

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791283

研究課題名(和文)悪性黒色腫幹細胞の網羅的エピゲノム解析と新規分子標的の同定

研究課題名(英文)Epigenomic analysis and development of therapeutic target for malignant melanoma

研究代表者

佐藤 亜紀子(SATO, AKIKO)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：10468093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：悪性黒色腫細胞株において、幹細胞様性質をもつ細胞を同定するための検討を行った。ABCB5陽性細胞、CD271陽性細胞は、ABCB5陰性細胞やCD271陰性細胞と比較してNOD-SCIDマウスにおいて高い腫瘍形成能を示した。またPKH染色による色素保持細胞(label retaining cell)は高いsphere形成能を示し、かつCD271およびABCB5を高発現していた。これらの結果から、label retaining cellは幹細胞様性質を持つ細胞集団を含んでいると考えられた。これらの細胞のさらなるエピゲノム解析が、悪性黒色腫の新しい治療標的の発見に有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To identify subpopulation having stem cell characteristics in melanoma, we isolated cells by fluorescence-activated sorting and implanted cells to NOD/SCID mouse and performed sphere formation assay. ABCB5 positive subpopulation in AK1 melanoma cells and CD271 positive cells in WM266 cells were more tumorigenic than CD271 negative cells or ABCB5 negative cells when grafted to mice. We also analyzed slow cycling, label retaining cell. The rate of sphere formation of label retaining cells was higher than the other cells and label retaining cells showed increased expression of CD271 and ABCB5. These results show these subpopulation in melanoma cells have stem cell characteristics. We think additional analysis of epigenetic change of these cells can be used to detect new therapeutic target for melanoma.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：悪性黒色腫 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫は悪性度の高い皮膚癌で、毎年その発生数は漸増の傾向にある。遠隔転移例では極めて予後不良であり、転移に対する有効な治療法の開発が必要である。近年、癌幹細胞の概念が提唱され、癌の治療抵抗性に癌幹細胞が関与していることが明らかにされ、新たな治療標的として期待されている。これまで、CD133 などが各種のがん幹細胞に特異的なマーカーとして報告されているが、悪性黒色腫の幹細胞に特異的なマーカーに関しては未知の点が多い。

エピジェネティクス異常は、ほぼあらゆる悪性腫瘍に見られる現象であり、癌抑制遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化による不活化がその代表例である。ES 細胞や iPS 細胞の研究などにおいては遺伝子発現の制御にエピジェネティックな修飾が関連していることが報告され、癌幹細胞においても、癌化への初期イベントや幹細胞性の維持においてエピジェネティックな発現制御機構が関連している可能性が指摘されているが、その詳細なメカニズムは未だ明らかでない。癌幹細胞におけるエピジェネティックな制御機構を解析することは癌の治療抵抗性メカニズムを解き明かし、これを克服する新規治療法の開発に必要不可欠と考えられる。これまで我々は、DNA メチル基転移酵素 DNMT をノックアウトしたがん細胞において、がん幹細胞の指標である Side Population(SP)細胞分画が減少することを見出した。この事実は、DNA メチル化などのエピジェネティックな制御ががん幹細胞の維持に重要な役割を果たすことを示唆する。

悪性黒色腫においても癌幹細胞の存在が報告されているが、特異的なマーカーについてはいまだ決定的なものがない。また、遺伝子解析や、ゲノム網羅的なエピジェネティックな異常についても明らかではない。

悪性黒色腫治療の奏効率が低い原因として、癌幹細胞に存在する薬剤を排出するトランスポーターの存在や、癌腫瘍抗原の発現低下などの可能性が考えられる。このような癌の

幹細胞性がどのようなエピジェネティックな異常により制御されているのかをゲノム網羅的に解析することは、悪性黒色腫の治療において新たなアプローチを発見する上で非常に重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究は、悪性黒色腫の癌幹細胞を同定し、そのエピゲノム異常を解明し、エピゲノム異常を標的とした新規治療法の開発の基盤となる研究を行うこと目標とする。

3. 研究の方法

(1) Side population cell、CD271 陽性細胞、ABCB5 陽性細胞の分離

悪性黒色腫幹細胞を分離するため、幹細胞のマーカーとされる分子(CD271, ABCB5)の抗体や Hoechst を用いて悪性黒色腫細胞株を染色した後、FACS Aria を用いて陽性細胞を分離した。

(2) Label retaining cell の分離

Slow cycling な label retaining cell を分離するため、PKH 色素により悪性黒色腫細胞株を染色し、melanosphere medium と ultra low attachment dish で培養した。その後、FACS aria にて PKH high 細胞と PKH low 細胞を分離した。

(3) 幹細胞性質の確認

分離した細胞を免疫不全マウスに移植し、in vivo での腫瘍形成能を確認した。また in vitro で sphere assay を行って腫瘍の増殖能を評価し、幹細胞様性質の有無を評価した。

(4) 遺伝子発現解析

上記の実験で分離した癌幹細胞様性質を持つ細胞集団から DNA、RNA を抽出し、遺伝子発現を解析した。

4. 研究成果

(1) Side population cell の分離と幹細胞様性質についての検討

悪性黒色腫細胞株において幹細胞様性質をもつ細胞を同定するため、悪性黒色腫の幹細胞マーカーと報告されている抗体あるいは色素を用いて陽性細胞を分離し、NOD-SCID

マウスに移植して腫瘍形成能を検討した。Hoechst 色素を用いた FACS 解析で Side Population (SP)細胞が確認された A2058 メラノーマ細胞株を、NOD-SCID マウスに移植して造腫瘍能を検討した結果、SP 細胞、MP 細胞いずれも腫瘍を形成し、増殖にも差はみられなかった。

(2) ABCB5 陽性細胞の分離と幹細胞様性質についての検討

ABCB5 抗体で陽性細胞が確認された AKI メラノーマ細胞株を用いて、ABCB5 陽性細胞と陰性細胞を NOD-SCID マウスに移植したところ ABCB5 陽性細胞では移植細胞数 100 個、10 個のいずれにおいても腫瘍形成がみられたが、ABCB5 陰性細胞ではすべての NOD-SCID マウスにおいて腫瘍は生着しなかった。AKI における ABCB5 陽性細胞は、腫瘍形成能が高い細胞集団であることが示唆された。

(3) CD271 陽性細胞の分離と幹細胞様性質についての検討

CD271 抗体について陽性細胞がみられた WM266 細胞株で、CD271 陽性細胞と陰性細胞を NOD-SCID マウスに移植したところ、CD271 陽性細胞および CD271 陰性細胞のいずれも NOD-SCID マウスに生着すること確認された。移植細胞数 100 個 では CD271 陽性細胞と CD271 陰性細胞で増殖に差はみられなかったが、移植細胞数 10 個では CD271 陽性細胞由来の腫瘍は陰性細胞由来の腫瘍と比較して、有意差をもって高い増殖速度を示した。これらの結果から、WM266 における CD271 陽性細胞は、腫瘍形成能が高い細胞集団であることが示唆された。

WM266 以外の細胞株においても検討を行った。mm96L と A2058 メラノーマ細胞株を対象に、FACS によって CD271 陽性細胞と陰性細胞を分離し、NOD-SCID マウスに移植を行

って腫瘍形成能を検証した。mm96L 細胞、A2058 細胞いずれにおいても CD271 陽性細胞と CD271 陰性細胞の両方で腫瘍形成が見られ、腫瘍径にも差は認めなかった。これらのことから CD271 陽性細胞は、WM266 細胞においては幹細胞様性質をもつ細胞集団であるが、mm96L 細胞や A2058 細胞においては腫瘍形成能に差がみられず、幹細胞マーカーとなり得るかどうかは細胞株によって異なると考えられた。また NOD-SCID マウスへの移植実験は、細胞株によっては移植細胞数 10 個でも CD271 陽性・陰性に関係なく、全てのマウスで腫瘍が形成されるため、腫瘍形成能の評価方法としてテクニカルに困難であると考えられた。

(4) label retaining cell の分離と幹細胞様性質についての検討

一般に幹細胞は細胞周期において静止期にあることが多く、また分裂の際も非対称性分裂をする性質があることから、色素保持細胞 (label retaining cell) が幹細胞様性質を示すことが報告されている。そこで、この手法を用いてメラノーマ幹細胞を分離出来るか検討した。PKH 色素を用いて WM266 メラノーマ細胞株の細胞膜を染色して培養した。FACS を用いて PKH 色素を保持する PKH high 細胞と、PKH low 細胞を分離し、sphere 形成能を比較したところ、PKH high 細胞が PKH low 細胞よりも高い sphere 形成能を示した。これらのことから、WM266 細胞において label retaining cell が幹細胞様性質を持つ可能性が示唆された。

次に label retaining cell において、既知の幹細胞マーカー (CD271、ABCB5) の発現を検討した。CD271 抗体を用いて FACS 解析した結果、PKH high cell は PKH low cell と比較して、CD271 を高発現する傾向にあった。

PKH high cell と PKH low cell より RNA を抽出し、遺伝子発現を real time RT-PCR にて

解析した。その結果、WM266 細胞では CD271 および ABCB5 の発現が、PKH high cell において PKH low cell より高い傾向にあり、A2058 細胞で ABCB5 が PKH high cell において PKH low cell より高い傾向にあった。これらのことから、label retaining cell が幹細胞性質を持つことを示唆された。

さらに label retaining cell における遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析するため、マイクロアレイ解析を試みた。FACS により分離した PKH high cell および PKH low cell から RNA を抽出しラベリング実験を行ったが、RNA 量が極めて少量だったためデータを得ることが出来なかった。label retaining cell の回収方法として、最初に sphere を形成してから FACS によって細胞分離する方法では回収できる細胞数が非常に少なく、複数回の実験によって細胞数を増やして改めて試みたが、マイクロアレイ実験には不十分であった。label retaining cell を高効率に回収できる方法を検討する必要があると考えられた。

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 2 件)

1. Suzuki R, Yamamoto E, Nojima M, Maruyama R, Yamano HO, Yoshikawa K, Kimura T, Harada T, Ashida M, Niinuma T, **Sato A**, Noshio K, Yamamoto H, Kai M, Sugai T, Imai K, Suzuki H, Shinomura Y. Aberrant methylation of microRNA-34b/c is a predictive marker of metachronous gastric cancer risk.

J Gastroenterol. Epub ahead of print, 2013.

査読有

DOI : 10.1007/s00535-013-0861-7

2. Yamamoto E, Suzuki H, Yamano HO, Maruyama R, Nojima M, Kamimae S, Sawada T, Ashida M, Yoshikawa K, Kimura T, Takagi R, Harada T, Suzuki R, **Sato A**, Kai M, Sasaki Y, Tokino T, Sugai T, Imai K, Shinomura Y,

Toyota M. Molecular dissection of premalignant colorectal lesions reveals early onset of the CpG island methylator phenotype.

Am J Pathol. 181:1847-61, 2012. 査読有

DOI : 10.1016/j.ajpath.2012.08.007

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 佐藤亜紀子、甲斐正広、山本英一郎、丸山玲緒、西坂尚弘、山下利春、鈴木 拓 : DGKG による悪性黒色腫の浸潤抑制機構の解析 . 第 7 回日本エピジェネティクス研究会総会 . 2013 年 5 月 30 日 . 奈良

2. 佐藤亜紀子、甲斐正広、鈴木 拓、西坂尚弘、肥田時征、米田明弘、山下利春 : DGK- γ は黒色腫細胞の浸潤に関与する . 日本研究皮膚科学会第 37 回年次学術大会・総会 . 2012 年 12 月 7 日 . 沖縄 .

3. 佐藤亜紀子、甲斐正広、鈴木 拓、山本英一郎、丸山玲緒、西坂尚弘、山下利春 : DGK- γ は黒色腫細胞の浸潤に関与する . 第 71 回日本癌学会学術総会 . 2012 年 9 月 20 日 . 札幌 .

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 亜紀子 (SATO, Akiko)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 10468093