分子であれば、大腸癌幹細胞を治療標的とし得る治療法開発へと発展できる可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、量的制限なく入手可能な人工大腸癌幹細胞を用いて、この細胞が癌幹細胞特性を獲得・維持する為に必須の遺伝子を明らかにすることで、大腸癌幹細胞制御のための分子標的を探索するという、新しい系を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) まず、既報の手法を用いて三つの転写因子(OCT3/4:0, SOX2:S, KLF4:K)をSW480に導入して人工大腸癌幹細胞を樹立し、これを選択的に回収する。同時に、以降の解析をより詳細かつ確実に行うため、各導入因子(O・S・K)をすべての組み合わせ(単または二因子)で導入した細胞株も樹立する。

(2) 個々の導入因子が癌幹細胞特性へどのように影響しているかを調べるため、これらの樹立細胞株すべてを用いて細胞生物学的にこれらの特性評価を行う。

(3) 樹立したすべての細胞株からRNAを抽出・精製し、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行って、人工大腸癌幹細胞で有意に変動している遺伝子を抽出する。

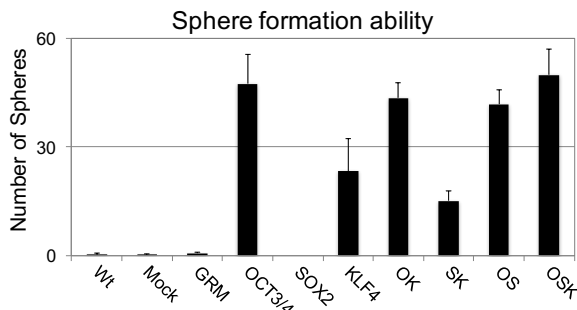
(4) 人工大腸癌幹細胞における癌幹細胞特性に必須の遺伝子・転写因子を明らかにするため(3)により抽出された遺伝子(群)について、機能解析を行う。

4. 研究成果

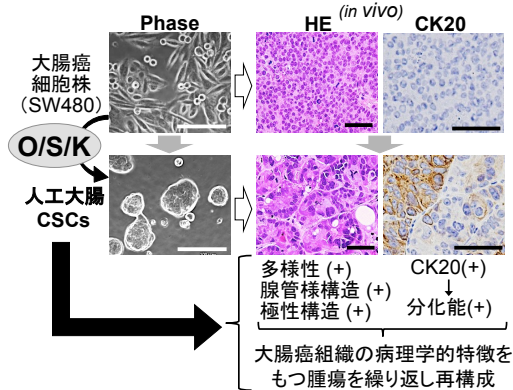
(1) 研究代表者らによる既報の手法を用いて、人工大腸癌幹細胞を樹立し、選択的回収を行った。同時に、すべての因子の組み合わせを導入した細胞株も樹立した。具体的には、①Mock 導入株、②O 導入株、③S 導入株、④K 導入株、⑤OK 導入株、⑥SK 導入株、⑦OS 導入株、⑧OSK 導入株(bulk)、⑨人工大腸癌幹細胞(⑧より選択的に回収)、⑩非人工癌幹細胞集団(⑧のうち⑨以外の細胞集団)の10株を樹立した。

(2) 個々の導入因子が人工大腸癌幹細胞に誘導された癌幹細胞特性へどのように影響しているかを明らかにするために、単因子、二因子、三因子(bulk)それぞれの組み合わせを導入した細胞株それぞれについて生物学的特性を評価した。その評価項目は、人工大腸癌幹細胞が獲得した癌幹細胞特性の中で特に重要と考えられる、スフィア形成能・腫瘍形成能・腫瘍内多様性形成能・細胞極性形成能・薬剤排泄能とした。これらについて評価した結果、スフィア形成能にはOとKが、腫瘍形成能にはKが、細胞極性形成能にはOとKが、それぞれ強く関与することが分かった。また、OSKの組み合わせのみが腫瘍内の多様性形成能に強く関与すること、および、OSの組み合わせは個々を導入した場合と比べて著明に薬剤排泄能が増大することが分かった。

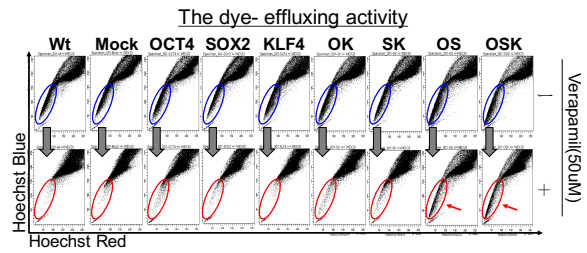
導入因子とスフィア形成能の比較



人工大腸癌幹細胞由来腫瘍の病理学的特徴

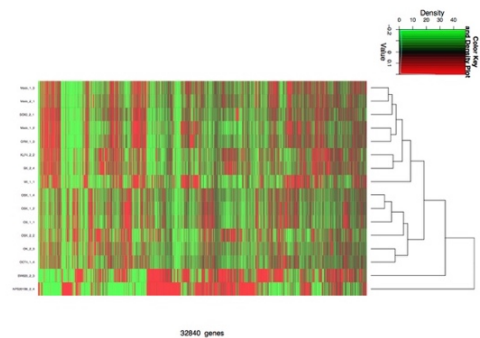


導入因子と薬剤排泄能の比較

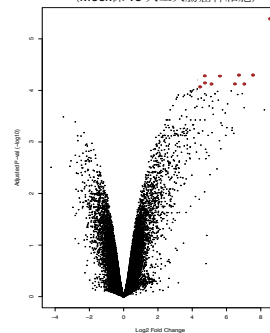


(3) (1) で樹立したそれぞれの細胞株から抽出・精製した RNA を用いてマイクロアレイで網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、各導入細胞株間で差のある遺伝子群の抽出とそのリスト化を行い、さらに人工大腸癌幹細胞で有意に発現変動のみられた遺伝子群を明らかにすることができた。これらについて ontology 解析、gene set enrichment 解析を行い、上記(2)の結果と合わせて、癌幹細胞特性獲得・維持に関わる分子機構についての解析を行った。

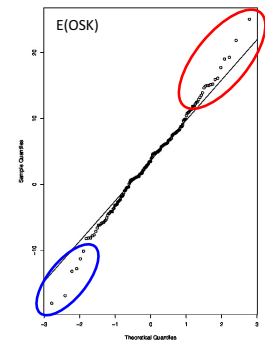
クラスター分析



Volcano plot of microarray data (Mock株 vs 人工大腸癌幹細胞)



Gene Set Enrichment Analysis (Normal Q-Q Plot)



(4) 人工大腸癌幹細胞の特異的遺伝子・転写因子ネットワークを明らかにするために、(3) によって抽出された遺伝子・転写因子のうち上位のものについて、強制発現やノックダウンによる機能解析を用いることで、これらが癌幹細胞特性維持に必須の遺伝子・転写因子であるかどうかの検証を現在進めている。

まとめと今後の展望：人工大腸癌幹細胞を用いて、この細胞での癌幹細胞特性の獲得・維持に参与する候補遺伝子を抽出することができた。今後、これらの遺伝子について上述の検証を進め、人工大腸癌幹細胞に必須の分子と考えられるものについては、改めて大腸癌切除検体で発現を確認し、さらに予後との関わりについても調べる予定である。

人為的に作製した人工大腸癌幹細胞における癌幹細胞特性維持に必須の分子基盤を明らかにすることで、実際の大腸癌幹細胞を標的とし得る分子を特定するという研究はこれまでに報告されていない。当該研究によって、大腸癌幹細胞の分子機構を明らかにできる可能性があり、癌幹細胞を標的とする新たな大腸癌治療法の開発へと展開していくことが期待される。

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3件)

①Sakaguchi M, Hisamori S, Oshima N, Sato F, Shimono Y and Sakai Y.
miR-137 Regulates the Tumorigenicity of Colon Cancer Stem Cells Through the Inhibition of DCLK1
Mol Cancer Res. 査読あり 14(4)354-362. 2016.
DOI:10.1158/1541-7786.MCR-15-0380

②大嶋野歩、青井貴之.
iPS細胞と大腸がん - 人工大腸がん幹細胞の作製.
G. I. Research. 第24巻, 第2号, 81-89,
2016. 査読無し

③ Ishida R, Koyanagi-Aoi M, Oshima N, Kakeji Y and Aoi T.
The Tissue Reconstructing Ability of Colon CSCs is Enhanced by FK506 and Suppressed by GSK3 Inhibition.
Mol Cancer Res. 15(10)1455-1466. 2017.
査読あり, DOI:10.1158/1541-7786.MCR-17-0071

[学会発表] (計3件)

①Oshima N, Yamada Y, Sakai Y, Aoi T.
Application of iPS Technology to Cancer Stem Cell Research: Generation of Induced Cancer Stem Cells from Colon Cancer Cells by Introducing OCT3/4, SOX2 and KLF4.
International Society for Stem Cell Research 2015/06/25, Stockholm, Sweden

②坂口正純、久森 重夫、大嶋 野歩、坂井 義治.
大腸癌幹細胞におけるmiR-137/DCLK1 axisの重要性.
第14回日本臨床腫瘍学会学術集会
2016/07/28, 神戸国際会議場 (兵庫県)

③Sakaguchi M, Hisamori S, Oshima N and Sakai Y.

microRNA-137/DCLK1 axis: A novel mechanism regulating tumorigenicity of colon cancer stem cell
the American Association for Cancer Research Annual Meeting, 2016/04/16, New Orleans, LA

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大嶋 野歩 (OSHIMA Nobu)

京都大学・医学研究科. 客員研究員

研究者番号: 70571454

(2) 研究分担者

坂井 義治 (SAKAI Yoshiharu)

京都大学・医学研究科. 教授

研究者番号: 60273455

久森 重夫 (HISAMAORI Shigeo)

京都大学・医学研究科. 特定病院助教

研究者番号: 50534351

(3) 連携研究者

青井 貴之 (AOI Takashi)

神戸大学・科学技術イノベーション研究科.

教授

研究者番号: 00546997

(4) 研究協力者

()