

平成22年 5 月 31日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)

研究期間：2008～2009

課題番号：20890049

研究課題名(和文) 癌幹細胞制御における TGF- β の機能解析

研究課題名(英文) TGF-beta decreases the cancer-initiating cell population within diffuse-type gastric carcinoma cells

研究代表者

江幡 正悟 (EHATA SHOGO)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90506726

研究成果の概要(和文)：ABC トランスポーターのひとつである ABCG2 を強く発現する細胞群は、色素 Hoechst33342 を排出することから、フローサイトメトリー上で Side Population (SP) 細胞として区別することができる。興味深いことにこの SP 細胞には、正常臓器における幹細胞ないし多くの癌における癌幹細胞が多く含有されていることがわかっている。本研究では、腫瘍間質で産生されるサイトカインである TGF- β が、スキルス胃癌の ABCG2 発現や、スキルス胃癌細胞中に存在する SP 細胞に対してどのような作用をもたらすか、という点に着目し解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Stem cells in normal tissues and cancer-initiating cells (CICs) are known to be enriched in Side Population (SP) cells. However, the factors responsible for the regulation of expression of ABCG2, involved in efflux of dyes, in SP cells have not been fully investigated. Here, we characterized the SP cells within diffuse-type gastric carcinoma, and examined the effects of TGF-beta on SP cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,120,000	336,000	1,456,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,320,000	696,000	3,016,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：実験病理学

キーワード：遺伝子、癌、シグナル伝達、病理学、薬剤反応性

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年の研究から腫瘍を形成する細胞集団は不均一であり、少ないながらも、しかし高率に、腫瘍を形成する未分化な細胞集団が存在することが分かってきた。この集団は癌幹細胞と呼ばれ、抗癌剤や放射線療法などの治療後の再発に深く関与していると推察されている。この癌幹細胞モデルは急性骨髄性白血病で始めて提唱されたものであるが、現在では急性骨髄性白血病のみならず、乳癌、脳腫瘍、肺癌など多くの固形腫瘍においてもこのモデルが適応されている。実際に悪性腫瘍の臨床検体から、腫瘍形成能の高い細胞集団が同定されている。

(2) 癌幹細胞の同定が進むにつれ、癌幹細胞が維持される環境の解明にも興味もたれている。すでに精力的に研究されている造血幹細胞や間葉系幹細胞などの正常幹細胞は、ある限られた環境と接着分子を介して物理的に定着した状態にあり、そのような特殊な環境を提供する細胞集団はニッチとよばれ、幹細胞の数や分裂・分化・生死をコントロールしている。とくに TGF- β ファミリーに属する骨形成因子 (bone morphogenetic protein ; BMP) などのサイトカインが重要であることもわかってきた。

(3) 申請者の所属研究室ではこれまでに、分子標的治療の開発を目指し、癌細胞に伝達している TGF- β シグナルに着目した研究を行

ってきた。これまでの実験 からヒトスキルス胃癌細胞株 OCUM-2MLN に TGF- β II 型受容体優性変異体 (dnT β RII) を発現させ TGF- β シグナルを遮断したところ、dnT β RII 発現株では、*in vitro* での増殖に変化はないが、*in vivo* では腫瘍の増殖が顕著に亢進していた。この事実は腫瘍間質からの TGF- β シグナルが癌細胞の腫瘍形成能を負に制御していると解釈できる。

(4) さらに癌細胞の遺伝子発現を解析したところ、dnT β RII 発現株では ABC トランスポーター遺伝子、*ABCG2* (ATP-binding cassette 2) の発現が亢進していることが判明した。*ABCG2* は、BCRP (Breast cancer resistance protein) ともよばれ、当初は化学療法薬剤の汲み出しに寄与するトランスポーターであるとされたが、後に幹細胞が濃縮されている Side-population (SP) 細胞の薬剤排出能にも関わっていることが判明し、現

在では癌幹細胞のマーカーのひとつとして位置づけられている。

2. 研究の目的

ABCG2 発現の調節が TGF- β によって制御されている点に着目し、腫瘍形成能において不均一である癌細胞集団に対して、TGF- β が癌細胞中の未分化な癌幹細胞を分化させ、腫瘍形成能を抑制した、と考えた (図 1)。以下の 3 点を立証することを目的とした。

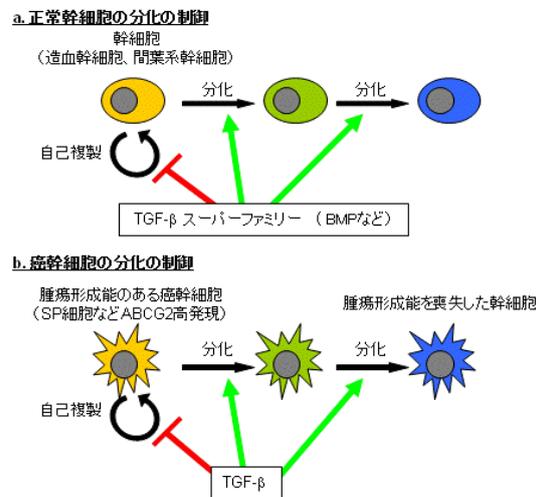


図 1. 幹細胞の分化の制御

(1) スキルス胃癌細胞中に存在する SP 細胞群は自己複製能を有し、造腫瘍活性が高く、癌幹細胞が濃縮された画分であること

(2) TGF- β はスキルス胃癌細胞株中の SP 細胞を喪失させ、腫瘍形成能を喪失させること

(3) スキルス胃癌細胞に TGF- β が作用すると、*ABCG2* 遺伝子の転写が負に制御されること

3. 研究の方法

(1) 複数種のヒトスキルス胃癌由来の細胞株 (OCUM-2MLN 細胞、OCUM-8 細胞、OCUM-9 細胞、HSC-43 細胞) を入手し、それぞれの細胞中の SP 細胞の存在をフローサイトメトリーで確認し、また Real-time PCR を用いて *ABCG2* 遺伝子発現を調べた。さらに OCUM-2MLN 細胞より SP 細胞を単離し、ヌードマウスへの移植実験による造腫瘍活性や自己複製能から幹細胞活性を比較した。

(2) TGF- β 刺激をおこなった OCUM-2MLN 細胞での、*ABCG2* 遺伝子発現の変動を、Microarray を用いて網羅的に解析した。また TGF- β により *ABCG2* 発現が低下し、SP 細胞の割合が減少することをフローサイトメトリーや Real-time PCR により確認した。同時に TGF- β の前処理により、腫瘍形成能が低下することを確認した。

(3) TGF- β の下流で Smad 依存的にシグナルが活性化し、*ABCG2* 遺伝子の転写が抑制されることを、クロマチン免疫沈降法を用いて、生化学的に検討した。

4. 研究成果

(1) 移植実験の結果から、dnT β RII 発現胃癌細胞株ではコントロールと比較して腫瘍形成能に長けた細胞を多く含んでいることが判明した (図 2)。そこで dnT β RII 発現胃癌株の移植から形成された腫瘍組織の遺伝子発現をプロファイリングしたところ、*ABCG2* 遺伝子の発現が亢進していることが分かり、本研究では *ABCG2* 発現の意義や SP 細胞画分の機能に焦点を当てることとした。

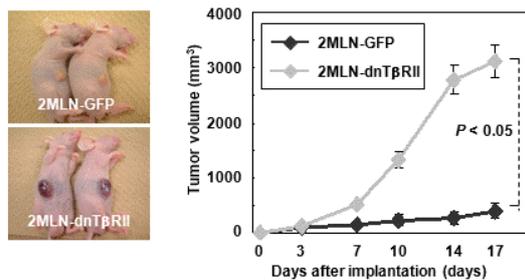


図2. dnT β RIIによる腫瘍形成の亢進

(2) 次に *ABCG2* の発現調節機構を生化学的に検討したところ、TGF- β シグナルの下流で、Smad2/3が *ABCG2* 遺伝子のプロモーター領域やエンハンサー領域に直接結合し、*ABCG2* 遺伝子の転写を負に制御していることが分かった。この発現制御機構はスキルス胃癌のみならず、肺腺癌、肝細胞癌、子宮頸癌、乳癌、と多くの癌細胞に共通した制御機構であると考えられる (図 3)。

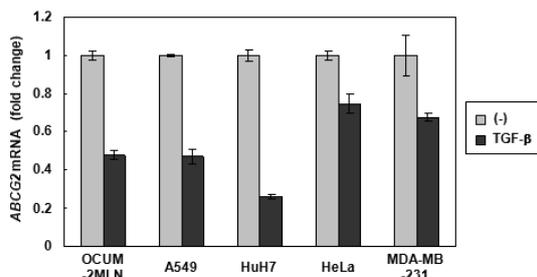


図3. TGF- β による*ABCG2*発現制御

(3) 次に OCUM-2MLN 細胞から約 2%の割合で存在する SP 細胞を単離し、癌幹細胞の活性を評価した。その結果、非 SP 細胞と比べ、SP 細胞は多分化能を有し、腫瘍形成能が高いことから、癌幹細胞を濃縮した細胞群であると考えられた (図 4)。

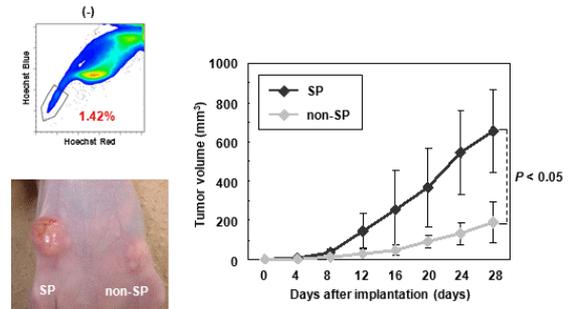


図4. SP細胞の腫瘍形成能

(4) さらに TGF- β ファミリーの刺激が腫瘍形成能に与える影響を調べたところ、TGF- β 刺激により SP 細胞はほぼ完全に消失し、腫瘍形成能が大きく喪失することが分かった (図 5)。なお、この性質は同じ TGF- β ファミリーに属する BMP では見られない現象であるが、それは BMP が *ABCG2* 発現に影響を与えないことに合致する結果であった。

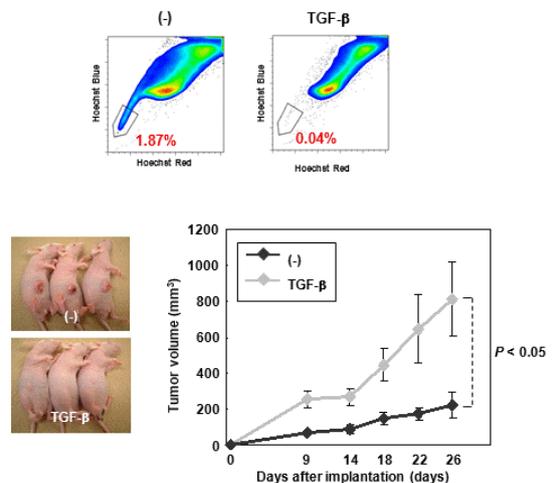


図5. TGF- β によるSP細胞の消失と造腫瘍活性の喪失

(5) 最後に SP 細胞の存在とスキルス胃癌のリンパ節転移の関連性について検討した。OCUM-2MLN 細胞は、元株である OCUM-2M 細胞を同所移植しリンパ節に生じた転移組織から得られた高転移亜株である。OCUM-2MLN 細胞中には常に一定の SP 細胞が存在していることが認められている

一方で、OCUMN-2M 細胞からは SP 細胞はまったく検出されず、ABCG2 の発現も認められなかった。このことから、癌細胞の転移の成立には SP 細胞のような異所性増殖能に長けた細胞が関与している可能性があると考えられた。

なお、以上の研究成果は、現在、学術誌に論文投稿を行っている最中である。また、第 59 回藤原セミナー（2010 年 7 月、北海道、苫小牧）、第 69 回日本癌学会総会（2010 年 10 月、大阪府）で発表予定である。

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）

〔学会発表〕（計 1 件）

- ① Shogo Ehata, Ryohei Katayama, Sumie Koike, Yukari Hoshino, Yoko Katsuno, Mitsunobu Kano, Masakazu Yashiro, Kosei Hirakawa, Hiroyuki Aburatani, Naoya Fujita, Kohei Miyazono.
TGF- β diminishes the SP fraction of the diffuse-type gastric cancer cells.
2009 年 10 月 2 日
神奈川県横浜市パシフィコ横浜
第 68 回日本癌学会総会

〔その他〕

ホームページ等

<http://beta-lab.umin.ac.jp/>

（東京大学・大学院医学系研究科・病因病理学専攻・分子病理学分野ホームページ）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江幡 正悟 (EHATA SHOGO)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90506726

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし