

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18160

研究課題名(和文)大腸癌幹細胞における細胞内Ca²⁺ダイナミクスを標的とした新規治療法の開発研究課題名(英文)The development of targeted therapies to Ca²⁺ dynamics in colon cancer stem cells

研究代表者

工藤 道弘(Kudou, Michihiro)

京都府立医科大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：20804264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌幹細胞における細胞生理学的特徴を評価すべく、培養可能な大腸癌幹細胞株を作成し、これらに対して網羅的遺伝子解析を施行した。その結果、細胞容積の変化に関連する遺伝子が癌幹細胞において、特徴的な発現変化を示していることが判明した。細胞容積の変化は、癌のプログラム細胞死であるアポトーシスや癌の進展に關与する遊走、浸潤に関連していることが報告されている。そこで、実際に細胞容積の変化が通常の癌細胞と比較して癌幹細胞において差異があるかを評価したところ、癌幹細胞において低浸透刺激による細胞膨張が抑制されており、さらに低浸透圧刺激による細胞死に対して抵抗性を有していることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌幹細胞において、細胞容積調整に関連するイオン輸送体が高発現し、また低浸透圧刺激に対して耐性を有するという報告は、未だに世界的にも報告されていない。癌幹細胞は過酷な環境下でも生存し、かつ再発や高悪性度の細胞集団の形成に關与すると報告されており、この細胞生理学的特徴を明らかとすることは今後の基礎研究の発展に大いなる進歩を与える可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In the present study, cell lines of cancer stem cells (CSCs) derived from colorectal cancer were established in order to investigate the cellular physiological characteristics of CSCs. The microarray analysis of the established CSCs showed that some ion transporters which generally regulate cellular volume overexpressed in CSCs. The present study reported that the regulation of cell volume are associated with cancer apoptosis, cancer migration and invasion. Therefore, we hypothesized that CSCs acquire the resistance of apoptosis or strong migration ability via the activation of the ion transporters. Cell volume change induced by hypotonic shock was actually suppressed in CSCs. Moreover, CSCs had the resistance of hypotonic stress.

研究分野：Oncology

キーワード：癌幹細胞 大腸癌 イオン輸送体 細胞容積 低浸透圧刺激

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究開始前の先行研究により、食道癌や膵癌細胞株由来の癌幹細胞において、多くの Ca^{2+} チャネルが高発現していることが判明していた。その中でも、ATP2A1, ATP2A3, ORAI, TRPM などは細胞内 Ca^{2+} 濃度の調整に関与し、細胞内 Ca^{2+} イオンダイナミクスを維持するために重要な役割を持つ分子である。この細胞内 Ca^{2+} イオンダイナミクスは、ストレスやアポトーシス刺激が加わることで破綻し、小胞体やミトコンドリア由来に Ca^{2+} 濃度が上昇、その結果細胞死に至ることがこれまで解明されていた。この様な事実を吟味した結果、我々は癌幹細胞において細胞内 Ca^{2+} イオンダイナミクスに関連する分子が高発現しており、このストレスに起因して細胞死に至る経路から回避することで、アポトーシス誘導耐性や、治療耐性を獲得しているという仮説を着想するに至った。特に、高発現している分子である ATP2A1、A3 などはタプシカルギンという特異的阻害剤が存在、かつドラッグデリバリーを用いた化学療法薬剤として用いることを想定した基礎研究、臨床研究が行われている。本研究はこの仮説を検証するために立案され、かつ新たな治療方法の確立を目指すものである。

2. 研究の目的

本研究では『癌幹細胞では Ca^{2+} イオンダイナミクスに関連する遺伝子が高発現し、ストレスによって誘導されるアポトーシスを回避している。これら高発現分子を標的とした薬剤を用いて細胞内 Ca^{2+} 濃度を強制的に上昇させることで、癌幹細胞特異的治療が実現可能である。』という実験仮説の検証を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト大腸癌細胞株、手術切除組織からの癌幹細胞(CSCs)の分離と細胞株樹立

大腸癌細胞株や、手術切除組織を用いて、CSCs マーカー陽性細胞を cell sorter を用いて分離、非血清培養液で培養する。ヒト大腸癌切除組織からも Cancer tissue-originated Spheroid の技術を用いて、CSCs の性質をもつ細胞の抽出を試みる。

(2) 大腸癌幹細胞の網羅的遺伝子解析

項目1で樹立した CSCs の total RNA を抽出し、マイクロアレイ法により解析する。これらの結果を解析し候補分子の目的遺伝子と相補的なプライマーを設計し、RT-PCR 法を用いて発現の再現性についての確認を行う。

(3) 標的遺伝子の発現の意義の検討(細胞生理学的アプローチ)

Multisizer (Beckman coulter 社)を用いて、樹立癌幹細胞、通常癌細胞株における細胞容積変化の比較。低浸透圧刺激を加えた際の容積変化の比較を行う。

(4) 標的遺伝子の発現の意義の検討(細胞増殖能)

低浸透圧曝露時の viability を確認する。様々な浸透圧で細胞に刺激をした後、48 時間培養、MTT assay で細胞の viability の評価を行う。

4. 研究成果

(1) ヒト大腸癌細胞株、手術切除組織からの CSCs の分離と細胞株樹立

多数の大腸癌細胞株を用いて、様々な癌幹細胞マーカーによる癌幹細胞性質を有した細胞集団の抽出を試みた。結果、CD44, CD133 などの癌幹細胞マーカーを用いた抽出法では再現性が得られず、そのため癌幹細胞マーカーとして広く報告される ALDH1 を用いて抽出を行う方針に変更した。

Aldefluor assay を用いて、多数の細胞株における ALDH1 の発現評価を行ったところ、細胞株 HT29, T84 で比較的 ALDH1 高発現細胞が多くみられたため(図1)、cell sorter を用いてこれら高発現細胞を分離し、特殊環境で培養を行ったところ、癌幹細胞性質を有する細胞株の樹立に施行した(図2)。

一方で、手術切除組織からの CSCs の分離も Cancer tissue-originated Spheroid (CTOS) の手法を用いて、10 検体程度試みたが、培養継続の困難さ、癌幹細胞マーカーの上昇がみられないことなどから現在もさらなる精度の高い方法を模索しているところである。

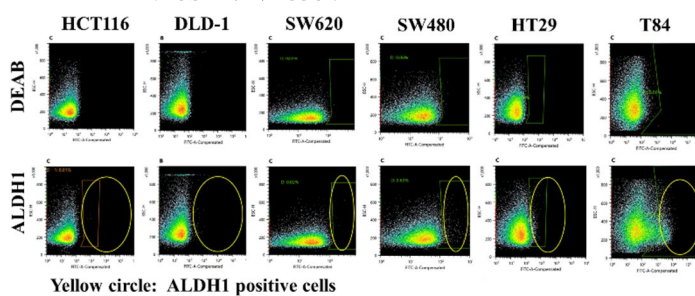


図1 大腸癌細胞株における ALDH1 発現

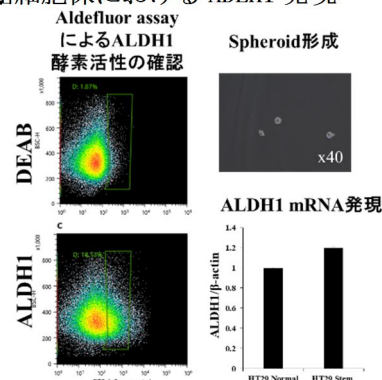


図2: 樹立癌幹細胞における癌幹細胞性質の確認

(2) 大腸癌幹細胞の網羅的遺伝子解析

項目1で樹立した HT29, T84 由来 total RNA を抽出し、マイクロアレイ法により解析した(図3)。結果として、カルシウムイオンに関連する分子としては Voltage gated calcium ion channels が多く癌幹細胞で高発現していることが判明、また MCUB (ミトコンドリアへの Ca イ

オン取り込みに関連)が2株両者で高発現していたが、我々の仮説で評価予定であった小胞体ストレスに関連するATP2A1などのイオン輸送体の発現変化は認められなかった。これらは、同時期に食道癌幹細胞で発現上昇が確認されており、食道癌幹細胞での研究に譲ることとし、異なる標的イオン輸送体を探索すべく解析データを評価したところ、細胞容積調整に関連する分子であるAQP1, CLCN-5, LRRCA8Aが高発現していた。これらは、RT-PCR法を用いた遺伝子発現のvalidationにおいても上昇が確認された。

Symbol	Entrez Gene Name	Expr Fold Change 癌幹細胞/通常細胞株
CLIC5	chloride intracellular channel 5	1.58
ATP1A4	ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting subunit alpha 4	1.72
ATP6V1D	ATPase H ⁺ transporting V1 subunit D	1.76
SLC8A3 (NCX3, Na-Ca)	solute carrier family 8 member A3	1.8
ANO10	anoctamin 10	1.87
CDH3	cadherin 3	1.87
CACNA1A	calcium voltage-gated channel subunit alpha1 A	1.88
CACNA1I	calcium voltage-gated channel subunit alpha1 I	1.94
TRPV3	transient receptor potential cation channel subfamily V member 3	1.96
AQP7	aquaporin 7	1.99
CLDN2	claudin 2	1.99
AQP4	aquaporin 4	2.1
KCNK1	potassium two pore domain channel subfamily K member 1	2.13
SLC12A6	solute carrier family 12 member 6	2.2
VDAG3	voltage dependent anion channel 3	2.2
CLCN5	chloride voltage-gated channel 5	2.43
LRRCA8A	leucine rich repeat containing 8 VRAC subunit A	2.69
CACNA2D4	calcium voltage-gated channel auxiliary subunit alpha2delta 4	3.23
MCUB	mitochondrial calcium uniporter dominant negative beta subunit	4.88
S100A9	S100 calcium binding protein A9	9.68
AQP1	aquaporin 1 (Colton blood group)	14.59
SLC9A2(NHE2)	solute carrier family 9 member A2	18.19
S100A4	S100 calcium binding protein A4	18.77
CLIC3	chloride intracellular channel 3	20.36
SLC4A11(BTR1)	solute carrier family 4 member 11	28.64

図3: 大腸癌幹細胞における網羅的遺伝子解析

これらを介したイオンダイナミクスの調整による細胞容積の変化は、低浸透圧刺激への耐性、細胞の遊走浸潤、アポトーシスに関連することが知られている。そこで本研究では、大腸癌幹細胞がAQP1, CLCN-5, LRRCA8Aの発現上昇を介して通常癌細胞と異なる細胞容積調整制御機構を獲得し、これらにより低浸透圧耐性や、遊走浸潤能、アポトーシス回避能を獲得している可能性があると推測し、その新たな仮説を証明すべく検証を進めることとした。

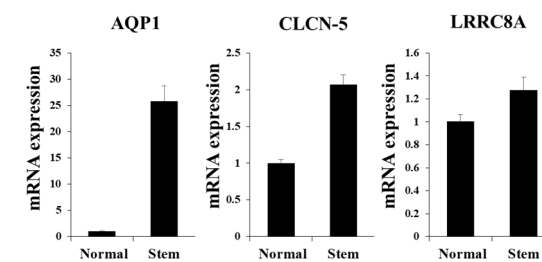


図4: RT-PCR法による標的遺伝子の発現確認

(3) 標的遺伝子の発現の意義の検討(細胞生理学的アプローチ)

AQP1は水を純粋に受動的に透過するチャネルであり、一方でCLCN-5, LRRCA8Aは低浸透圧刺激に対するvolume調整機構であるregulatory volume decrease (rvd)に関与するクロライドチャネルである。したがって、癌幹細胞でこれらが高発現しているという事実は、低浸透圧刺激の細胞容積の変化が通常癌細胞株と比較して、異なる特徴を有すると考察される。そこで、細胞容積を測定可能なflow cytometerであるMultisizerを用いて、低浸透圧刺激時の細胞容積を測定した。結果、通常癌細胞ではrvdが観察されたが一方で癌幹細胞ではrvdはみられず、一方で低浸透圧による細胞容積増大が抑制されていた。これはAQP1の機能の増強により、水移動が活発化していることが細胞容積増大の抑制に関与していると考えられた。

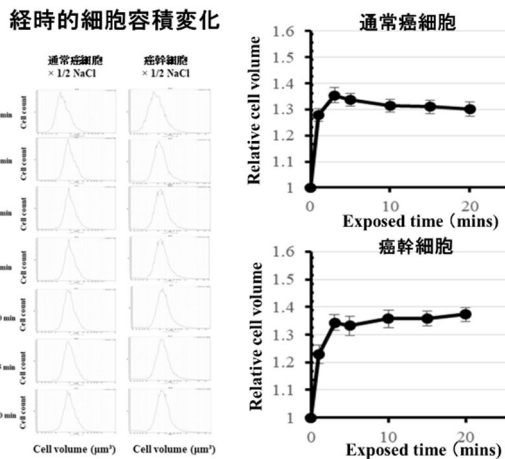


図5: 癌幹細胞における低浸透圧刺激の容積変化

(4) 標的遺伝子の発現の意義の検討(細胞増殖能)

次に、細胞容積の増大による細胞破裂や低浸透圧刺激によるアポトーシス誘導に対して、癌幹細胞がどのような特徴を有するか調べるため、様々な浸透圧の低張液でhypotonic shockを与え、培養を行いMTT assayで48時間後の細胞のviabilityを確認したところ、癌幹細胞では低浸透圧刺激に対して耐性を有することが判明した。これらは癌に対する様々な低浸透圧を利用した治療に抵抗性を有しかつ過酷な状況に耐性を有する癌幹細胞の特徴を示していると考えられる。

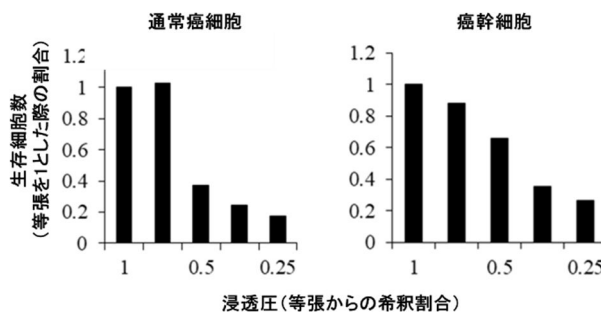


図6: 癌幹細胞における低浸透圧刺激時の細胞増殖能への影響

(5) 今後の研究課題について

今後は以下について、さらに研究を継続予定である。

- ・ siRNA knockdown を用いた増殖アッセイ、細胞容積の評価
- ・ 長時間低浸透圧刺激を加えた際の、癌幹細胞における生存性の評価
- ・ MQAE(クロライドイオンプローブ)を用いた細胞内クロライドイオン濃度の測定
- ・ CTOS 樹立方法の洗練化
- ・ 新たな研究課題として、MCUB の発現が癌幹細胞で亢進していることを受けミトコンドリア内へのカルシウムイオン取り込みに関して様々仮説が立案可能である。これに関して、新たなテーマとして研究開始を検討している。

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	大辻 英吾 (Otsuji Eigo)	京都府立医科大学 外科学教室 消化器外科学部門 (24303)	
研究協力者	塩崎 敦 (Shiozaki Atsushi)	京都府立医科大学 外科学教室 消化器外科学部門 (24303)	
研究協力者	小菅 敏行 (Kosuga Toshiyuki)	京都府立医科大学 外科学教室 消化器外科学部門 (24303)	
研究協力者	清水 浩紀 (Shimizu Hiroki)	京都府立医科大学 外科学教室 消化器外科学部門 (24303)	
研究協力者	加藤 俊二 (Kato Shunji)	京都府立医科大学 外科学教室 消化器外科学部門 (24303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------