

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462061

研究課題名(和文) 生体防御調節因子の細胞内挙動に基づく新規がん幹細胞マーカーの探索

研究課題名(英文) The explore of new cancer stem cell marker based on intracellular behavior of biological defense factor

研究代表者

後藤 信治 (GOTO, Shinji)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教

研究者番号：50186889

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、生体防御調節因子であるグルタチオンS-トランスフェラーゼ の細胞内局在の相違を基にして、大腸がん細胞株HCT8から、シスプラチンやドキソルビシンなどの抗がん剤に対する耐性と栄養枯渇状態への耐性を併せ持つ、がん幹細胞である可能性が非常に高い細胞を分離した。これを踏まえ、現在、新規のがん幹細胞マーカー探索のために、細胞表面に発現する分子の網羅的解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：We isolated candidate of cancer stem cell which has resistance to nutrient starvation and anticancer drugs such as doxorubicin and cisplatin from HCT8 human colon cancer cell line by evaluation of intracellular localization of Glutathione S-transferase pi. We have been investigating cell surface molecules by global analysis to explore new cancer stem cell marker.

研究分野：医学

キーワード：がん幹細胞 がん幹細胞マーカー 抗がん剤耐性 栄養飢餓耐性 グルタチオンS-トランスフェラーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、がん組織の基盤となるがん幹細胞が、自己複製能や腫瘍造成能などを有すると共に、治療に抵抗し再発の起点になると報告されている。がんを征圧するために必要な、がん幹細胞を標的とする新たな診断・治療法の開発の為に、がん幹細胞の特異的マーカーやその機能を解析することが盛んに行われている。特に、大腸がんなどでは、CD44やCD133陽性細胞が、がん幹細胞としての特性を持つと報告されてきた。さらに、グルタチオン(GSH)の合成材料となるシステインの取込みに関わる輸送体の発現をCD44が安定化させることでGSH合成を亢進させ、酸化ストレス抵抗性に寄与することが報告されている(*Cancer Cell* 2011)。また、薬剤排出を担う輸送体も特異的マーカーとして研究されているが、現状では、がん幹細胞の特性や治療抵抗性の分子機序を十分に説明できるほど、がん幹細胞の特異的マーカーの探索や機能解析は進んでいない。

(2) グルタチオン S-トランスフェラーゼ γ (GST γ)は、薬剤の無効化をもたらすGSHとの抱合体形成能と有機過酸化物の還元を担う抗酸化能を併せ持つ酵素として古くから知られている。また、細胞のシグナル伝達や機能調節にも関与することが明らかにされ、現在では単なる酵素という枠を超えた生体防御調節因子と考えられている(*EMBO J* 1999; *J Biol Chem* 2009)。GST γ は種々の正常組織に発現しているが、がん化すると発現量が数倍に増加したり、未発現の組織でも前がん病変で発現が観察されることから、発がんマーカーのひとつと位置付ける研究者もいる。その後、種々の腫瘍において、「GST γ の核局在化は、患者の予後不良因子のひとつである」という報告が出され、がんの悪性化には、GST γ の発現亢進だけでなく、細胞内局在が重要であることが示された(*Clin Cancer Res* 1997; *Clin Oncol* 2005; *Arch*

Dermatol 2009)。我々もGST γ の核やミトコンドリアへの局在化が、がん細胞の抗がん剤や酸化剤に対する抵抗性に重要な役割を果たすことを示すと共に、GST γ の核やミトコンドリア局在化シグナルを明らかにするなど、研究を進めてきた(Goto S, et al. *FASEB J* 2001; *Free Radic Biol Med* 2004; *Free Radic Biol Med* 2009; *Biochem Biophys Res Commun* 2011)。一方、がん幹細胞が腫瘍造成能と共にストレス抵抗性を有するということが明らかになるにつれ、我々は、GST γ が何らかの重要な役割をがん幹細胞中で果たしているのではないかと考えるようになった。そこで、がん幹細胞におけるGST γ の機能解析を進めるため、大腸がん由来の株化がん細胞から、CD44とCD133を共に発現している細胞(CD44+/CD133+)を単離した。次に、単離した細胞に、抗がん剤の一種でGST γ により代謝されるドキソルビシン(DXR)を投与し、GST γ と薬剤の細胞内局在を観察する実験を行ったところ、ドキソルビシン投与後のGST γ の細胞内局在は一様でなく、ストレス暴露下で核局在化が起きる細胞と起きない細胞があることが判明した。DXRが抗腫瘍効果を発揮するためには核へ集積する必要があるが、DXRの核蓄積が低い細胞は、抗がん剤に対して抵抗性を持つ細胞であり、結果的に生存する確立の高い細胞と思われる。つまり、ストレス抵抗性を示す真のがん幹細胞は、CD44+/CD133+細胞中の特定の細胞であり、がん幹細胞の特異的マーカーとして、CD44やCD133の発現だけを解析しても、がん幹細胞を完全に絞り込めていないのではないかと考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ストレス暴露時にGST γ が核に局在する細胞こそが、真の大腸がん幹細胞であり、その細胞表面に発現する分子は新

たながん幹細胞マーカーとして有効であるという仮説を立て、それを立証することである。具体的には、CD44+/CD133+細胞から、ストレス暴露時にGST が核局在化する細胞を単離する。単離した細胞のストレス抵抗性を調べ、がん幹細胞と言えるのか明らかにする。さらに、網羅的解析によって、単離した細胞の表面に発現する分子の特性を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 細胞株 細胞株としては、大腸がん株化細胞 HCT8 を用いた。

(2) ストレス暴露時にGST が核局在化する細胞の単離 HCT8(CD44+/CD133+)細胞を限界希釈法で96 ウェルプレートに播種し、シングル細胞由来の細胞集団を確保した。これらの細胞を二つに分け、一方にのみドキシソルピシンを投与して、薬剤の細胞内局在を観察すると共に、抗GST 抗体を用いた細胞免疫染色法でGST の細胞内局在を観察した。核局在化が観察された細胞のもう一方の未処理細胞を培養し、HCT8の幹細胞 (HCT8SC) 候補として位置付け、以下の実験に用いた。

(3) GST の発現量及び活性の評価

GST の発現量は、抗GST 抗体を使用してイムノプロット法で評価した。また、GST 活性は分光光学的方法で測定した。

(4) 抗がん剤、酸化剤、放射線感受性の評価 抗がん剤としてシスプラチンとドキシソルピシンを、酸化剤として過酸化水素を用いた。種々の濃度の薬剤や酸化剤を細胞に投与した後、細胞の生存率をMTT assay で評価した。

(5) HCT8SC の細胞表面分子の網羅的解析

Becton Dickinson 社の Lyoplate™ Screening Panels とバイオイメージアナライザーを用いて、242 種類のヒト細胞表面分子について網羅的に解析した。

4. 研究成果

(1) ストレス暴露時にGST が核局在化する細胞の単離

HCT8(CD44+/CD133+)細胞にドキシソルピシンを投与して、薬剤の細胞内局在を観察すると共に、抗GST 抗体を用いた細胞免疫染色法でGST の細胞内局在を観察し、ストレス暴露下でGST が核局在化し、ドキシソルピシンの核存在量が低下する細胞、HCT8(CD44+/CD133+^{GSTnp})を得た。さらに、低酸素や糖飢餓などストレスの多い微小環境でも生存・増殖する細胞は、幹細胞である可能性が高いと考えられることから、HCT8(親株)、(CD44 +)、(CD44 -) (CD44 + /CD133 -)、(CD44+/CD133+), (CD44+/CD133+^{GSTnp})の各細胞を牛胎児血清飢餓状態、或いは糖飢餓状態に暴露したところ、(CD44+/CD133+^{GSTnp})細胞からのみストレス下でも生存するHCT8のがん幹細胞候補細胞、HCT8CSC細胞を得た。この細胞の GST 発現量及び酵素活性は、(CD44+/CD133+^{GSTnp})細胞と有意な差は認められなかった。また、GST 抗体を用いた細胞免疫染色法でGST の細胞内局在を観察したところ、牛胎児血清飢餓状態、或いは糖飢餓状態に暴露された状態でも、GST の核局在が観察された。

(2) 抗がん剤、酸化剤、放射線感受性の評価

抗がん剤としてシスプラチンとドキシソルピシンを、酸化剤として過酸化水素を用い、種々の濃度の薬剤、酸化剤を細胞に投与した後、細胞の生存率をMTT assayで評価した。HCT8CSC細胞は、元の細胞群の中でこれらのストレスに最も抵抗性を示す(CD44+/CD133+^{GSTnp})と同等かそれ以上の抵抗性を示した。また、この細胞群は、薬剤の細胞外への排出能が高いだけでなく、薬剤の核蓄積量を有意に減少させていることが明らかとなった。

(3) 糖枯渇状態に対する耐性機構

HCT8CSC 細胞が有する糖枯渇耐性は、CD133の発現には影響されないことが明らかとなった。また、糖枯渇状態に耐え得るか否かは、

メタボローム解析の結果、機構は不明ながら細胞内の糖代謝の差異に基づくものであることが示唆された。

(4) 新規のがん幹細胞マーカーの探索
HCT8CSC細胞は、これまでに明らかにしたシスプラチンやドキソルビシンなどの抗がん剤に対する耐性と低栄養状態への耐性を併せ持つことが明らかとなり、HCT8の真のがん幹細胞である可能性が高まった。これを踏まえ、現在、新規のがん幹細胞マーカー探索のために、HCT8CSC細胞と(CD44+/CD133+^{GSTnp})細胞の細胞表面に発現する分子をLyoplate™ Screening Panelsとバイオイメージアナライザーを用いて、網羅的に解析している。

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 1 件)

Chen Yan, Lan Luo, Shinji Goto, Yoshishige Urata, Chang-Ying Guo, Hanako Doi, Kaio Kitazato, Tao-Sheng Li. Enhanced autophagy in colorectal cancer stem cells does not contribute to radio-resistance. Oncotarget, 査読有, 印刷中, 2016, DOI: 10.18632/oncotarget.8972.

[学会発表](計 2 件)

1. 後藤信治, The expression of CD133 associates with the resistance of cancer stem cells to stresses, 第73回日本癌学会学術総会、2014年9月25日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

2. 後藤信治, The mechanism of drug resistance of CD133-expressed cancer cells, 第88回日本生化学大会、2015年12月2日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 信治 (GOTO Shinji)
長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教
研究者番号：50186889

(2) 研究分担者

李 桃生 (LI Taosheng)
長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授
研究者番号：50379997

研究分担者

川勝 美穂 (KAWAKATSU Miho)
長崎大学・病院(医学系)・客員研究員
研究者番号：20398150