

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590389

研究課題名(和文) EpCAMによる癌幹細胞特異的代謝機構の解明及びその阻害による癌治療法の開発

研究課題名(英文) Development of cancer therapy targeting the metabolism activated by EpCAM in cancer stem cells.

研究代表者

永野 修 (Nagano, Osamu)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：30404346

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、主要な癌幹細胞マーカーの一つであるEpCAMが癌幹細胞の細胞内代謝に与える影響について解析し、その阻害による癌幹細胞特異的治療法の立案を目的として行った。その結果、EpCAMの発現は癌細胞においてペントースリン酸経路の活性化を促進することで抗酸化物質グルタチオンの還元力を高め、酸化ストレス抵抗性に寄与することが分かった。このことから、EpCAM陽性の癌幹細胞において、EpCAMを介したペントース経路の活性化機構を標的とする治療法は、グルタチオン合成の阻害剤と併用することで、効果的に癌幹細胞の酸化ストレス抵抗性を減弱させることが可能であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, I analyzed the role of EpCAM, one of the major cancer stem cell markers, in the metabolism of cancer stem cell to develop new cancer therapy selectively targeting cancer stem cells. As a result, I found that EpCAM expression promotes the activation of pentose phosphate pathway and thereby promotes the reduction of oxidized glutathione. These results suggested that the combination therapy using the inhibitors for pentose phosphate pathway and glutathione synthesis might be effective to EpCAM-expressing cancer stem cells.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：癌幹細胞 EpCAM 糖代謝

1. 研究開始当初の背景

癌幹細胞特異的治療法の開発は、癌の治療抵抗性や転移に対して有効な治療法に繋がる可能性があり、非常に期待されている。これまでの研究から、固形癌における有力な癌幹細胞マーカーの一つである EpCAM においても、癌幹細胞の幹細胞性の獲得・維持に関わる何らかの機能を有していることが考えられる。しかしながら、そのような EpCAM の癌幹細胞における新たな機能を説明できる分子メカニズムについては、これまでほとんど分かっていない。

2. 研究の目的

近年、別の癌幹細胞マーカーである CD44 が癌細胞の細胞内代謝に影響を与えていることが分かり、EpCAM についても何らかの細胞内代謝への影響を与えていることが示唆される。そこで EpCAM に関しても同様に、細胞内代謝に与える影響について明らかにし、その阻害による癌幹細胞特異的治療法の立案を目的とする。

3. 研究の方法

EpCAM 高発現かつ造腫瘍性である癌幹細胞様の癌細胞株を用いて EpCAM が、癌細胞の細胞内代謝に与える影響について、RNA 干渉法 (siRNA) により EpCAM 特異的な発現抑制を行い、細胞内代謝物質を網羅的に検出できる手法であるメタボローム解析を行うことで明らかにし、その反応に EpCAM の発現が関わっているかを、検討する。

4. 研究成果

(1) EpCAM 特異的抗体による腫瘍増殖の抑制
EpCAM が、治療標的となりえるかについて検討するために、EpCAM 陽性卵巣癌細胞を同所移植したマウスモデルを作成し、EpCAM 特異的抗体を用いて治療実験を行った。治療後、生体イメージングによって腫瘍サイズの測定を行ったところ、有意な抗腫瘍効果が認められた (図 1)。

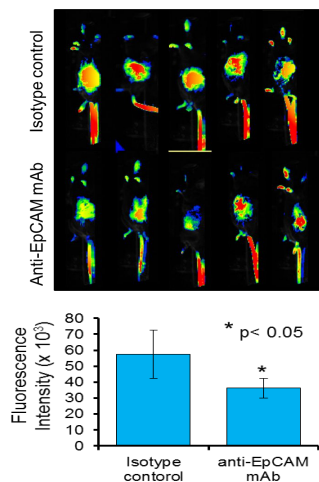


図 1. 抗 EpCAM 抗体投与による抗腫瘍効果

(2) EpCAM ノックダウン細胞におけるメタボローム解析

EpCAM 特異的 siRNA によって発現抑制を行い、メタボローム解析を実施した。その結果、EpCAM ノックダウン細胞では、ペントースリン酸経路における代謝物が著明に減少することが分かった (図 2)。EpCAM のノックダウンは、とくにペントースリン酸経路の入口の反応であり、且つボトルネックの反応でもあるグルコース 6-リン酸からリボース 5-リン酸への変換を抑制し、NADPH の産生を著明に減少させることが分かった (図 3)。

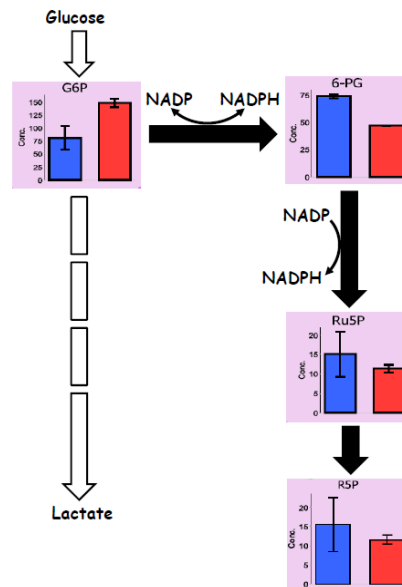


図 2. EpCAM ノックダウンによるペントースリン酸経路代謝物の減少

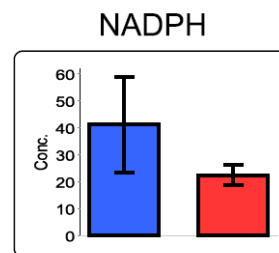


図 3. EpCAM ノックダウンに伴う NADPH 量の減少

(3) EpCAM 発現抑制とグルタチオン合成の抑制剤との相乗効果の検討

メタボローム解析の結果から、EpCAM 特異的 siRNA によってペントース経路の著明な低下が認められた。ペントース経路は癌幹細胞における重要な抗酸化物質であるグルタチオンの還元にかかわる NADPH の産生に関わる経路である。そのため、グルタチオン合成を阻害する薬剤との併用効果が期待できる。そこで、EpCAM 特異的 siRNA を行った細胞でのグルタチオン合成阻害剤スルファサラジンと

の併用効果について調査した。その結果、EpCAM をノックダウンした細胞においては、スルファサラジン感受性が亢進していることが示された(図4)。このことから、EpCAM はペントース経路を介してグルタチオンの還元に寄与していることが示唆された。

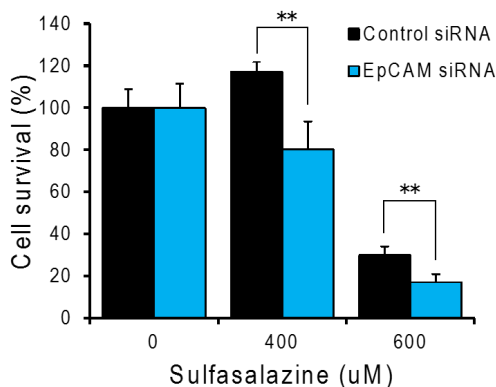


図4 . EpCAM ノックダウンによるスルファサラジン感受性の亢進

(4)そこで、実際にEpCAMがペントース経路を制御する機構を明らかにするため、EpCAM 特異的 siRNA がペントース経路の制御に重要であるペントース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ(G6PD)の発現に及ぼす影響を検討した。その結果、2種類のEpCAM 特異的 siRNAにより、G6PDの発現低下が認められた(図5)。このことから、EpCAMはG6PDの発現を制御することによりペントース経路を活性化していることが示唆された。

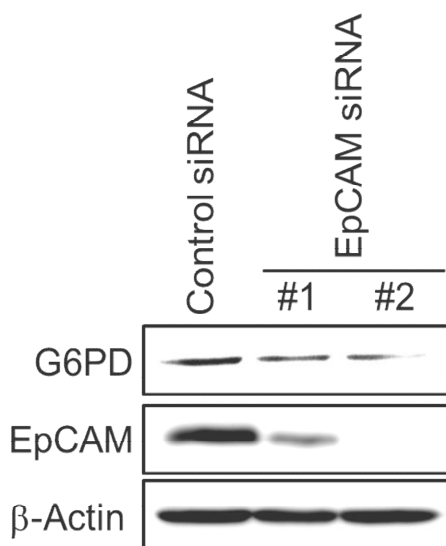


図5 . EpCAM ノックダウンがG6PDタンパク質の発現に与える影響

(6)結論

これらの実験結果からEpCAMが、ペントースリン酸経路への流入に関わる重要な酵素である

G6PDの発現を増加させることによって、癌幹細胞をはじめとするEpCAM陽性癌細胞のペントースリン酸経路を活性化し、その結果、癌細胞の酸化ストレス抵抗性に関わる抗酸化物質であるグルタチオンの還元に必要なNADPHの産生を亢進させることが明らかとなった。したがって、EpCAMを介したG6PDの制御機構は、EpCAM陽性癌幹細胞を特異的に標的とする癌治療のための新たな分子標的となり得ると考えられた。

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 13 件)

1 . Ishimoto T, Sugihara H, Watanabe M, Sawayama H, Iwatsuki M, Baba Y, Okabe H, Hidaka K, Yokoyama N, Miyake K, Yoshikawa M, Nagano O, Komohara Y, Takeya M, Saya H, Baba H. Macrophage-derived reactive oxygen species suppress miR-328 targeting CD44 in cancer cells and promote redox adaptation. *Carcinogenesis*. 2014; 35:1003-1011. (査読有り)

2 . Okabe H, Ishimoto T, Mima K, Nakagawa S, Hayashi H, Kuroki H, Imai K, Nitta H, Saito S, Hashimoto D, Chikamoto A, Ishiko T, Watanabe M, Nagano O, Beppu T, Saya H, Baba H. CD44s signals the acquisition of the mesenchymal phenotype required for anchorage-independent cell survival in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*. 2014; 110: 958-66. (査読有り)

3 . Fierro S, Seishima R, Nagano O, Saya H, Einaga Y. In vivo pH monitoring using boron doped diamond microelectrode and silver needles: application to stomach disorder diagnosis. *Sci Rep*. 2013; 3:3257. (査読有り)

4 . Wada T, Ishimoto T, Seishima R, Tsuchihashi K, Yoshikawa M, Oshima H, Oshima M, Masuko T, Wright NA, Furuhashi S, Hirashima K, Baba H, Kitagawa Y, Saya H, Nagano O. Functional role of CD44v-xCT system in the development of spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia. *Cancer Sci*. 2013;104: 1323-1329. (査読有り)

5 . Hirata K, Suzuki H, Imaeda H, Matsuzaki J, Tsugawa H, Nagano O, Asakura K, Saya H, Hibi T. CD44 variant 9 expression in primary early gastric cancer as a predictive marker for recurrence. *Br J Cancer*. 2013; 109:379-386. (査読有り)

6 . Nagano O, Okazaki S, Saya H. Redox regulation in stem-like cancer cells by CD44 variant isoforms. *Oncogene*. 2013; 32:5191-5198. (査読有り)

7 . Yoshikawa M, Tsuchihashi K, Ishimoto T, Yae T, Motohara T, Sugihara E, Onishi N, Masuko T, Yoshizawa K, Kawashiri S, Mukai M, Asoda S, Kawana H, Nakagawa T, Saya H, Nagano O. xCT inhibition depletes CD44v-expressing tumor cells that are resistant to EGFR-targeted therapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2013; 73:1855-1866. (査読有り)

8 . Tsugawa H, Suzuki H, Saya H, Hatakeyama M, Hirayama T, Hirata K, Nagano O, Matsuzaki J, Hibi T. Reactive Oxygen Species-Induced Autophagic Degradation of Helicobacter pylori CagA Is Specifically Suppressed in Cancer Stem-like Cells. *Cell Host Microbe*. 2012; 12:764-777. (査読有り)

9 . Kobayashi Y, Banno K, Shimizu T, Ueki A, Tsuji K, Masuda K, Kisu I, Nomura H, Tominaga E, Nagano O, Saya H, Aoki D. Gene expression profile of a newly established choriocarcinoma cell line, iC(3)-1, compared to existing choriocarcinoma cell lines and normal placenta. *Placenta*. 2013; 34:110-118. (査読有り)

10 . Fierro S, Yoshikawa M, Nagano O, Yoshimi K, Saya H, Einaga Y. In vivo assessment of cancerous tumors using boron doped diamond microelectrode. *Sci Rep*. 2012; 2:901. (査読有り)

11 . Goto TM, Arima Y, Nagano O, Saya H: Lysyl oxidase is induced by cell density-mediated cell cycle suppression via RB-E2F1-HIF-1 axis. *Cell Struct Funct*. 2012; 38:9-14. (査読有り)

12 . Yae T, Tsuchihashi K, Ishimoto T, Motohara T, Yoshikawa M, Yoshida GJ, Wada T, Masuko T, Mogushi K, Tanaka H, Osawa T, Kanki Y, Minami T, Aburatani H, Ohmura M, Kubo A, Suematsu M, Takahashi K, Saya H, Nagano O: Alternative splicing of CD44 mRNA by ESRP1 enhances lung colonization of metastatic cancer cell. *Nat Commun*. 2012; 3:883. (査読有り)

13 . Mima K, Okabe H, Ishimoto T, Hayashi H, Nakagawa S, Kuroki H, Watanabe M, Beppu T, Tamada M, Nagano O, Saya H, Baba H: CD44s regulates the TGF- β -mediated mesenchymal

phenotype and is associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2012;72:3414-3423 (査読有り)

[学会発表](計 10 件)

1 . 永野修、がん幹細胞において活性化される CD44v-xCT を介した抗酸化システムを標的とするがん治療戦略 第 37 回日本分子生物学会総会、2014 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

2 . 永野修、Redox regulation in stem-like cancer cells by CD44v 第 73 回日本がん学会学術総会、2014 年 7 月 31 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

3 . 永野修、酸化ストレス回避機構を標的としたがん幹細胞治療戦略 第 30 回日本 DDS 学会学術総会、2014 年 7 月 31 日、慶應義塾大学 薬学部 芝共立キャンパス (東京都港区)

4 . 永野修、Cancer treatment strategy targeting antioxidant system potentiated by CD44v-xCT in stem-like cancer cells. 第 33 回 札幌国際がんシンポジウム、2014 年 6 月 28 日、ロイトン札幌 (北海道札幌市)

5 . 永野修、Redox regulation in stem-like cancer cells by CD44v 第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

6 . 永野修、Redox regulation in stem-like cancer cells by CD44v. 第 11 回日本臨床腫瘍学会総会、2013 年 9 月、東北大学 (宮城県仙台市)

7 . 永野修、CD44v-xCT を介した酸化ストレス回避機構を標的とした癌治療戦略. 第 17 回日本がん免疫学会総会、2013 年 6 月、ANA クラウンプラザホテル宇部 (山口県宇部市)

8 . 永野修、酸化ストレス回避機構を標的とした癌幹細胞治療戦略. 第 17 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2013 年 6 月、国立京都国際会館、(京都府京都市)

9 . 永野修、CD44 バリエーションアイソフォームを介した腫瘍形成および癌転移機構の解明 第 55 回日本放射線影響学会、2012 年 9 月、東北大学 (宮城県仙台市)

10 . 永野修、The functional role of CD44 variant in cancer metastasis. 第 23 回日本臨床口腔病理学会、2012 年 8 月 31 日、東京医科歯科大学 (東京都文京区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

慶應義塾大学医学部・先端医科学研究所・遺伝子制御部門

<http://www.genereg.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

永野修 (NAGANO OSAMU)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：30404346