

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15609

研究課題名(和文)可視化癌幹細胞における特異的キナーゼ解析と臨床病理学的検証

研究課題名(英文) Specific kinase analysis and clinicopathological validation in visualized cancer stem cells

研究代表者

水野 裕貴 (MIZUNO, Yuki)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60771376

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌および膵神経内分泌腫瘍における、癌幹細胞性についての研究を目的とした。膵癌については、DCLK1という遺伝子が、癌幹細胞性に寄与していることを見出した。さらにこの遺伝子が癌細胞の遊走能を向上させ、膵癌の転移を促している可能性が示唆された。また、膵神経内分泌腫瘍においては、DAXXという遺伝子が癌幹細胞性に関与している可能性を見出した。DAXXの機能低下は、STC2という遺伝子の過剰発現と相関して、腫瘍形成能や、腫瘍内血管造成に関与していることを発見した。これらの遺伝子は、膵癌および膵神経内分泌腫瘍における新たな治療ターゲットとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We studied cancer stem cell characteristics in pancreatic cancer or pancreatic neuroendocrine tumor. For pancreatic cancer, we found that DCLK1 contributes to cancer stem cell survivability. Furthermore, it was suggested that DCLK1 improves the migratory ability of cancer cells and promotes pancreatic cancer metastasis. In pancreatic neuroendocrine tumor, we also found a possibility that DAXX is involved in cancer stem cell characteristics. We found that the combination of DAXX loss and its target gene STC2 overexpression is involved in tumorigenicity and intratumoral vasculogenesis. These genes have potential to be new therapeutic targets in pancreatic cancer or pancreatic neuroendocrine tumor.

研究分野：肝胆膵外科学

キーワード：膵癌 膵神経内分泌腫瘍 癌幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

膵癌は近年、罹患率・死亡率ともに上昇しているものの、5年生存率は10%にも満たず、難治性の代表的な悪性腫瘍として早急に新治療の開発が望まれている。難治性機序には癌幹細胞の関与が示唆され、以前より CD133, CD24, ESA, CD44, CXCR4 といった表面マーカーを指標とした研究が行なわれてきた (Cancer Res 2007)。しかしながら、このような指標は不安定なことが多く、十分な成果が未だに得られていない。そこで我々は幹細胞性を維持する機能そのものに注目し、膵癌幹細胞の存在と動態を明らかにする可視化システムを構築した。幹細胞では一般に休眠性の傾向が強く、プロテアソーム活性が低下していることが知られ (PNAS 2006)、乳癌細胞においてプロテアソーム活性低下と幹細胞性が関連することが報告された (JNCI 2009)。プロテアソーム活性レベルを可視化するために、ユビキチン非依存のプロテアソーム標的部位である ODC-C 末端 37 アミノ酸 (degron sequence) と蛍光蛋白 (ZsGreen) の融合遺伝子をウイルスベクターを用いてヒト膵癌細胞株に導入した。低活性状態では ZsGreen-degron が分解されず、蛍光蛋白が残存するため幹細胞性のリアルタイムなモニタリングが可能となった。セルソーターにより ZsGreen 陽性細胞 (以下 Gdeg-high) を抽出し time lapse microscope で観察したところ非対称性分裂とスフェア形成が認められ幹細胞性を有することが示された。この幹細胞性可視化システムにより、様々な実験への応用が可能となった。

また、膵原発の悪性腫瘍として近年膵神経内分泌腫瘍が近年注目されてきている。希少疾患である膵神経内分泌腫瘍については、基礎研究が膵癌よりも進んでおらず、その幹細胞性についても不明である。希少疾患である膵神経内分泌腫瘍だが、当院は膵神経内分泌腫瘍の専門施設として多くの症例が集まっており、豊富な臨床データ、標本をもとに研究が可能である。

### 2. 研究の目的

癌難治性の原因の一つはその多様性にある。近年、癌組織にも幹細胞性を示す細胞群の内在が示され heterogeneity の根源となることが報告されているものの、その動態や局在には不明な点が多い。本研究では、膵癌における癌幹細胞性およびその分子生物学的特徴を明らかにすることを目的とした。

また、当施設で多くの症例が集まる膵神経内分泌腫瘍についても、現在ほとんど不明である癌幹細胞性について解明することを目的とした。膵癌および膵神経内分泌腫瘍における癌幹細胞を標的とした治療および克服に寄与するものと考えられる。

### 3. 研究の方法

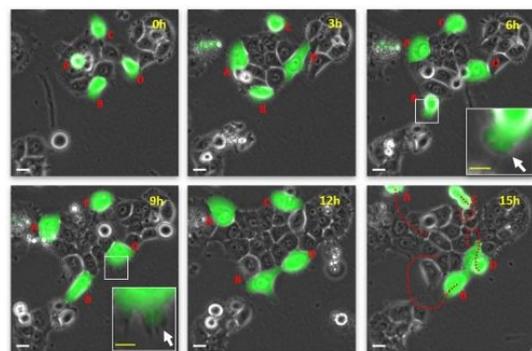
(1) 本研究では、我々が開発した膵癌幹細胞の可視化システム (Gastroenterology 2012) を用いて膵同所モデルを作成し、その局在・ニッチ・転移形態を解析し、生体内での維持機構・転移機序の解明を行う。microRNA アレイ、DNA マイクロアレイを用いて癌幹細胞の特異的発現解析を行うとともに、DNA メチル化やヒストン修飾といったエピゲノムの側面からも解析を行った。

(2) 膵神経内分泌腫瘍については、当院における豊富な臨床データを基に、組織免疫染色や Crispr/cas9 を用いた遺伝子編集細胞を用いた癌幹細胞性の解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) Gdeg-high と Gdeg-low について、各々 RNA を抽出して網羅的遺伝解析を行った結果、Gdeg-high で発現が更新している遺伝子は 483 個、発現が抑制されている遺伝子は 1138 個を同定し、発現が更新している遺伝子群で、浸潤や転移に深くかかわっていると考えられる DCLK1 に着目した。DCLK1 は以前より神経細胞の遊走に関与していることが示されており、近年では消化管の癌幹細胞特異的マーカーとして報告されている。免疫学的染色を行ったところ、Gdeg-high の細胞質に DCLK1 が強く発現していることが示された。DCLK1 を過剰発現させたヒト膵癌細胞株 (KLM1-DCLK1-GFP) を作成したところ、神経細胞での報告と同様に DCLK1 は細胞骨格である微小管を形成する tubulin と merge しており、タイムラプスによる刑事的な観察で、KLM1-DCLK1-GFP は細胞表面に偽足を進展させるなど、いわゆるアメーバ様の形態変化が認められ、遊走・浸潤能力が著しく亢進した (図 1)。

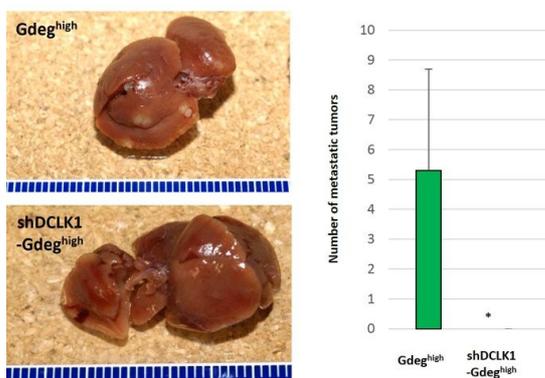
図 1



次に、Gdeg-high に対して RNA 干渉により DCLK1 の発現抑制を行ったところ、遊走・浸潤能力が著しく減弱した。さらに、Gdeg-high から DCLK1 ノックダウン安定株を作成した結果、DCLK1 が抑制された細胞では肝転移が完全に抑制されることが示された (図 2)。さらに、膵癌切除症例で遠隔肝転移巣が切除された 6 症例について DCLK1 の免疫組織学的染色を行うと、原発巣でほとんど認められなかった DCLK1 陽性細胞が転移巣では増加している

ことが確認された。

図 2

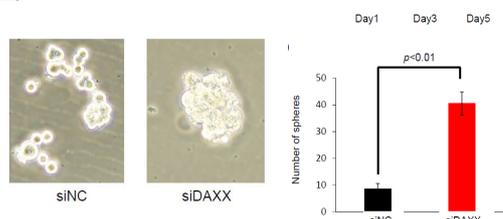


Gdeg-high における DCLK1 高発現のメカニズムとして、ヒストン修飾などのエピジェネティックな調整が関わっている可能性を考えた。幹細胞では、分化制御遺伝子のプロモーター領域に、転写活性化に働く H3K4me3 と転写抑制に働く H3K27me3 が共存する bivalent domain が形成されており、このバランスにより分化制御遺伝子の発現が制御されているとされる。Gdeg-high と Gdeg-low について、DCLK1 におけるヒストン修飾を評価するために、H3K4me3 と H3K27me3 の発現を解析したところ、Gdeg-high では H3K27me3 と比較して H3K4me3 が強く発現しており、DCLK1 の転写が活性化されていることが確認された。

(2) 膵神経内分泌腫瘍において、遺伝子 DAXX の変異やタンパク発現消失の報告があり、その重要性に注目があるまatteringが、膵神経内分泌腫瘍における DAXX の機能については不明である。当院での膵神経内分泌腫瘍症例 44 例について DAXX の免疫組織染色を行ったところ、12 例(27.3%)に発現低下を認め、非機能性腫瘍、Ki-67 指標および WHO グレードの高さと有意に相関していた。

膵神経内分泌腫瘍細胞株に対して SiRNA を用いて DAXX の Knock down を行ったところ、Sohere 形成や腫瘍増殖の上昇が認められ(図 3) DAXX が癌幹細胞性に關与していることが示唆された。

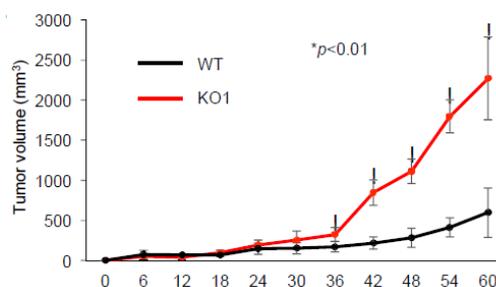
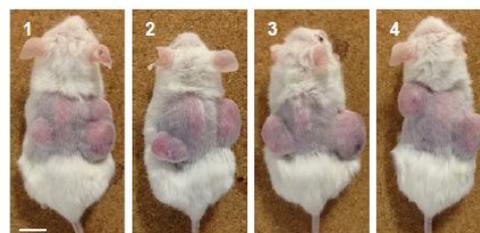
図 3



さらに、Chrispr/cas9 を用いて DAXX-KO 株を作成し、マイクロアレイおよび ChIP 解析を行ったところ、DAXX の転写リプレッサーの直接標的として 12 の遺伝子が同定された。

その中で、STC2 を含む 5 つの遺伝子の発現が、遺伝子 X/H3.3/H3K9me3 経路によって抑制された。STC2 は様々な癌腫で過剰発現している、癌遺伝子として働くことが分かっているが、その機序として、酸化ストレスを抑制し、幹細胞維持に寄与することが報告されている。DAXX-KO 細胞における Sphea 形成能の活性化が、STC2 の knock out によって抑制されることを確認し、マウスの皮下移植モデルで STC2 の発現が高い DAXX-KO 細胞で腫瘍形成能および腫瘍血管密度が有意に上昇することを確認した(図 4)。これらの結果から、STC2 が癌抑制遺伝子として働き、DAXX/H3.3 複合体が膵神経内分泌腫瘍の H3K9me3 を促進することによって標的遺伝子を抑制することが示唆された。DAXX の機能低下と STC2 の過剰発現の組み合わせは、膵神経内分泌腫瘍における有用なバイオマーカーであり、今後治療ターゲットとなりうることを明らかにした。

図 4



## 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 2 件)

上田 浩樹、田中 真二、秋山 好光、et al.

Tumor suppressor functions of DAXX through histone H3.3/H3K9me3 pathway in pancreatic NETs.

Endocr Relat Cancer.

2018 Jun;25(6):619-631. doi: 10.1530

査読有

伊藤 浩光、田中 真二、島田 周、et al.

Dominant Expression of DCLK1 in Human

Pancreatic Cancer Stem Cells Accelerates  
Tumor Invasion and Metastasis.  
PLoS One. 2016 Jan 14;11(1). doi: 10.1371  
査読有

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水野 裕貴 (MIZUNO, Yuki)  
東京医科歯科大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号: 60771376

### (2) 研究分担者

田中 真二 (TANAKA, Shinji)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・教授  
研究者番号: 30253420

秋山 好光 (AKIYAMA, Yoshimitsu)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研  
究科・講師  
研究者番号: 80262187

島田 周 (SHIMADA, Shu)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研  
究科・助教  
研究者番号: 20609705