

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830087

研究課題名(和文) 癌幹細胞におけるCdk-Pin1経路の活性化機構の解明

研究課題名(英文) A study for molecular mechanism of the Cdk-Pin1 axis in cancer stem cell

## 研究代表者

西 真由子 (Nishi, Mayuko)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：90635343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々が樹立した人工癌幹細胞モデル細胞においてCdk-Pin1経路を阻害する化合物のスクリーニングを行い、Withaferin A(WA)を同定した。WAはp21Cip1の発現を誘導することで、Cdk活性を阻害し細胞老化を誘導することで癌幹細胞(CSC)の未分化能および自己複製能を阻害した。さらにWA処理したCSC細胞をヌードマウス皮下に移植したところ、腫瘍形成能が顕著に抑制された。また、Cdkによりリン酸化される機能的タンパク質を同定するため、Pin1を分子プローブに用いたリン酸化プロテオーム解析を試みた結果、数十種類の候補タンパク質を同定した。

研究成果の概要(英文)：We recently established an induced cancer stem cell (CSC)-like model. We utilized the cell model for drug screening to inhibit the Cdk-Pin1 axis in CSCs. Withaferin A (WA) was identified as a compound inhibiting Cdk activity by inducing p21. WA inhibited not only the stemness and self-renewal properties of CSCs but also their ability of migration and invasion. WA decreased both the tumor initiation and the tumor-forming ability of CSCs in an immunosuppressed mouse model. We further attempted to identify functional Cdk substrates by a proteomic approach using Pin1 as a molecular probe. We identified several target proteins for further analysis.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：癌幹細胞 リン酸化 癌抑制遺伝子 細胞老化

## 1. 研究開始当初の背景

最近の研究から、癌組織は少数の癌幹細胞と多数の癌細胞で構成されていることがわかってきた。癌幹細胞は対称分裂および非対称分裂を繰り返すことで、自己複製しながら、様々なレベルに分化した癌細胞を生み出す。癌幹細胞は、抗癌剤や放射線治療などの従来の癌治療に対して抵抗性であるため、治療後に癌が再発する場合の元凶と考えられている。そのため癌の根治療法の開発をめざし、癌幹細胞を標的としたさまざまな研究がおこなわれている。しかしながら、これまで純粋で均一な癌幹細胞を分離、培養するのは技術的に困難であり、そのため癌幹細胞を標的とした有効な薬剤は開発されていない。この問題を克服するために、我々はヒト不死化乳腺上皮細胞からリプログラミング操作を経てiPS様細胞を樹立し、それを部分的に分化誘導することで組織癌幹細胞の性質を有する均一な細胞からなる人工癌幹細胞モデル(iCSCL-10A)を樹立した。数百個のiCSCL-10A細胞を免疫不全マウスに移植すると、上皮系、間葉系を含む多種多様な癌組織に分化することから、癌幹細胞の特性である自己複製能や多分化能を保持していることが確認された。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、iCSCL-10Aを用いて癌幹細胞(CSC)の悪性化形質の発現や維持に重要な因子を明らかにし、癌幹細胞の新たな治療標的を同定することを目的とした。予備実験の結果から、iCSCL-10Aは正常幹細胞と比較してサイクリン依存性キナーゼ阻害因子(CDKN)の発現が顕著に低下しており、サイクリン依存性キナーゼ群(Cdk)の定常的な活性化が認められた。また、レトロウイルスベクターを用いてp16Inkやp21Cip1を定常的に発現させたところ、CSCの悪性化形質の減弱が認められたことから、CdkがCSCの悪性化形質の発現や維持に重要な役割を果たす

と考えられた。そこで本研究では、Cdkの活性を阻害して癌幹細胞の特性を阻害する化合物の探索を行い、癌幹細胞に対する新たな治療戦略の提案を行う。また、CSCの増殖や維持に関わる細胞内因子を同定するため、プロリルイソメラーゼ Pin1 を分子プローブに用いたプロテオーム解析を実施する。これらによりCSCの悪性化形質の発現や維持を阻止する因子や細胞内シグナルを解明することを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1)細胞

レトロウイルスベクターを用いてMCF-10A細胞に山中4因子を導入し、iPS様細胞を樹立した。続いて、これらの細胞のコロニーを単離後、浮遊培養系を用いて胚様体を形成させた後、これらを付着培養系で培養することで組織癌幹細胞と同程度の分化レベルを示すiCSCL-10A細胞を樹立した。iCSCL-10Aは10% FBSおよび1% penicillin/streptomycinを添加したDMEMで培養維持した。

### (2)植物由来天然化合物

常磐植物化学研究所より購入した天然化合物ライブラリーを使用した。化合物はDMSOでそれぞれ10mMに溶解し、フィルトレーション後細胞に添加した。

### (3)細胞増殖・毒性アッセイ(WST-8 assay)

iCSCL-10Aを96wellプレートに $5 \times 10^3$ /wellになるように播種し、24時間後に終濃度1 $\mu$ Mになるように化合物を添加した。48時間後、WST-8 activity assay Kit(同仁化学)を用いて細胞増殖能を測定した。

### (4)分化誘導アッセイ(Alkaline Phosphatase assay;ALP assay)

iCSCL-10Aを96wellプレートに $5 \times 10^3$ /wellになるように播種し、24時間後に終濃度1 $\mu$ Mになるように化合物を添加した。48時間後、

TRACP & ALP Assay Kit( タカラバイオ )を用いてアルカリフォスファターゼ活性を測定した。

(5) 自己複製能アッセイ (Tumor sphere formation assay)

iCSSL-10A を 96well Ultra low-attachment surface plate (Corning 社)に  $5 \times 10^3$ /well になるように播種し、同時に終濃度 1 $\mu$ M になるように化合物を添加した。48 時間後に顕微鏡下で観察し、Sphere 数を測定した。細胞播種の際には、5mg/ml Insulin、0.5mg/ml Hydrocortisone、2% B27 (ライフテクノロジ社製) および 20ng/ml Epidermal Growth Factor を添加した無血清 DMEM-Ham's F12 培地を用いた。

(6)細胞浸潤能アッセイ (Cell invasion assay; matrigel-coated transwell assay)

1mg/ml 濃度のマトリゲルでコートした 24well transwell の上室に 0.1%FBS/DMEM を用いて iCSSL-10A 細胞を播種し (  $2 \sim 5 \times 10^5$  cell/ml ) transwell の下室にフィブロネクチンを含む 10% FBS/DMEM を加えて培養した。24 時間後に綿棒でフィルター上面をこすり細胞を除去した後、浸潤した細胞をクリスタルバイオレット液で染色し、顕微鏡下で細胞数を計測した。

(7)創傷治癒アッセイ (Wound healing assay)

iCSSL-10A を  $2.5 \times 10^5$  cell/ml になるように播種し、24 時間後にチップで dish の中央部数カ所に一直線に線を引いた。はがれた細胞を取り除くために一度培地交換し、6 時間後に顕微鏡下で細胞運動能を測定した。解析には Image J 1.40 ソフトウエアを用いた。

(8) *In vivo* 腫瘍形成能アッセイ

iCSSL-10A 細胞を PBS で 2 回 Wash し、0.1ml の無血清培地に懸濁し、等量のマトリゲルと

混合した後、6 週齢の BALB/c ノードマウス皮下に移植した。アッセイにはそれぞれ 12 匹のマウスを使用し、移植から 22 日後まで 2 日おきに腫瘍径を測定した。

(9)抗体

本研究には下記の抗体を使用した。anti-phospho-H2A.X、anti-Sox2 (Millipore, Billerica, MA, USA); anti-p53、anti-PARP (Cell Signaling Technology, Beverly, MA); anti-p21、anti-Slug、anti-Twist (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX); anti-p16、anti-Cyclin B1 (BD Biosciences, San Diego, CA); anti-Cyclin D1 (MBL International, Nagoya, Japan); anti-Nanog (ReproCELL, Yokohama, Japan); anti-b-actin and anti-Vinculin (SIGMA-Aldrich, St. Louis, MO)。

#### 4 . 研究成果

(1)Cdk-Pin1 経路を阻害する化合物の探索と同定

植物由来天然化合物ライブラリーの中から癌幹細胞の特性(自己複製能、未分化維持能)を阻害する薬剤のスクリーニングを行った。73 種類の化合物ライブラリーを用いて、細胞増殖・毒性(WST-8 assay)、分化誘導能(ALP assay)、自己複製能(Tumor sphere formation assay)を同時にモニターすることで候補化合物を選択した。その結果、天然化合物である Withaferin A(WA)が CSC において特異的に癌幹細胞の特性を阻害することが明らかとなった。そこで、WA 処理した CSC が具体的にどのような動態を示すかを詳細に調べた。まず WA が CSC の未分化性を抑制する最適濃度を ALP assay および WST-8 assay を用いて調べたところ、WA は 0.25 $\mu$ M で CSC の未分化性を抑制することがわかった。また、0.125 $\mu$ M 濃度で、コントロールと比較して自己複製能が半分以下の値を示すことが Tumor sphere formation assay の結果から明らかになった。細胞死を起こす濃度は 2 $\mu$ M であった。これら

のいずれの現象も WA の類似化合物である Withanone 、 Withanolide A 、 12-Deoxywithastramonolide では観察されなかった。

(2)WA は CSC の悪性化形質を抑制する  
次に、WA 処理した際の CSC の特性の変化について調べた。過去の研究から、フローサイトメーターを用いた解析において固形乳癌幹細胞は CD44+/CD24low に分布することが知られており、また iCSC-10A もほとんどの細胞が CD44+/CD24low に分布する。しかしながら、WA 処理後は CD44+/CD24low に分布する細胞が顕著に減少していた。また、WA 処理により未分化マーカーである ALDH1A1 および Nanog の発現が減少することが RT-PCR により示された。ウエスタンブロットにおいても未分化マーカーである SOX2 や Nanog、また EMT マーカーである Twist や Slug の発現減少が確認された。次に、matrigel-coated transwell assay および wound healing assay をおこなった結果、WA 処理により CSC の細胞浸潤能および運動能が顕著に阻害されることがわかった。さらに、WA 処理した CSC 細胞における in vivo 腫瘍形成能について調べた。1 $\mu$ M、1.5 $\mu$ M の WA を 72 時間処理した CSC およびコントロールとして DMSO を処理した CSC をそれぞれ Balb/c ノードマウスの皮下に移植し、腫瘍形成能を観察した。その結果、コントロールでは 20 日後に平均 160mm<sup>3</sup> 程度の腫瘍が形成されたのに対して 1.5 $\mu$ M の WA 処理ではほとんど腫瘍が形成されなかった。1 $\mu$ M の WA 処理では 22 日後に 40mm<sup>3</sup> 以下の腫瘍が一部のマウスに形成された。また 1.5 $\mu$ M の WA の処理時間を 0、1、24、48h と振って腫瘍形成能をみたところ、WA 処理 1h ではコントロールよりやや腫瘍径が小さく、24h ではコントロールと比較して半分以下の腫瘍径を示し、WA 処理 48h ではほとんど腫瘍が形成されていなかっ

た。

(3)WA は CSC において p21 の発現を誘導し細胞老化を引き起こす

次に WA が CSC の特性である未分化性や悪性化性質をどのように制御しているのか、そのメカニズムについて検討した。顕微鏡下で観察したところ、WA 処理した CSC は細胞老化に特徴的な表現型(扁平、肥大化、細胞内空胞の増加)を示していた。そこで、WA 処理した細胞を細胞老化マーカーである Senescence-associated

beta-galactosidase(SABG)およびリン酸化ヒストン H2A.X で染色したところ、いずれも陽性を示した。Comet assay では DNA 損傷は認められなかった。さらにウエスタンブロットの結果から、WA 処理後から 12 時間後にかけてサイクリン B の発現が一過性に上昇した後、急激に消失すること、また p21 の発現が WA 処理 12 時間後から徐々に増加することが明らかになった。一方で、pErk1/2 および pS6 の高発現は継続しており、サイクリン D1 の発現は 48 時間後に一過性増加が認められた。この現象は、細胞周期停止と細胞増殖シグナルが同時に活性化される逆説的な状況であり、これが原因で Geroconversion により細胞老化が引き起こされたことが示唆された。これらの結果から、WA は CSC の細胞老化を誘導することで、CSC の悪性化形質および腫瘍形成能を阻害することが示唆された。

(4)Cdk によりリン酸化される機能的タンパク質の同定

CSC において Cdk の標的となるリン酸化タンパク質を同定するため、iCSC-10A に Cdk 阻害剤である SU9516 処理した細胞上清およびコントロールとして DMSO 処理した細胞上清を用いて Pin1 を分子プローブに用いたリン酸化プロテオーム解析を試みた。GST タンパク質ビーズと混合し、予め Pin1 非結合タン

パク質を吸着した。次に、GST 吸着後の細胞上清を GST-Pin1 ビーズと混合し、Pin1 特異的に結合するタンパク質を抽出した。質量分析計を用いて数十種類のタンパク質を同定した。現在、これらのタンパク質が CSC の悪性化形質の発現や維持においてどのような機能や役割を果たすかについて検討中である。

#### 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 3件)

Nishi M, Ryo A. Development of an induced cancer stem cell model for drug discovery. *Can Cell & Microenviron*. 2015 Jan 1(6):e461. DOI: 10.14800/ccm.461. 査読有

Nishi M, Akutsu H, Kudoh A, Kimura H, Yamamoto N, Umezawa A, Lee SW, Ryo A. Induced cancer stem-like cells as a model for biological screening and discovery of agents targeting phenotypic traits of cancer stem cell. *Oncotarget*. 2014 Sep 30;5(18):8665-80. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4226712/>. 査読有

Nishi M, Sakai Y, Akutsu H, Nagashima Y, Quinn G, Masui S, Kimura H, Perrem K, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW, Ryo A. Induction of cells with cancer stem cell properties from nontumorigenic human mammary epithelial cells by defined reprogramming factors. *Oncogene*. 2014 Jan 30;33(5):643-52. DOI: 10.1038/onc.2012.614. 査読有

[学会発表](計 3件)

Mayuko Nishi, Akihide Ryo: Induction of cells with cancer stem cell properties from p53-deficient somatic cells. AACR-NCI-EORTC

International Conference, 2013 年 10 月 19-24 日, Boston (USA).

Mayuko Nishi, Yukiko Watanabe, Akihide Ryo: In vitro generation of cells with cancer stem-cell properties from human prostate epithelial cells. 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 3-5 日, パシフィコ横浜 (神奈川県).

Mayuko Nishi, Akihide Ryo: In vitro generation of cancer stem-like cells using iPS technology. The 6th International Symposium for Future Technology Creating Better Human Health and Society. 2013 年 2 月 7-8 日, 岡山大学 (岡山).

[その他]

ホームページ等

URL:<https://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~saikin/>

#### 6 . 研究組織

(1)研究代表者

西 真由子 (Nishi Mayuko)

横浜市立大学・医学研究科・特任助教

研究者番号：90635343