

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670072

研究課題名(和文)新しい発想による癌治療薬剤候補の探索と応用

研究課題名(英文)Search for cancer drug candidate and its application under a new idea

研究代表者

佐藤 英二 (Sato, Eiji)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：70118751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：悪性癌は腫瘍の進行に際し上皮-間葉転換(EMT)を起こすことが明らかになった。癌幹細胞の性状の細胞ではFOXC2が高発現していた。EMT細胞と癌幹細胞の共通特徴は血小板由来成長因子受容体(PDGFR)を発現していることを知った。そこで、申請者はPDGFRの発現を制御しているのはFOXC2ではないかと考え検証した。FOXC2は標的遺伝子PDGFRを介して乳癌のEMTに働くことが示された。PDGFRの阻害剤であるSunitinibをFOXC2発現腫瘍細胞に添加すると、細胞増殖、転移を抑制し、腫瘍様塊形成を減少させた。当研究で用いたSunitinibは新しい乳癌治療の薬剤候補となり得る。

研究成果の概要(英文)：Malignant cancer upon the progress of the tumor was revealed epithelial - mesenchymal transition (EMT). In cells with properties of cancer stem cells, we have found that the FOXC2 is highly expressed. Common characterization between EMT cells and cancer stem cells are known as expression platelet-derived growth factor receptor (PDGFR). Therefore, regulation about the expression of PDGFR I thought that it is the FOXC2. FOXC2 has been shown to work in the EMT of breast cancer through targeted gene PDGFR. Addition of Sunitinib is an inhibitor of PDGFR in FOXC2 expressing tumor cells, inhibited cell growth, metastasis, and reduced the tumor-like mass formation. Sunitinib used in this study can be a candidate of a new breast cancer drug.

研究分野：医歯薬学

キーワード：上皮-間葉転換 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

悪性乳癌は転移をおこすことで治療不可能となる。上皮-間葉転換 (EMT) は腫瘍が浸潤・転移能を獲得する一手段である。

EMT は最初、正常発生における重要な過程であるとして研究された。しかしその後、悪性癌は腫瘍の進行に際し EMT を起こすことが明らかになった。正常発生の際 EMT をおこす細胞のように、EMT をおこした癌細胞は細胞間接着を失い、その細胞骨格系を変化させることで、間葉系細胞の形態をとり、浸潤・転移能を増加させる。腫瘍微小環境に存在するシグナル分子、例えば、TGF β 、Wnt、TNF- α 、Notch や多くの転写因子、Snail、Twist、Gooseoid などは、EMT を引き起こし、転移を促進し、ヒトの癌で異所性にあるいは過剰に発現していることが見出されてきている。最近、EMT 過程が癌細胞に、腫瘍形成能の増加、mammosphere 形成率の上昇、乳癌幹細胞に付随する CD44^{high}/CD24^{low} の性質の獲得などの、幹細胞の性質を付与することが示された

(Cell 2008、PLoS One 2008)。さらに、他のいくつかの報告でも、癌幹細胞も EMT をおこした細胞も従来の化学療法や放射線療法に抵抗性を示すことが示され、EMT は癌幹細胞治療への新しい手段を提供する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

申請者らは、以前に癌細胞に EMT を引き起こす TGF β 、Snail、Twist の下流に FOXC2 があり、間葉化は FOXC2 が担っていること、悪性の basal-like 乳癌には FOXC2 が陽性であることを報告した。その後、EMT について研究を続けた結果、EMT をおこした細胞は癌幹細胞の性状を併せ持つことを見出した。そして、癌幹細胞の性状をもつ細胞では FOXC2 が高発

現していることをつきとめた。また、偶然に EMT 細胞と癌幹細胞の共通特徴は PDGFR β を発現していることを知った。そこで、申請者は PDGFR β の発現を制御しているのは FOXC2 ではないかと考え検討したところ、そうであった。さらに、PDGFR β の阻害剤の Sunitinib の癌抑制効果も検討する。

3. 研究の方法

3 種類の分子で上皮-間葉をおこした株化乳腺細胞において、FOXC2 は高発現しているか。癌幹細胞を濃縮した CD44^{high}CD24^{low} 細胞分画や mammosphere 形成してきた細胞で、FOXC2 が高発現しているかどうかを確かめる。逆に、高発現した FOXC2 を ShRNA によりノックダウンすると、EMT や癌幹細胞の性質が消失するかを検討する。密接な関係が確認され、血小板由来成長因子受容体 β (PDGFR β) が FOXC2 の制御する遺伝子であることが確認された後、FOXC2 陽性の悪性乳癌細胞に対するシャーレ内増殖抑制と移植した乳癌細胞に対する阻害剤 Sunitinib の効果を検討する。

4. 研究成果

HNLER-TGF β 、HNLER-Snail1、HNLER-Twist 細胞に FOXC2 shRNA を遺伝子導入して FOXC2 の発現をノックダウンしたところ、形態的に上皮様構造を示し EMT が抑制された。これはウエスタンブロット解析による上皮マーカー E-cadherin の発現亢進、間葉マーカー Vimentin、Fibronectin、Ncadherin の減少と、遊走能・浸潤能テストでも確認された。

さらに、Foxc2 ノックダウン細胞では癌肝細胞の指標である CD44^{high}/CD24^{low} の細胞の頻度、腫瘍様塊 (mammosphere) 形成数が減少した。有糸分裂阻害剤

paclitaxel に対する感受性も減少した。このことは、FOXC2 が癌幹細胞形成に重要であることを示している。

FACS により分離された CD44high/CD24low 細胞や mammosphere を形成する細胞は乳癌幹細胞の性質をもつことが知られている。そこで、CD44high/CD24low 細胞では CD44low/CD24high 細胞に比較して FOXC2 の発現は亢進していた。

また mammosphere 形成により選択した細胞が選択前の細胞に比して、FOXC2 の発現が著明に増加していた。

さらに、HMLER に FOXC2 発現ベクターを遺伝子導入により高発現させた HMLER-FOXC2 細胞を FACS 解析にかけて解析したところ、FOXC2 遺伝子導入により CD44high/CD24high 細胞が CD44high/CD24low 細胞にシフトすることが明らかになった。

HMLER-TGF β 、HMLER-Snail1、HMLER-Twist 細胞に FOXC2 shRNA を遺伝子導入して FOXC2 の発現をノックダウンしたところ、PDGFR β の発現が消失し、細胞遊走能が減少した。

さらに、PDGFR β の阻害剤である Sunitinib を FOXC2 発現腫瘍細胞に添加すると、細胞増殖、転移を抑制し、mammosphere 形成を減少させた。

以上のことから、FOXC2 は標的遺伝子 PDGFR β を介して乳癌の EMT に働くことが示された。当研究で用いた Sunitinib は新しい乳癌治療の薬剤候補となり得る。

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 5 件)

① Uezato T, Sato E, Miura N. :Screening

of natural medicines that efficiently activate neurite outgrowth in PC12 cells in C2C12-cultured medium. Biomed. Res. 2012 DOI:

10.2220/biomedres.33.25

② Wu YX, Sato E, Kimura W, Miura N. :Baicalin and scutellarin are proteasome inhibitors that specifically target chymotrypsin-like catalytic activity. Phytother Res. 2013 DOI: 10.1002/ptr.4878

③ Sato E. :Twin *Xenopus laevis* embryos appearing from flattened eggs. Proc. Jpn. Acad., Ser. B, 2014 DOI: 10.2183/pjab.90.307

④ Nakamura K, Yang JH, Sato E, Miura N, Wu YX. :Effects of hydroxy groups in the A-ring on the anti-proteasome activity of flavone. Biol. Pharm. Bull. 2015, in press

⑤ Islam MJ, Hikosaka K, Noritake H, Uddin MKM, Amin MB, Aoto K, Wu YX, Sato E, Kobayashi Y, Wakita T, Miura N. :Pol I-transcribed hepatitis C virus genome RNA replicates, produces an infectious virus and leads to severe hepatic steatosis in transgenic mice. Biomedical Research, in press.

[学会発表] (計 2 件)

① 佐藤英二、小沼泰子、藤江三千男、足立直樹、上里忠良、三浦直行、伊藤弓弦、アフリカツメガエル 2 次胚形成における遺伝子発現 # 2、第 46 回日本発生生物学学会、ポスター、2013 年 5 月、松江
② 佐藤英二、小沼泰子、上里忠良、三浦直行、伊藤弓弦、アフリカツメガエル 2 次胚形成における遺伝子発現 # 3、第 87 回日本生化学会大会、ポスター、2014 年 10 月、京都

[その他]

ホームページ等

[http://www2.hama-med.ac.jp/w1a/bio2/
index-j.html](http://www2.hama-med.ac.jp/w1a/bio2/index-j.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 英二 (SATO Eiji)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：70118751