

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14390

研究課題名(和文) 上皮幹細胞のがん化過程における活性酸素によるチェックポイント制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation epithelial stem cells by reactive oxgens species during oncogenic transformation

研究代表者

岡本 康司 (Okamoto, Koji)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：80342913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：一般に活性酸素は正常細胞の増殖に抑制的に働くが、研究代表者らは、大腸がん由来がん幹細胞において、高レベルの活性酸素が細胞増殖にむしろ促進的に働く事を見いだした。そこで、がん化に伴う活性酸素による細胞増殖の抑制機構の解明を目指した。正常及び大腸がん部由来の上皮細胞を三次元培養により樹立し、これらの細胞における産生酵素レベルの解析、及び遺伝子発現解析を行った。その結果、大腸がんの発生に伴い、活性酸素の産生酵素であるNADPHオキシダーゼの上昇が認められた。今後、産生酵素の誘導、及び活性酸素に対する感受性等の動態を調べる事により、活性酸素チェックポイント破綻の全体像が理解されると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In general, reactive oxygen species (ROS) inhibit proliferation of non-tumor cells. Recently we found that high levels of ROS function to promote proliferation of colon cancer stem cells in vitro. We aimed to elucidate the molecular mechanism by which ROS differentially affect cell proliferation during carcinogenesis. In order to investigate the regulation of ROS levels during colon carcinogenesis, we established the in vitro three-dimensional culture from non-tumor and tumor tissues, and examined the gene expression profiles as well as ROS levels. We revealed that levels of NADPH oxidase increased during the carcinogenesis. Detailed investigation based on these observation is underway.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：癌

1. 研究開始当初の背景

正常幹細胞においては、活性酸素 (ROS) を含めた様々なストレスの影響は最低限に抑えられている。すなわち、これらの細胞においては長期生存を可能にすべく、活性酸素 (ROS) を含めた様々なストレスに対する強力な防御機構を備えていると考えられる。一方、防御しきれない強い侵襲が働くと、細胞増殖を抑制する事により異常な幹細胞の出現を防ぐと考えられる。このような ROS 制御は神経系、血液系幹細胞等で報告されており、成熟幹細胞のかなり普遍的な性質である可能性は高い。外来性及び細胞が産生する内在性 ROS は、細胞の様々な構成因子に特異的、非特異的に作用し、細胞増殖に抑制的に働くが、増殖促進に働かう。がん細胞においては ROS レベルの上昇する事が報告されており、がん化における ROS の関与が指摘されているが、幹細胞のがん化において ROS が関与するかは明らかではなかった。

研究代表者らは、ヒトがん幹細胞のスフェロイド培養による継代培養系を樹立し (Ohata et al, Cancer Res, 72, 5101-5110, 2012)、その本態解明を行っているが、最近、大腸、卵巣がん幹細胞において、ROS のレベルが上昇している事、ROS のレベル上昇が内在性 NADPH oxidase の活性化によりもたらされる事、ROS の上昇が細胞増殖に必須である事という興味深い知見を見出した。この事は、正常幹細胞ががん化する過程で、ROS による増殖抑制が効かなくなり、ROS チェックポイントが破綻する事を示唆している。正常細胞には異常な細胞増殖を感知し抑制する様々なチェックポイント機構があり、その破綻ががん化に繋がるとの考え方が現在のがん細胞生物学の一つのドグマであるが、このような見方からすると、我々の知見は、正常幹細胞の持つ「ROS チェックポイント」の破綻が、幹細胞のがん化を促進する重要なイベントの一つである事を示唆していると捉える事ができる。

2. 研究の目的

「大腸、卵巣等の上皮系組織において、正常幹細胞からがん幹細胞への移行過程で ROS チェックポイントが破綻する」という仮説に基づき、正常幹細胞ががん幹細胞に進展する過程で、ROS による細胞増殖抑制機構が失われるか検証し、そうであればその分子メカニズムを明らかにする。具体的には、様々な悪性度のヒト大腸がん手術標本のがん部、及び非がん部より、正常幹細胞、がん幹細胞を含む上皮組織のオーガノイド培養 (Sato et al, Gastroenterology, 2011) を行い、それらの細胞を用いて ROS に対する幹細胞増殖への影響を比較検討する。方法論としては、ROS 刺激を受けた *in vitro* 培養細胞の発現解析を行ない、培養細胞中の幹細胞のがん化と、ROS による増殖シグナルの抑制、細胞死シグナルの誘導等との関連を調べる。これらの検

討により、正常幹細胞において ROS により引き起こされるチェックポイントの分子基盤の解明、及び幹細胞のがん化に伴うその破綻の分子的本態の理解に努めるとともに、がん幹細胞を標的としたがん根治療法開発にむけた研究の礎とする事をめざす。本研究により、幹細胞のがん化過程における、ROS の動態及びその意義を明らかにする事ができると予想され、将来の革新的がん治療に資すると期待される。

3. 研究の方法

(1) ヒト大腸由来の正常幹細胞及びがん幹細胞の樹立を行う。ヒト大腸手術標本のがん部、及び非がん部由来の上皮組織を分離、酵素処理後、報告された手法 (Sato et al, Gastroenterology, 2011) を元にした方法で、幹細胞を含む腸管様組織の、マトリゲル及び各種増殖因子を用いたオーガノイド *in vitro* 培養系を樹立する。

(2) 正常及びがん由来 *in vitro* 培養細胞における ROS レベルの変動の解析を行う。樹立した各培養細胞を単離後、その ROS レベルをフローサイトメトリーにより測定し、非がん部に比しがん部において ROS レベルの上昇が認められるか検証する。可能であればオーガノイドの形状を保ったままで蛍光顕微鏡下、又は凍結切片上でも ROS レベルを検証し、幹細胞における ROS の上昇の有無を確認する。NADPH oxidase の発現、酵素活性を測定し、がん化における誘導の有無を検討する。

(3) 正常及びがん由来 *in vitro* 培養細胞の細胞増殖、生存に対する ROS の影響の検討を行う。ROS レベルを上昇させる事による細胞増殖への影響を各培養細胞で検討する。過酸化水素やフリーラジカル等の ROS 産生を誘導する化合物の投与による ROS 上昇に伴い、細胞増殖が抑制されるか検討し、抑制が認められた場合は細胞周期の停止、アポトーシスや細胞老化の誘導が起きるか調べる。可能であれば、レンチウイルスを用いた NADPH oxidase cDNA の導入、又は対応する shRNA/CRI SPR の導入により ROS レベルを制御することによる影響を解析する。これらの実験を様々ながん部、及び非がん部由来の培養細胞で行い、ROS に対する抵抗性とがん化との相関を明らかにする。

(4) ROS 刺激時における正常及びがん幹細胞のシングルセル遺伝子発現解析を行う。培養細胞に ROS 刺激処理を行った後にシングルセル解析を行い、幹細胞のがん化と ROS 反応性との関連を明らかにする。がん部及び非がん部由来の培養細胞を酵素処理により単一細胞に分離した後、フローサイトメトリーにより、96 well plate に回収する (FacsAria II, Becton Dickinson)。数百個の単離された各細胞に対して、幹細胞及び分化細胞 (enterocyte, goblet cells 等) 特異的遺伝子、NADPH oxidase、アポトーシス関連因子、増殖関連因子等の 48 遺伝子の定量 PCR を行

う (Biomark HD、Fluidigm)。各細胞の発現プロファイルの Heat map より、細胞のクラスタリングを行い、各サンプルにおける幹細胞群を同定するが、LGR5 等の既知の幹細胞マーカーの発現パターンと照合し、その正当性を確認する。同定した幹細胞群において、ROS に対するアポトーシス関連因子、増殖関連因子等の誘導を解析する。このような解析により、幹細胞のがん化が、ROS レベルを上昇させた際の増殖生存関連因子の発現にどう影響を及ぼすか検証し、がん化に伴う大腸幹細胞の ROS 上昇に対する感受性低下の分子メカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

(1) がん幹細胞を含む *in vitro* 培養 spheroid 細胞の血清添加による分化誘導を、主成分解析にて比較した所、分化誘導前後の細胞は、違った細胞群として分離可能であった。これを含めた幾つかの検体を用いた実験により、シングルセル解析の実験系を確立した。

(2) ROS 刺激がん幹細胞及び移植腫瘍の組織免疫学的解析を行った。シングルセル遺伝子発現解析の結果を検証確認するため、解析に用いた遺伝子群の中で、クラスタリングに重要かつ遺伝子産物に対する抗体が入手可能なものに対して免疫染色、フローサイトメトリー解析を行い、幹細胞のがん化に伴う ROS に対する反応性の変化を確認した。

(3) spheroid 培養と並行して、organoid 培養による解析系を確立し、ROS 刺激による影響の解析を目指した。とりわけ、ApcMin マウス大腸発がんモデル由来の、がん部、非がん部、及び正常組織由来の organoid モデルを樹立した。

(4) 上述した organoid モデルにおいて、ROS 産生に関わる NADPH オキシダーゼの発現解析を行った所、定量 PCR 解析により、発がんに伴う顕著な誘導が認められ、発がん過程に伴う ROS レベルの上昇に関与すると考えられた。

(5) がん部由来の培養細胞に関しては、免疫不全マウス (NOG マウス) で移植腫瘍形成を行い、腫瘍組織由来の上皮細胞を用いて同様のシングルセル発現解析を行う事により、*in vivo* においてもがん幹細胞の ROS チェックポイントの破綻が認められるか検証した。これらの実験に関しては、現在進行中である。

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4件)

1. Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. Ishiguro T, Ohata H, Sato A, Yamawaki K, Enomoto T, Okamoto K. Cancer Sci. doi: 10.1111/cas.13155.

(2017) 査読有

2. 月刊「細胞」3月号特集:がん幹細胞の鍵シグナル、「卵巣がん幹細胞の鍵シグナル」岡本康司:(ニューサイエンス社) 49(3), 108-111 (2017) 査読無

3. Establishment and characterization of an *in vitro* model of ovarian cancer stem-like cells with an enhanced proliferative capacity. Ishiguro T, Sato A, Ohata H, Ikarashi Y, Takahashi R, Ochiya T, Yoshida M, Tsuda H, Onda T, Kato T, Kasamatsu T, Enomoto T, Tanaka K, Nakagama H, Okamoto K. Cancer Res. 76, 150-160 doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0361 (2016) 査読有

4. 日本臨床 第73巻第5号(平成27年5月号)特集:がん幹細胞、「がん根治への道程」, 861-865、岡本康司、中釜斉 (2015) 査読無

[学会発表](計4件)

1. 岡本康司、スフェロイド形成による難治がん由来がん幹細胞の培養と特性解析、第39回日本分子生物学会年会シンポジウム、2016/12/2、パシフィコ横浜(横浜)

2. 大畑 広和、塩川 大介、岡本 康司、NADPH oxidase と mTOR Complex 1 のフィードバックループ制御は大腸がん幹細胞性の維持に寄与する、第75回日本癌学会、2016/11/6、パシフィコ横浜(横浜)

3. 岡本康司、ヒトがん幹細胞の *in vitro* 培養系を用いたがん転移制御機構の解析、第4回がん代謝研究会、2016/7/7、鹿児島県民交流センター(鹿児島)

4. 大畑 広和、塩川 大介、岡本 康司、NADPH oxidase activates mTORC1 and maintains the properties of colon cancer stem cells、第74回日本癌学会、2015/10/8、名古屋国際会議場(名古屋)

[図書](計0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
<http://www.nccri.ncc.go.jp/s007/>

6．研究組織

(1)研究代表者

岡本 康司 (OKAMOTO, Koji)
国立がん研究センター研究所・がん分化制
御解析分野・分野長
研究者番号：80342913