

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501324

研究課題名(和文)大腸がん化学予防における核内受容体とその標的因子の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Nuclear receptors as molecular regulator and chemopreventive targets of colon cancer stem cells.

研究代表者

増田 園子 (MASUDA, Sonoko)

北海道医療大学・薬学部・教授

研究者番号：90157206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：大腸がん幹細胞は腫瘍の源であり、治療・予防の標的である。本研究は大腸がん幹細胞の機能を調節する核内受容体に着目し、大腸がん幹細胞に特異的に発現するマーカー分子の創出と、植物性食品に含まれる「がん予防成分」をスクリーニングし、複合効果による大腸がん化学予防法を探索した。CD44、EpCAM、プロテアソームを分子マーカーとするハイスループットスクリーニング分析は、大腸がん幹細胞検出に有用であった。フコキサンチンと活性型ビタミンD3の複合効果は、大腸がん幹細胞の増殖を調節し、大腸がん化学予防には特に有望で、核内受容体PPAR、VDRに着目した食品の組合せは、重要ながん化学予防法となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Increasing evidence suggests that colon cancer stem cells (CCSC) have responsible for carcinogenesis, cancer development and recurrence. To establish signaling pathways in CCSC, which are implicated in the initiation and progression of colon cancer, we examined nuclear receptor signaling in colonospheres that are enriched in CCSC from established cell lines. We found that colonospheres formed by colon cancer cell lines are highly enriched in CCSC and that Wnt/b-catenin pathway plays a critical role in growth and maintenance of colonospheres. We also found that the combination of Fucoxanthinol and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 acts on the CCSC cell growth through down-regulation of PPAR γ and NF κ B p52, and as an intrinsic factor for the prevention of colon cancer. These findings establish a critical role for PPAR γ and vitamin D receptor (VDR) in growth regulation in colon cancer cells via functionally relevant cross-talk between these nuclear signaling pathways.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・がん疫学・予防

キーワード：大腸がん幹細胞 核内受容体 がん化学予防 分子標的治療 ビタミンD カロテノイド 分子イメージング がん遺伝子

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会の加速化に伴い、がんをはじめとする疾患の一次予防と健やかな加齢が社会的に強く求められている。がんは、1981年以降、我が国において死亡原因の第1位を占め、治療薬がめざましい進歩を遂げているにも関わらず、未だ、がん死亡率の増加を抑制するまでには至っていない。我が国では食事の欧米化に伴い、大腸がんの罹患率、死亡率はともに増加していることから、食品素材をはじめとする数多くの化合物を化学予防の候補分子として試験し、積極的に大腸がんを予防する「化学予防法」の開発が急務である。大腸がんの予防研究では、大腸発がんの最も初期病変と考えられる aberrant crypt foci (ACF) を標的とするアプローチに加え、大腸がん幹細胞を標的とすることも最近では可能となりつつある。申請者らは、粘膜の炎症や肥満を背景とする大腸発がんの動物モデルを作出し、生薬成分や食品成分などの機能性脂質が予防に効果があることを見出してきた。さらに、がん化した細胞ではシトクロム P450 代謝酵素の高発現が認められること、選択的阻害剤はがん増殖を抑制することも示している。ACF、大腸ポリープやがんに発現する標的因子には、核内受容体とその下流に存在する共役因子をはじめとする蛋白質があり、代謝酵素遺伝子の発現調節にも関わる。これらの因子は、がん化の過程で、発現が変動することから、核内受容体を標的とするアゴニスト及びアンタゴニストの探索は、がん化学予防において注目されている。

2. 研究の目的

我が国で増加の一途をたどる大腸がんに対して、有効な化学予防法を確立するために、核内受容体とその標的因子の分子メカニズムを解明することを目的とする。大腸がん前がん病変の ACF 及び大腸がん幹細胞に発現する核内受容体と新しい共役因子を標的として機能を調節することは、大腸発がんを抑制しうる可能性がある。大腸がん増殖抑制に効果のある新規活性成分を探索し、新規核内受容体とその転写調節機能を解明するための基礎的研究を行う。本研究では、大腸がん化学予防因子として有効かつ有望な戦略を創出することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 核内受容体と共役因子並びに標的因子による細胞機能調節の解析

高速処理スクリーニング法を用いて、種々のがん細胞株、がん幹細胞塊より核内受容体と相互作用してその活性を正または負に調節する因子を見出す。活性型ビタミンD、カロテノイドの標的遺伝子として、マイクロアレイ法による遺伝子網羅解析から、大腸がん微小環境のエネルギー代謝における役割を明らかにする。これらの細胞増殖、免疫制御、エネルギー代謝はそれぞれの経路が発がん

制御と結びつくものであり、遺伝子ノックダウン手法を用いて発がんの病態における役割を探索する。

(2) 核内受容体を標的とする機能性脂質による大腸がん化学予防法の開発

ビタミンD、カロテノイドの新しい標的遺伝子を見出す。網羅的な核内受容体の標的因子の同定と発がんにおける機能解析を進める。さらに、VDR、RAR、RXR、PPARsをはじめとする核内受容体に関しては、大腸がん細胞及び大腸がん病態モデルの系で、マイクロアレイ法により、標的遺伝子の同定を進める。

(3) 大腸がん化学予防を評価できるバイオマーカーの探索、発掘

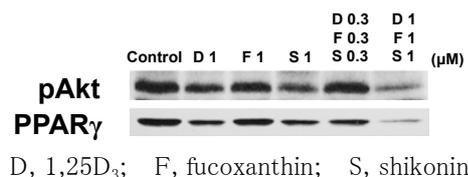
大腸がん化学予防を目的とするバイオマーカーを探索するために、大腸がん幹細胞塊、大腸がん発症モデル *Apc^{Min/+}* マウスの病変組織を解析し、大腸がん発症に関わる核内受容体をはじめとするバイオマーカーを探索する。変動するマーカー分子をフローサイトメトリー (FACS)、タンパク発現、分子イメージングで解析し、大腸がん化学予防に有効なマーカーであることを確認する。

4. 研究成果

異なる複数のアッセイ系を利用し、以下の研究成果を得た。

大腸がん増殖抑制に効果のある新規活性成分を探索

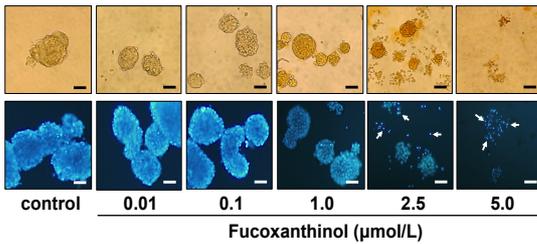
日常摂取する食品成分より、活性型ビタミンD₃ (1,25D₃)、カロテノイド2種、アブラナ科植物2種、薬用植物6種の機能性脂質の単独・混合添加により、ヒト大腸がん細胞 (HT-29、HCT116、DLD-1) に対し、強い増殖抑制作用と PPAR γ タンパク質発現を顕著に抑制することを見出した。これらの高極性脂質は構造が全く異なるが、大腸がん細胞に対して共通する分子作用機序を有し、Akt/PI3K 経路及び Wnt/ β -カテニン経路を抑制し、大腸がん細胞の維持・増殖に極めて重要な核内受容体 PPAR γ のタンパク発現を抑制した。本研究より、ヒト大腸がん細胞に対する薬草成分、食品成分の複合的増殖抑制作用では、増殖因子及び核内受容体が同時に抑制されていることが明らかとなった (図1)。



大腸がん幹細胞を標的とする大腸がん予防

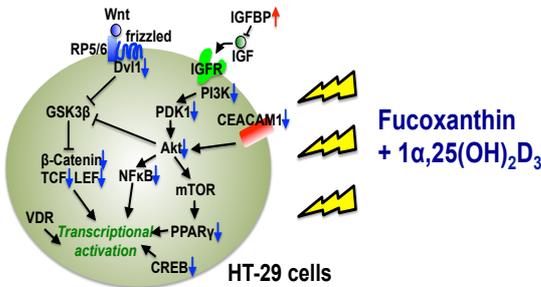
大腸がん幹細胞の継代培養が可能となるスフェロイド培養を応用した。細胞を三次元培養して得られる球形の細胞塊 (スフェロイド) は、生理的環境に近い腫瘍を再現できる。

HT-29、HCT116 細胞のスフェロイド形成に対し、活性型ビタミン D₃(1,25D₃)、高極性キサンチン (フコキサンチン、ネオキサンチン) は大腸がん幹細胞塊 Colonosphere (Csp) を明瞭にアポトーシス誘導し、極めて有望な大腸がん幹細胞の根絶候補脂質であることを見出した。大腸がん幹細胞は化学療法に強い耐性を示すため、複数の分子機構を同時に制御することは大腸がん幹細胞根絶の近道といえる。PPAR γ 発現を抑制する機能性脂質の組合せにより、大腸がん幹細胞根絶への糸口を見出した意義は大きい。大腸発がんの過程で発現する核内受容体の機能を解明することにより、化学予防因子の創出が期待できる (図 2)。



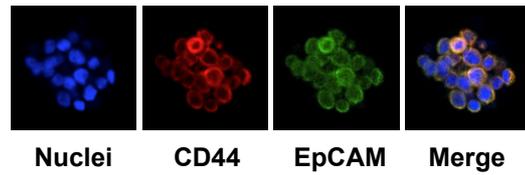
大腸がん化学予防における核内受容体及び標的因子の同定と発がんにおける機能解析

大腸がん幹細胞及び大腸がん病態モデルの系で標的遺伝子の同定を進め、ビタミンD、高極性キサンチンなどの低分子脂溶性シグナルを介する標的因子の応答経路並びに病態における役割の解明を進めた (図 3)。

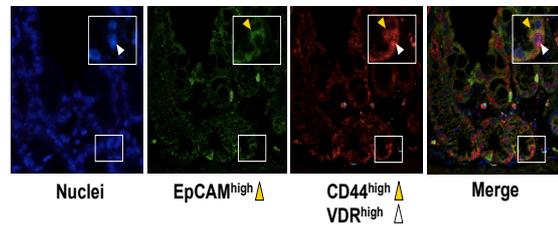


大腸がん化学予防を評価できるバイオマーカーの探索、発掘

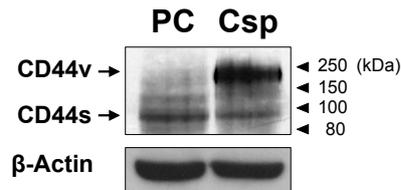
大腸がん幹細胞の表面に特異的に発現するマーカータンパク質に着目し、CD44^{high} 細胞、EpCAM^{high} 細胞をがん幹細胞としてフローサイトメーター (FACS) により単離した。免疫不全マウスへの移植による腫瘍形成能、スフェロイド形成能、薬剤耐性能を指標に、大腸がん幹細胞特性を評価した。ヒト大腸がん細胞 HT-29 より、CD44^{high}/EpCAM^{high} 細胞及び Colonosphere を単離し、幹細胞性の極めて高い細胞を得た。これらの細胞は、大腸がんの発生・再発・転移の機構を解明する上で、有用な細胞として期待できる (図 4)。



Apc^{Min/+}マウス及び CD44^{high}/EpCAM^{high} 大腸がん細胞に対する核内受容体 (VDR、RAR、RXR、PPAR γ 、PPAR α 、PPAR β/δ)、Akt/PI3K 及び Wnt/ β -Catenin 経路の遺伝子・タンパク質発現を網羅解析し、大腸がん幹細胞の標的分子、標的経路、バイオマーカーを探索した。その結果、*Apc*^{Min/+}マウス大腸粘膜において VDR は特に陰窩底部に発現し、VDR を発現した細胞では幹細胞マーカー CD44 及び EpCAM を共発現した (図 5)。



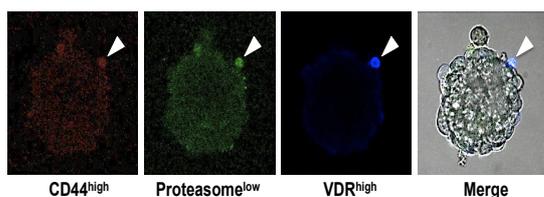
HT-29、HCT116 細胞から得られた Csp を FACS 解析した結果、CD44、EpCAM と VDR は正相関し、高発現した。HT-29 細胞由来 Csp で高発現した CD44 は、isoform の CD44v であり、CD44v の発現と大腸がん幹細胞の形質は相関することが示唆された。本研究の結果から、CD44v は大腸がん幹細胞の形質を解明する上で有用なマーカーとして期待される (図 6)。



がん幹細胞では細胞周期が静止期に入り、プロテアソーム活性が極めて低下している。大腸がん幹細胞の特徴、特性を明らかにするために、大腸がん幹細胞の分子挙動を追跡した。細胞周期 (G₀/G₁) 並びにプロテアソーム活性を指標とする選択的大腸がん幹細胞の検出を分子イメージングにより可視化し、病態や腫瘍内微小環境との関連について解析を進めた。

CD44^{high}/プロテアソーム^{low} を共発現する細胞はがん幹細胞性の特徴である Csp を形成し、自己複製能を有することが示された。HT-29-Fucci 細胞のプロテアソーム活性を追跡し、細胞周期を静止期に維持したプロテアソーム^{low} 細胞を検出し、極めてわずかに存在する大腸がん幹細胞の特徴を有することを確認した。さらに、

CD44^{high}/プロテアソーム^{low}細胞に、VDR^{high}を共発現する細胞が検出された(図7)。



VDRはWnt/ β -カテニン経路に対して β -カテニンの転写活性を抑制した。VDR、 β -カテニンをノックダウンした細胞ではCsp形成が25~60%まで低下した。Wnt/ β -カテニンシグナル伝達系はがん細胞の増殖や生存を促進するので、VDRによる β -カテニンの転写活性の抑制は増殖抑制につながる。Csp形成における遺伝子発現の網羅解析を進めている。

CD44はWnt/ β -カテニン経路の最下流にあるTCF/LEF複合体からのシグナルによる転写産物である。VDR^{high}細胞は、CD44を高発現したことより、Wnt/ β -カテニン経路の活性化が推察される。Cspより得られたCD44^{high}細胞ではプロテアソーム活性が抑制されたことから、細胞内の代謝や細胞周期は静止期に維持されている。今後、VDRが大腸がん幹細胞の発生・維持・増殖・分化を制御する機構の解明が望まれる。興味深いことに、CD44、プロテアソーム、VDRを高発現する細胞は、Cspの最外部に存在し、中心付近には検出されなかった。これらの結果は、がん幹細胞が自己複製を繰り返し腫瘍を形成する過程は、がん幹細胞が内部中心から秩序正しく三次元構造を形成させると同時に、外部環境を感知するセンサーの働きも担うことを示唆している。

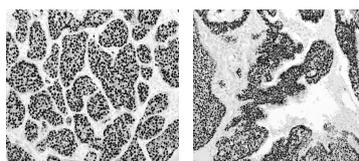
細胞単位でのビタミンD欠乏に伴う発がんの分子機構の解明

ビタミンDは核内受容体のリガンドであり、細胞の増殖や分化などの基本的生命現象を特異的に制御する内因性物質である。特に、ビタミンDは種々のがん細胞に対しアポトーシスを誘導し発がん過程を抑制する。申請者らは、核内受容体リガンドの生物学的効果は全身性の血中リガンド量より個々の細胞レベルでの絶対量に依存し、リガンド量の細胞内での減少が直接発がんに関与する可能性を明らかにしてきた。

(1) CYP24A1は種々のがん組織で高発現している

ビタミンD代謝酵素であるCYP24A1は細胞内でのビタミンD量を制御し、広範な細胞株や種々のヒトがん組織で異常発現が観察される。CYP24A1が広範ながん細胞で高発現していることを、RT-PCR法及びウエスタンブロット法、免疫染色法で確認した。ヒト腫瘍組織でも過剰発現が認められた(図8)。

ヒト乳がん ヒト肺がん



(2) CYP24A1の高発現は強い形質転換能力も持つ

CYP24A1はがん組織で非調節性に高発現し、CYP24A1の過剰発現に伴う腫瘍内微小環境でのビタミンD不足は、腫瘍細胞の悪性形質の獲得と密接に関連し、造腫瘍性を促進することから、CYP24A1を新規のがん遺伝子としての働きを解析中である。

本研究課題の総括

核内受容体PPAR γ 、VDRは β -カテニン経路を抑制し、大腸がん幹細胞の発生・維持・増殖を制御する。核内受容体の発現を調節する機能性脂質の組合せにより、大腸がん幹細胞根絶への糸口を見出した意義は大きい。本研究で確立したがん幹細胞の分子イメージングは、腫瘍形成におけるがん幹細胞の挙動及びがん幹細胞の分子機序を解明する上で有用な方法として期待できる。本研究の展開からCYP24A1のがんにおける機能を明らかにすることで、CYP24A1を標的とする創薬研究の基盤的情報となり得る。また、CYP24A1の検出系の確立は、病理組織診断における腫瘍の悪性度判定に有用である。

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)

[雑誌論文](計 8 件)

1. Shimizu S, Fujii G, Takahashi M, Nakanishi R, Komiya M, Shimura M, Noma N, Onuma W, Terasaki M, Yano T, Mutoh M. Sesamol suppresses cyclooxygenase-2 transcriptional activity in colon cancer cells and modifies intestinal polyp development in Apc^{Min/+} mice. *J Clin Biochem Nutr* 54: 95-101, 2014. DOI: 10.3164/jcfn.13-91. 査読有
2. Iguchi M, Osanai M, Hayashi Y, Koentgen F, Lee GH. The error-prone DNA polymerase ϵ provides quantitative resistance to lung tumorigenesis and mutagenesis in mice. *Oncogene advance online publication* 19 August 2013; DOI: 10.1038/onc.2013.33 1. 査読有
3. Tanaka T, Shimizu M, Kochi T, Moriwaki H. Chemical-induced Carcinogenesis. *J Exp Clin Med* 5: 203-209, 2013. DOI: 10.1016/j.jecm.2013.10.009. 査読有
4. Kochi T, Shimizu M, Ohno T, Baba A, Sumi T, Kubota M, Shirakami Y, Tsurumi H,

- Tanaka T, Moriwaki H. Enhanced development of azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in hypertensive rats. *Int J Mol Sci* 14: 14700-14711, 2013. DOI: 10.3390/ijms140714700. 査読有
- Kuno T, Hatano Y, Tomita H, Hara A, Hirose Y, Hirata A, Mori H, Terasaki M, Masuda S, Tanaka T. Organomagnesium suppresses inflammation-associated colon carcinogenesis in male Crj: CD-1 mice. *Carcinogenesis* 34: 361-369, 2013. DOI: 10.1093/carcin/bgs348. 査読有
 - Terasaki M, Nagao A, Maeda H, Miyashita K, Masuda S. Combined antiproliferative effect of dietary PPAR γ suppressing lipids fucoxanthinol and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D $_3$ in human colon cancer cells. *Carotenoid Sci* 17: 40-43, 2012. <http://www.carotenoid.jp>. 査読有
 - Tanaka T. Animal models of carcinogenesis in inflamed colorectum: potential use in chemoprevention study. *Curr Drug Targets* 13: 1689-1697, 2012. DOI: 10.2174/1389450111208041689. 査読有
 - Tanaka T. Development of an inflammation-associated colorectal cancer model and its application for research on carcinogenesis and chemoprevention. *Int J Inflamm* 2012: Article ID 658786, 16 pages, 2012. DOI: 10.1155/2012/658786. 査読有

[学会発表] (計 25 件)

- 寺崎 将、増田園子：CD44 発現と大腸がん幹細胞形質の相関性。日本薬学会第 134 年会、熊本、2014 年 3 月 28~30 日。
- Masuda S, Inoue S, Ohmura Y, Ono M, Takagi K, Nakagawa M, Nakamura K, Mikami Y, Yamamoto S, Sawada K, Hamazaki Y, Maeda S, Terasaki M: Functional roles of Wnt/ β -catenin pathway regulating growth and maintenance of colonospheres. 4th International Symposium on Carcinogenic Spiral, Sapporo, February 10-11, 2014.
- Terasaki M, Masuda S: Functional roles of CD44 and EpCAM in the development of colorectal cancer stem cells. 第 72 回日本癌学会学術総会、横浜、2013 年 10 月 3-5 日。
- Tanaka T, Kochi T, Shimizu M, Sugie S, Moriwaki H: 4'-Geranyloxyferulic acid-L-NAME suppresses inflammation-associated colorectal carcinogenesis in mice. 第 72 回日本癌学会学術総会、横浜、2013 年 10 月 3-5 日。
- Kuno T, Tanaka T, Takamatsu M, Hatano Y, Tomita H, Hirose Y, Hirata A, Hara A: Deoxycholic acid, secondary bile acid promotes AOM-induced colorectal carcinogenesis in distal colon of mice but not

proximal colon. 第 72 回日本癌学会学術総会、横浜、2013 年 10 月 3-5 日。

- 小山内 誠、李 康弘：ニコチンはレチノイン酸代謝酵素 CYP26A1 の発現を低下させ乳癌の進行を抑制する。第 102 回日本病理学会総会、札幌、2013 年 6 月 6-8 日。
- 加藤雄也、工藤成美、佐藤永楽、佐藤隆太郎、館岡さおり、近野 優、西川亮太、田中耕太、寺崎 将、増田園子：分子イメージングによるがん幹細胞の特性解析。日本薬学会北海道支部第 140 回例会、札幌、2013 年 5 月 18-19 日。
- Terasaki M, Maeda H, Hosokawa M, Miyashita K, Masuda S: Combined antiproliferative effect in dietary PPAR γ regulating lipids against human colorectal cancer cells. International Society for Nutraceuticals and Functional Foods (ISNFF), Sapporo, November 14-17, 2011.
- 寺崎 将、長尾昭彦、前多隼人、宮下和夫、増田園子：フコキサンチンと活性型ビタミン D $_3$ の複合効果による大腸がん化学予防法の開発。第 25 回カロテノイド研究談話会、筑波、2011 年 9 月 13-14 日。
- 寺崎 将、増田園子：機能性脂質による PPAR γ 発現抑制。平成 23 年度がん若手研究者ワークショップ、蓼科、2011 年 8 月 31 日~9 月 3 日。

[その他]

研究室のホームページ

<http://www3.hoku-iryu-u.ac.jp/courses/1/010/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田 園子 (MASUDA, Sonoko)
北海道医療大学・薬学部・教授
研究者番号：90157206

(2) 研究分担者

田中 卓二 (TANAKA, Takuji)
岐阜大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：40126743
小山内 誠 (OSANAI, Makoto)
高知大学・教育研究部・医療学系・准教授
研究者番号：60381266
寺崎 将 (TERASAKI, Masaru)
北海道医療大学・薬学部・講師
研究者番号：10391195