

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07190

研究課題名（和文）ヒストンリーダーの乳がん幹細胞における役割の解明と阻害剤による分化制御法の開発

研究課題名（英文）Investigation of the role of histone reader in cancer stem cells and application of its inhibition to modulate differentiation ability of cancer stem cells

研究代表者

服部 奈緒子 (Hattori, Naoko)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：30611090

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヒストンリーダー阻害によるがん幹細胞の治療を目的とし、がん幹細胞におけるCDYL2の役割を解析した。CDYL2強制発現がん細胞では、がん幹細胞集団が増加し、がんの浸潤や転移に関わる遺伝子群が上昇していた。CDYL2ノックアウト細胞では、がん幹細胞分画が有意に減少し、レスキューによってその減少はキャンセルされた。CDYL2強制発現乳がん細胞は5-FUに対する感受性が低下し、ノックアウト大腸がん細胞は5-FUとirinotecanに対する感受性が増強した。これらの結果から、CDYL2は大腸がんおよび乳がんのがん幹細胞の維持に関与していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒストンリーダーは、ヒストン修飾を認識後、クロマチン構造変換を誘導して遺伝子の発現を調節し、エピジェネティック情報を細胞の表現系へ変換する重要な因子である。本研究によって、ヒストンリーダーによるがん幹細胞性の制御メカニズムが解明される。また、その阻害による「がん幹細胞の分化制御」によるがん治療の可能性が広がる。さらに、がん幹細胞を死滅させるのではなく、休止状態に保つことで、がん組織自体の増大を押さえ、共存する「がん幹細胞休眠療法」の概念を提唱できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, to develop therapeutic strategy for cancer stem cells by targeting histone reader, we explored the role of human CDYL2 in cancer stem cells (CSCs). Expression of exogenous CDYL2 increased the CSC population in two breast and three colorectal cancer cell lines, and upregulated genes involved in cancer invasion and cancer metastasis. On the other hand, CDYL2-knock-out decreased CSC population in colorectal cancer cells, and its reduction was cancelled by CDYL2-rescue. The effect of CDYL2 expression on drug sensitivity was also investigated. In breast cancer cells with CDYL2-overexpression, the sensitivity to 5-FU was significantly decreased, and in CDYL2-knock-out colorectal cancer cells, the sensitivities to 5-FU and irinotecan were enhanced, indicating the possibility of a combination therapy of CDYL2 inhibitor and cytotoxic drugs. These data demonstrate that CDYL2 is important for maintenance of cancer stem cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：エピジェネティクス ヒストン修飾 がん幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒストンリーダーの重要性

ヒストンリーダーは、ヒストン修飾を認識後、クロマチン構造変換を誘導して遺伝子の発現を調節し、エピジェネティック情報を細胞の表現系へ変換する重要な因子である。リーダーの阻害剤によるがん治療は、BRD4を中心に行われている[Zuker et al, Nature 2011; Delmore et al, Cell 2011]。また最近、メチル化ヒストンのリーダー「クロモドメインタンパク」に関しても、阻害剤の開発や網羅的な解析が進められている [Schapira, Cell Chem Biol 2016]。

(2) がん幹細胞標的治療とがん細胞の可塑性

がん幹細胞を標的とした治療が、前駆細胞・分化細胞の幹細胞化を誘導するという報告がある [Chaffer et al, PNAS 2011; Landsberg et al, Nature 2012]。つまり、がん幹細胞の細胞死を誘導する治療は、分化細胞の代替作用を促す可能性がある。一方、一部のがん幹細胞は細胞分裂の休止状態にあるため、「stem cell exit」を阻止して分化を抑制することで、がん自体の増大を抑えることも可能と考えられる。

(3) 研究代表者の研究開始当初までの成果

(3-1) ES細胞の分化の進行に重要な Cdy12 の同定 (図1)

マウス ES細胞で高発現のクロモドメインタンパク Cdy12 を同定し、H3K27me3 のリーダーであることを明らかにした。Cdy12 は、幹細胞の自己複製能よりも、前駆細胞や分化細胞への分化の進行に重要であることを見いだした。

(3-2) 乳がんにおけるヒト CDYL2 の高発現とがん幹細胞

ヒト CDYL2 は、一部の乳がん細胞株および乳がん検体で高発現しており、過剰発現によりがん幹細胞分画が増加することを見いだした。

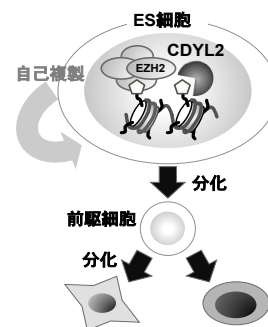


図1 マウス ES細胞における Cdy12 の機能

2. 研究の目的

ヒストン修飾を認識するタンパク質「リーダー」は、エピジェネティック情報を細胞の表現系へと変換する重要な因子である。研究代表者はこれまでに、H3K27me3 のリーダー「Cdy12」が、マウス ES細胞で高発現しており、正常な分化の進行に重要であることを見いだした。また、ヒト CDYL2 が、乳がんを高発現をしていること、過剰発現によって幹細胞分画が上昇するという予備的結果も得ている。

本研究では、ヒト CDYL2 の乳がん幹細胞における役割を明らかにすることおよびその阻害によるがん幹細胞の分化制御の可能性を検討することを目的とする。具体的に以下の3点に関して、研究を遂行する (図2)。

【Aim 1】 CDYL2 の乳がん幹細胞における役割の解明

乳がん幹細胞におけるヒト CDYL2 の標的領域・認識ヒストン修飾・結合タンパクの同定を行う。

【Aim 2】 CDYL2 を標的としたがん幹細胞休眠療法の実験的検討

CRISPR-Cas9 システムで作製したノックアウト細胞および阻害剤 [Dr. James 開発済; ACS Chem Biol 2016] を用いて、がん幹細胞性の変化を解析することにより、がん幹細胞の分化抑制に基づいた「がん幹細胞休眠療法」の可能性を検討する。

【Aim 3】 乳がん検体を用いた発現解析と予後解析

申請者の保有する多数の乳がん検体を用いて CDYL2 の発現を解析し、転移・再発などの予後との相関を解析する。また、組織切片を用いた二重免疫染色により、がん幹細胞マーカー陽性細胞と CDYL2 発現細胞の局在の関係を一細胞レベルで解析する。

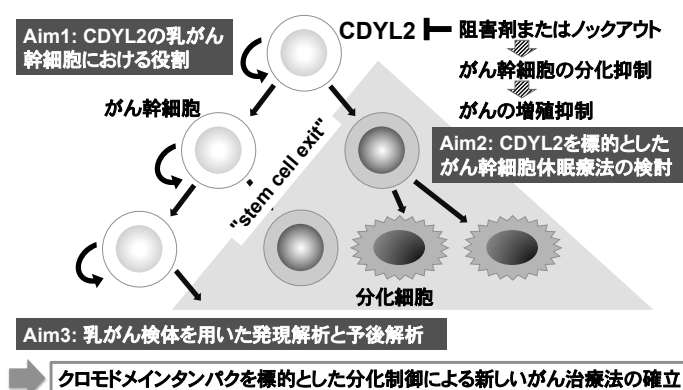


図2 研究内容の概要

3. 研究の方法

【Aim 1】 CDYL2 の乳がん幹細胞における役割の解明

(1) 標的遺伝子の同定

CDYL2 発現細胞株を用いて CDYL2 抗体で ChIP-seq を行い、標的領域を同定する。バルク

細胞の結果から、がん幹細胞性に関わる遺伝子に着目し、FACS で単離したがん幹細胞を用いた少数細胞 ChIP-qPCR を行う。

(2) 結合タンパクおよび認識ヒストン修飾の確認

研究代表者のマウス ES 細胞の解析から、Cdy12 は H3K27me3 を認識することおよび結合タンパク候補が明らかとなっている。これらの情報をもとに、ヒト *CDYL2* 発現細胞株を用いた IP-WB により、認識ヒストン修飾および結合タンパクの確認を行う。また、研究代表者の確立した iChmo 法[Hattori et al, NAR 2013]を用いて、がん幹細胞を用いた可視化法を行う。

【Aim 2】 *CDYL2* を標的としたがん幹細胞休眠療法の検討

(1) ノックアウト細胞の作製

CRISPR/Cas9 システムを用いて *CDYL2* ノックアウト(KO)乳がん細胞株を作製する。

(2) *CDYL2* 阻害によるがん幹細胞性の変化の解析

作製した *CDYL2* KO 乳がん細胞株および阻害剤を用いて、がん幹細胞分画の割合への影響・薬剤感受性の変化・xenograft モデルを用いた腫瘍形成能・転移能の変化を解析する。阻害剤に関しては、Univ. of North Carolina の Dr. James らによって開発・報告が行われているため[ACS Chem Biol 2016]、供与依頼を行う。

【Aim 3】 乳がん検体を用いた発現解析と予後解析

(1) 乳がん検体を用いた発現解析と予後の相関解析

既に解析済みの 40 検体の乳がんでは、*CDYL2* の発現が高い症例を認めている。残りの 130 検体に関しても発現解析を行い、予後との相関を検討する。

(2) *CDYL2* とがん幹細胞の関係について、乳がん検体を用いて検証する。がん幹細胞マーカーと *CDYL2* の二重染色を行い、*CDYL2* 発現細胞の局在の特徴・がん幹細胞マーカーの共存を解析する。また、化学療法前後の検体を用いて *CDYL2* の発現と局在の変化を解析する。

4. 研究成果

【Aim 1】 *CDYL2* の乳がん幹細胞における役割の解明 (図 3)

乳がん細胞株 (SK-BR-3, MDA-MB-231, MDA-MB-468)に *CDYL2* を過剰発現した細胞を樹立した。Aldefroul assay でがん幹細胞集団の割合を測定したところ、コントロール細胞と比較して、*CDYL2* 発現細胞ではがん幹細胞集団が増加していた。また、細胞増殖も *CDYL2* 発現細胞では増加していた。MDA-MB-231 および MDA-MB-468 細胞に関して、発現アレイを行い、IPA によって、発現の上昇した遺伝子群の gene ontology の解析を行なった。すると、がんの浸潤や転移に関わる遺伝子群が上昇していた。これらのことから、*CDYL2* が乳がんのがん幹細胞の機能に関わっていることが明らかとなった。

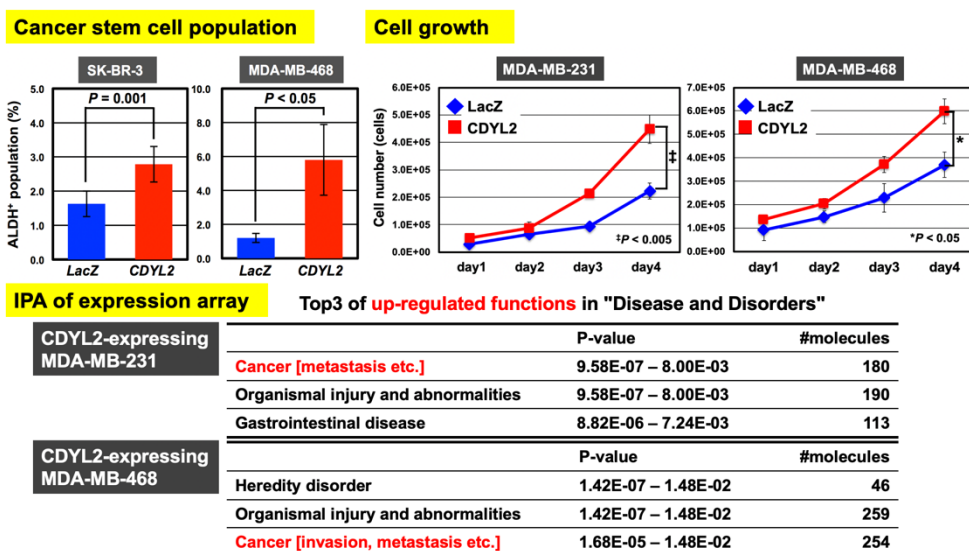


図 3 *CDYL2* 過剰発現の乳がん細胞株の解析

乳がん細胞での解析と同時に、他のがん種における機能も明らかにするために、大腸がん細胞株を用いた解析も行なった (図 4)。*CDYL2* は大腸がん細胞において、乳がんと比較して 10 倍も高く発現おり、大腸がん細胞株 3 株 (DLD-1, HCT116, SW480) を用いて、過剰発現細胞を作製し、幹細胞分画が上昇していることを見いだした (図 4)。

また、siRNA による一過性のノックダウンと行なったところ、CD44CD133 陽性がん幹細胞分画が若干減少した。そこで、*CDYL2* ノックアウト細胞の作製へと移行した。効率の良いノックアウトを行うために、誘導型 Cas9 の細胞株を作成し、CRISPR/Cas9 システムを用いた。その結果、36 クローン中 9 クローンにおいて、両アレルにおける *CDYL2* 遺伝子領域の欠損・*CDYL2* タンパクの完全な消失が観察された。それらのクローンにおいては、がん幹細胞分画が有意に減少した。また、一部のクローンに関して、外因性の *CDYL2* を発現させたレスキュー実験を行なったところ、がん幹細胞の分画の上昇が確認された (図 4)。

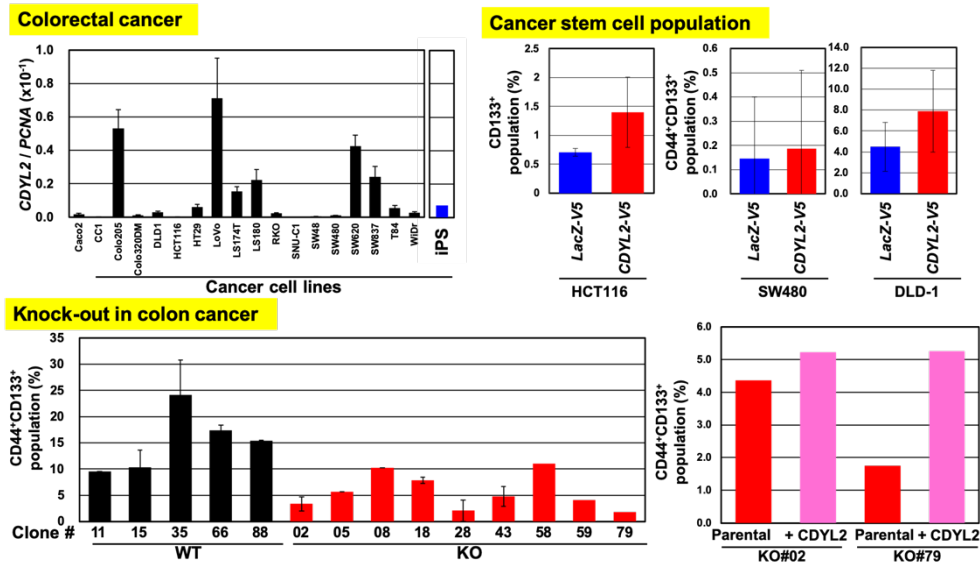


図 4 *CDYL2* の大腸がん細胞株の解析

これらの結果から、*CDYL2* は大腸がんおよび乳がんのがん幹細胞の維持に関与していることが明らかとなった。

結合タンパクの同定に関しては、*CDYL2* の発現の低い乳がん細胞株に V5-tag 付き *CDYL2* を外因性に発現させた。抗 V5-tag 抗体での免疫沈降・Western blotting の条件の確立を行ったので、今後、Western blotting および Mass-spectrometry の解析を行う。

【Aim 2】*CDYL2* を標的としたがん幹細胞休眠療法の検討

CDYL2 の阻害剤に関しては、Univ. of North Carolina の Dr. James の開発した阻害剤を共同研究を締結して入手し、大腸がんへの投与を行った。しかしながら、CD133 陽性の大腸がん幹細胞分画への影響は観察されなかった。投与濃度の最適化・細胞内への移行の確認が必要と考えられる。

Aim 1 において樹立した *CDYL2* の強制発現乳がん細胞株 (MDA-MB-231, MDA-MB-468) を用いて、5-FU と paclitaxel に関する薬剤感受性の変化を解析した。5-FU 投与において、強制発現細胞の cell viability が、コントロール細胞と比較して増強した。特に MDA-MB-231 細胞では有意な差が観察された (図 5)。この結果は、*CDYL2* の過剰な発現により、薬剤への感受性が低下したことを示している。

また、*CDYL2* ノックアウトの大腸がん細胞株 SW620 に関して、薬剤感受性の変化を解析した。野生型 2 株およびノックアウト 2 株を用いて、5-FU と irinotecan の代謝物 SN38 への感受性変化を解析した。

3 日間の処理では野生株とノックアウト株で感受性に差は見られなかった。一方、3 日間処理後に薬剤非存在下で 5 日間培養を行った場合、5-FU 投与において、ノックアウト株の cell viability が野生株と比較して有意に減少した (図 6)。この結果は、*CDYL2* ノックアウトにより薬剤耐性のがん幹細胞分画が減少したことを示唆している。

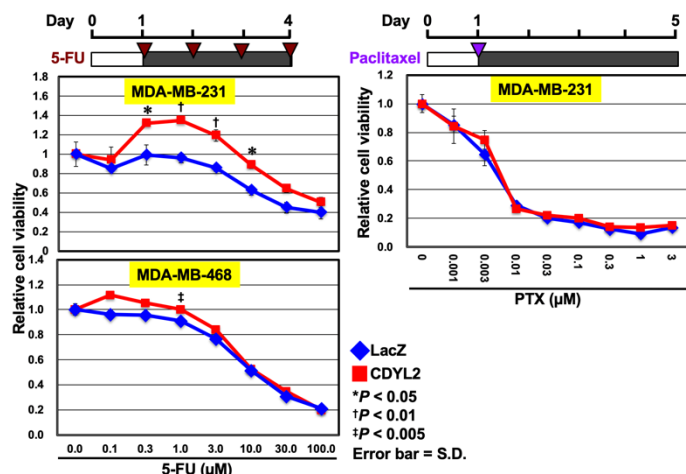


図 5 *CDYL2* 強制発現乳がん細胞株の薬剤感受性の低下

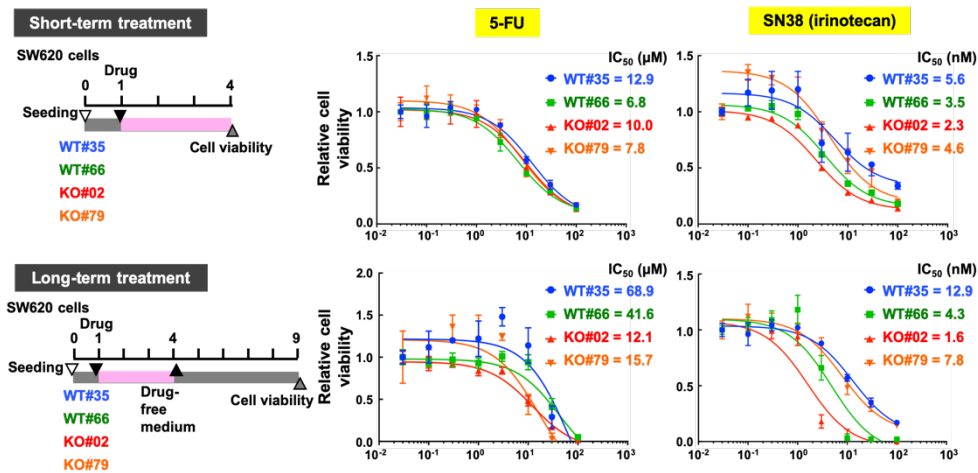


図6 CDYL2 ノックアウト大腸がん細胞株の薬剤感受性の増強

これらの結果から、CDYL2 を標的とした治療と殺細胞薬の併用という新しい治療戦略の可能性が提示された。

【Aim 3】 乳がん検体を用いた発現解析と予後解析

研究代表者の有する乳がん 40 例の予後を解析した。しかしながら、CDYL2 の発現の多寡と乳がんの予後には相関が得られなかった。これは、CDYL2 発現を有する検体が少なかったためと考えられた。

そこで、複数データベースを解析した。PrognScan のデータから、乳がんと卵巣がんに関して、CDYL2 高発現群では、全生存率が低いという結果が得られた (図 7)。

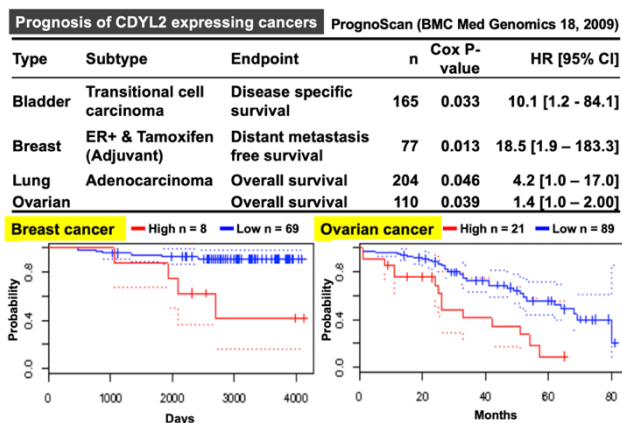


図7 CDYL2 発現とがんの予後の関係

まとめ：

本研究から、ヒストンリーダーである CDYL2 が、大腸がんおよび乳がんのがん幹細胞の増殖および性質の維持に関与していることが明らかとなった。また、CDYL2 を標的とした新しいがん治療への可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hattori Naoko, Sako Magoichi, Kimura Kana, Iida Naoko, Takeshima Hideyuki, Nakata Yoshitaka, Kono Yutaka, Ushijima Toshikazu	4. 巻 11
2. 論文標題 Novel prodrugs of decitabine with greater metabolic stability and less toxicity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Epigenetics	6. 最初と最後の頁 111-123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1186/s13148-019-0709-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Naoko Hattori
2. 発表標題 Identification of a histone reader involved in the maintenance of cancer stem cells
3. 学会等名 Post-A3 Epigenetic Symposium（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoko Hattori
2. 発表標題 Identification of a chromodomain protein, Cdy12, involved in pluripotency of stem cells
3. 学会等名 14th Asia Epigenome Meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 服部奈緒子
2. 発表標題 幹細胞の多能性維持に関するヒストンリーダー Cdy12の同定
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 服部奈緒子
2. 発表標題 口モドメインタンパクCdy12は幹細胞エピゲノムのリーダーである
3. 学会等名 第12回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 服部奈緒子
2. 発表標題 Identification of a histone reader involved in cancer stem cell properties
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 服部奈緒子
2. 発表標題 マウスES細胞の分化開始機序に関わるヒストンリーダーの同定
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naoko Hattori
2. 発表標題 Cdy12 is a chromodomain protein involved in pluripotency of stem cells
3. 学会等名 International Symposium on Epigenome 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 服部奈緒子
2. 発表標題 クロモドメインタンパクCdy12はがん幹細胞の機能を調節している
3. 学会等名 日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Naoko Hattori
2. 発表標題 Cdy12 is a chromodomain protein involved in the regulation of stem cell properties
3. 学会等名 Post-A3 Epigenetic Symposium (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考