

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17659

研究課題名(和文) 癌幹細胞に対するカルシウム輸送体制御による低浸透圧細胞破壊治療法の開発

研究課題名(英文) The development of cancer-stem cells-targeted hypotonic therapies under the regulation of calcium ion transporter

研究代表者

竹本 健一 (Takemoto, Kenichi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40826038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌細胞株より癌幹細胞を分離し、遺伝子発現の特徴について網羅的遺伝子解析法で解析を行った。結果として、電位依存性に開閉、カルシウムイオンが透過するVGCCが高発現していた。低浸透圧刺激による細胞の容積変化にもVGCCは関与するため、低浸透圧刺激を加えて容積や生存性の評価を行うと、細胞の容積増大が抑制されており、結果として低浸透圧刺激を与えた際の生存性が高いことがわかった。さらに、低浸透圧に加えイオン輸送体の阻害剤を併用すると、カリウム、水チャネル阻害剤が強く低浸透圧による容積増大を抑制することがわかった。癌幹細胞のVGCCや、低浸透圧刺激療法は有効な可能性があり、さらなる研究が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌幹細胞に対する標的治療は再発予防や、治療抵抗性などの回避を目指し研究が盛んに行われており、今回我々が発見したVGCCや、低浸透圧刺激に対する耐性は、標的治療の開発を行う上での契機となる可能性がある。VGCCを標的とした薬剤の投与や、癌幹細胞のイオン輸送体阻害下で低浸透圧刺激を加える手法で癌細胞特異的治療が可能となれば、新たな制癌治療の開発につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells (CSCs) were isolated from colon cancer cell lines, and then the gene expression of CSCs were analyzed by the micro-array method. The results showed that Voltage-gated calcium channel (VGCC) overexpressed CSCs. Previous studies reported that VGCC are associated with cell volume regulation under hypotonicity; therefore, cell volume and cell viability of CSCs and normal cancer cells (NSCs) were evaluated. The regulatory volume decrease was observed in NSCs; however, the cells ruptured under severe hypotonicity. Cell volume increase under hypotonicity was suppressed in CSCs, moreover, CSCs survived under severe conditions. Potassium and water channel inhibitor suppressed cell volume change of CSCs under hypotonicity. The overall results suggested that CSCs had the resistance of hypotonicity, and the VGCC in CSCs can be therapeutic target.

研究分野：癌幹細胞

キーワード：大腸癌 癌幹細胞 イオン輸送体 カルシウムチャネル

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

当研究室では、低浸透圧刺激を与えた際の癌細胞の形態・容積変化を解析し、低浸透圧刺激によって生じる調整性細胞容積減少(Regulatory Volume Decrease: RVD)を制御することで、低浸透圧下での細胞破壊効果を増強させる手段を明らかにしてきた。RVDには様々なイオンダイナミクスによって生じる浸透圧を介した水移動が関与することがこれまで報告されており、特にクロライド、カリウム、カルシウムイオン、その移動に関わるイオン輸送体が強く関わっていることが判明している。我々の研究でもRVDの制御のためにこのイオン輸送体の阻害剤を用いてきたが、細胞毒性が強く生体で用いることが困難という問題点があった。

そこで、我々はカルシウムイオン輸送体である L-type Voltage-gated calcium channel (VGCC)に着目した。L-type VGCCは正常組織では神経細胞や心筋細胞等に発現し、細胞内へのカルシウムイオン輸送を担う。一方、種々のイオン輸送が関連するRVD制御でもL-type VGCCが重要な役割を持つことが知られ、本研究に先立ち我々は胃癌細胞において生体使用可能なL-type VGCCの阻害剤を用いてRVDを抑制することで、低浸透圧性の細胞破壊効果が増強することを確認した。これらの阻害剤は、生体使用の可能性があり臨床応用が可能となる可能性がある。

一方で、我々は癌幹細胞と言われる癌細胞の中で極一部含まれる細胞集団の性質、イオン輸送体発現についても研究を進めている。癌幹細胞は、薬剤の治療抵抗性を示し、また高い自己複製能、臨床的には遠隔期の再発に関与している可能性が報告され、これらに対する標的治療の開発が世界的にも注目を浴び、盛んに研究されている。これまでに報告してきた、RVD制御下での低浸透圧刺激による殺細胞効果の検証は癌幹細胞に対しての報告がなく、新規治療となる可能性がある。

そこで本研究では、大腸癌幹細胞においてVGCCが高発現しており、これら阻害剤によって癌幹細胞においてもRVD制御が可能である。これらに低浸透圧刺激を加えることで効率的な癌幹細胞標的治療が可能であるという仮説を立て検証を進めることにした。

2. 研究の目的

以下を目的として研究を進める

- ・大腸癌幹細胞におけるL-type VGCCを含むカルシウムイオン輸送体の発現強度と機能の確認
- ・大腸癌幹細胞における低浸透圧刺激時の容積変化の観察と、その制御法の確立

3. 研究の方法

(1) ヒト大腸癌細胞株からの癌幹細胞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、癌幹細胞マーカー陽性細胞を cell sorter を用いて分離、非血清培養液、非接着プレートで培養し樹立を試みる

(2) 大腸癌幹細胞のイオン輸送体の評価

癌幹細胞におけるイオン輸送体発現を、起源の大腸癌細胞株と、樹立した癌幹細胞の遺伝子発現を網羅的遺伝子解析で比較し、高発現する標的遺伝子を抽出する

(3) 癌幹細胞、通常癌細胞に対する低浸透圧刺激時の容積変化の比較

樹立癌幹細胞、起源の通常癌細胞に対して低浸透圧刺激を加えた際の細胞容積変化を比較する。容積の変化は電気抵抗より細胞容積を測定するフローサイトメトリを用いる。

(4) 低浸透圧刺激を与えた際の癌幹細胞に対する殺細胞効果の検討

低浸透圧刺激を一定時間与えた際の細胞(癌幹細胞、通常癌細胞)に対する殺細胞効果を、低浸透圧刺激後に一定時間培養し増殖した細胞を MTT assay で評価することで定量的に測定する

(5) 各種イオン輸送体阻害剤を用いて、低浸透圧刺激を与えた際の細胞容積変化の評価

イオン輸送体の阻害剤を用いて、低浸透圧刺激を与えた際の癌幹細胞の容積変化を、(3)同様の方法で測定する

4. 研究成果

(1) ヒト大腸癌細胞株からの癌幹細胞(CSCs)の分離と細胞株樹立

癌幹細胞マーカーで報告のある CD44, CD133 を用いた、大腸癌細胞株からの癌幹細胞の抽出を試みたが結果の安定性に欠けたため、さらに報告のある ALDH1a1 の酵素活性の評価が可能である Aldefluor 試薬を用いて、大腸癌細胞株内の ALDH1a1 酵素活性の高い細胞を cell sorter で分離、血清非含有、非接着プレートで培養を行い細胞株 Ht-29, T-84 からの癌幹細胞(Ht29 stem, T84 stem)を抽出することに成功した(図1)。

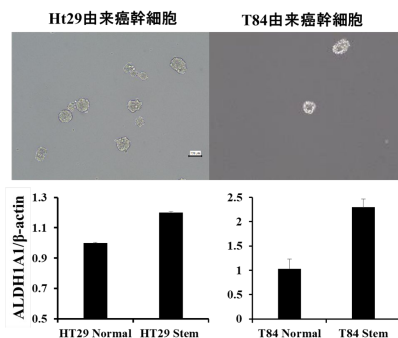


図1大腸癌細胞株由来、癌幹細胞の樹立

癌幹細胞マーカーで報告のある CD44, CD133 を用いた、大腸癌細胞株からの癌幹細胞の抽出を試みたが結果の安定性に欠けたため、さらに報告のある ALDH1a1 の酵素活性の評価が可能である Aldefluor 試薬を用いて、大腸癌細胞株内の ALDH1a1 酵素活性の高い細胞を cell sorter で分離、血清非含有、非接着プレートで培養を行い細胞株 Ht-29, T-84 からの癌幹細胞(Ht29 stem, T84 stem)を抽出することに成功した(図1)。

Symbol	正式名称	HT29-stem / HT-29
CACNG4	calcium voltage-gated channel auxiliary subunit gamma 4	3.28
CACNA2D4	calcium voltage-gated channel auxiliary subunit alpha2delta 4	3.23
CACNA1I	calcium voltage-gated channel subunit alpha1 I	1.94
CACNA1A	calcium voltage-gated channel subunit alpha1 A	1.88
CACNB3	calcium voltage-gated channel auxiliary subunit beta 3	1.61

Symbol	正式名称	T84-stem / T84
CACNA2D3	calcium voltage-gated channel auxiliary subunit alpha2delta 3	2.46
CACNA1D	calcium voltage-gated channel subunit alpha1 D	1.8
CACNA1H	calcium voltage-gated channel subunit alpha1 H	1.67
CACNA2D1	calcium voltage-gated channel auxiliary subunit alpha2delta 1	1.62

図2大腸癌幹細胞において高発現するVGCC

(2) 大腸癌幹細胞のイオン輸送体の評価

抽出した癌幹細胞を、起源となった細胞株とともに網羅的遺伝子解析(microarray)を行い解析し、癌幹細胞に発現するイオン輸送体の評価を行った。結果として、HT29, T84 ともに共通して高発現する

VGCC は認めなかったものの、HT29 由来癌幹細胞で 5 種の VGCC が 1.61-3.28 倍、通常の細胞より高発現しており、T84 由来癌幹細胞で 4 種の VGCC が 1.62-2.46 倍、通常の癌細胞株より高発現していた。

(3) 癌幹細胞、通常癌細胞に対する低浸透圧刺激時の容積変化の比較

Micro array の結果、癌幹細胞では RVD に関連する VGCC が高発現していることから通常の癌細胞と比較して低浸透圧刺激を加えた際の容積の変化に差異があることが予想された。そこで、電気抵抗から細胞の容積の測定が可能であるフローサイトメトリを用いて、各々に一定時間の低浸透圧刺激を与えた際の細胞容積の変化を評価した。結果として、通常の癌細胞では、1/2 の低浸透圧刺激を与えた際は、容積増大した後、容積が減少する RVD が観察されたが、癌幹細胞では RVD は観察されず、一方で容積の増大程度が低く抑制されているといった結果であった(図3)。1/16 の低浸透圧で刺激する検証も行ったが、一定時間経過すると通常細胞は破片となり、微小なサイズの断片しか残存しないにも関わらず、癌幹細胞では一定時間経過後も一定のサイズを保持しており、低浸透圧刺激に対して耐性を有している可能性が示唆された。

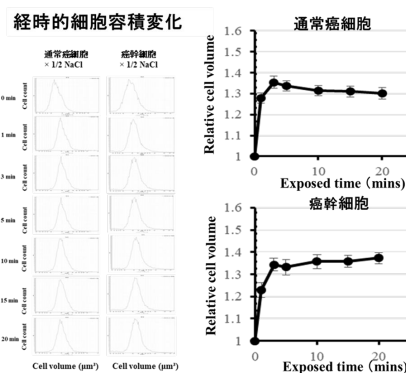


図3 大腸癌幹細胞、低浸透圧刺激後の容積変化

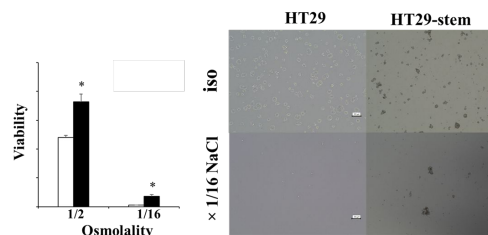


図4 大腸癌幹細胞、低浸透圧刺激後のviability

(4) 低浸透圧刺激を与えた際の癌幹細胞に対すること殺細胞効果の検討

(3)の結果より、癌幹細胞が低浸透圧刺激に対する破裂に抵抗性を有する可能性があり、これをさらに検証するため低浸透圧刺激を一定時間与えた後、培養し増殖した細胞を測定することで、低浸透圧刺激後の viability を評価する実験を行った。結果として図4の如く、倒立顕微鏡で観察した像でも 1/16 の刺激を与えた場合でも、癌幹細胞は細胞が生存しており、MTT assay の測定上でも、通常の細胞株と比較しても、癌幹細胞で高い低浸透圧刺激後の viability を有することがわかった。

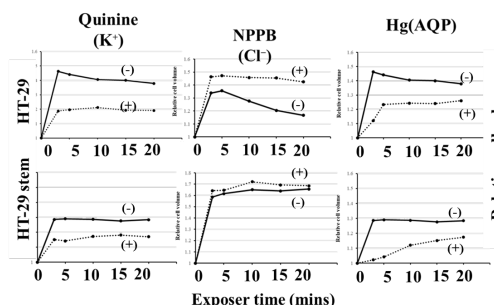


図5 イオン輸送体阻害時の低浸透圧刺激に対する容積変化

(5) 各種イオン輸送体阻害剤を用いて、低浸透圧刺激を与えた際の細胞容積変化の評価

一般的に RVD に関与するとされるイオン輸送体、カリウムチャンネル、クロライドチャンネル、水チャンネルに対する阻害剤、Quinine, NPPB, Hg(水銀)を用いた際の細胞の容積変化を、同様のフローサイトメトリを使用し検証した。結果として、正常細胞では、すべての阻害剤で RVD もしくは容積増大が抑制されたが、一方で癌幹細胞では Quinine, Hg で水の流入が強く抑制され、低浸透圧時の容積の変動にカリウム、水チャンネルが強く関与していることが予想された。カリウムチャンネルは、カルシウム依存性に開閉するチャンネルも存在するためカルシウムチャンネルの関与も示唆される結果であった。

(6) 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。

- ・カルシウム阻害剤併用時の低浸透圧刺激の癌幹細胞に対する効果
- ・ヌードマウス播種モデルに対する同治療効果の検証

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------