

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861185

研究課題名(和文)低酸素誘導因子による癌幹細胞制御システムの解明と新規治療ターゲットの検索

研究課題名(英文) Identification of hypoxia induced factor relating to cancer stemness and treatment resistance.

研究代表者

植村 守 (Uemura, Mamoru)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10528483

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)：低酸素下大腸癌細胞ではJMJD1A 発現上昇と、EMT変化を認め、癌細胞浸潤能亢進と抗癌剤耐性を認めた。JMJD1A抗体を用いた免疫沈降法により、低酸素下ではJMJD1A 発現亢進により、ヒストン構造変化により EMT inducer の転写活性化が起こっていた。JMJD1AはEMTの誘導を通じて治療抵抗性に関与している可能性が示唆された。また、低プロテアソーム活性が大腸癌幹細胞性や抗癌剤耐性/放射線治療耐性と関連しており、原因遺伝子としてEID3の関与を証明した。その他、低酸素誘導因子SCGB2A1が、抗癌剤/放射線耐性や癌幹細胞性と関連し、大腸癌患者の予後因子となることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In colorectal cancer cells, JMJD1A induced EMT, chemotherapy resistant ability, and aggressive invasion ability under hypoxic condition. CHIP assay using JMJD1A antibody revealed that histone modification caused activation of EMT inducers. JMJD1A induced EMT under a hypoxic condition and it may enhance drug resistance in CRC. Silencing JMJD1A may be an efficient molecular-targeted cancer therapy.

LPACs (low proteasome activity cells) of CRC cells had significant radioresistance and chemoresistance (5-FU and oxaliplatin). Cancer stemness of LPACs was confirmed by CSC marker, sphere formation assay, ROS activity analysis, cell cycle assay, and in vivo tumorigenicity examination. Microarray analysis identified EID3 (EP300 Interacting Inhibitor of Differentiation 3) as a key factor related to treatment resistance of LPACs. Functional analyses of EID3 and analysis using clinical samples confirmed the role of EID3 in LPACs.

研究分野：消化器外科

キーワード：大腸癌 低酸素 JMJD1A 低プロテアソーム活性 癌幹細胞 治療抵抗性 EMT 予後因子

## 1. 研究開始当初の背景

### 癌幹細胞とエピジェネティクス

癌幹細胞は癌を構築する階層構造の基盤細胞として幹細胞を産生していく能力を有し、抗癌剤や放射線療法に高い抵抗性を示す。そのため癌幹細胞分画の存在は癌の予後に直結しており、癌の根治を目指す上で、癌幹細胞の制御は不可欠である。近年、エピジェネティックな因子が非癌幹細胞の未分化関連遺伝子の活性化を誘導し癌幹細胞化しているという報告がなされ(Roesch A, *Cell*. 2010)、エピジェネティック制御機構が癌幹細胞性付与における中心的な役割を果たしていることが示唆されてきている。

### 低酸素応答と EMT ~ 癌幹細胞

癌の治療抵抗性/悪性度に関わる癌幹細胞以外の代表的な因子としては低酸素応答が挙げられる。癌組織内では血管新構築遅延や異常、組織内圧による血流不足のため低酸素領域が生じやすく、低酸素は癌の基本的環境である。低酸素応答として血管新生、代謝、増殖など多彩な遺伝子発現が調節を受け、腫瘍内低酸素応答が癌の悪性度や治療抵抗性に関わっている。また、低酸素と ES 細胞 (Ezashi T, *PNAS*. 2005) や組織幹細胞 (Parmar K, *PNAS*. 2007) との関連性が報告されているように、低酸素は幹細胞ニッチの重要な要素でもあるとされている。低酸素下の癌細胞と癌幹細胞には共通点が多く、従来より低酸素は癌幹細胞においても微小環境として重要な意義を持つ可能性が示唆されており、さらに近年、癌幹細胞と低酸素との直接の関連を示す報告がなされた (Mohyeldin A, *Cell Stem Cell*. 2010)。

一方、上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition: EMT) は癌の浸潤/転移に関わる特徴な現象であるが、最近、EMT が低酸素環境により誘導されることが報告された (Chen J, *BJC*. 2010)。また EMT が癌幹細胞性付与に直接的な関連性を持つことが分か

ってきており (Mani SA, *Cell*. 2008)、低酸素応答と癌幹細胞性付与との密な関連性を強く示唆していると考えられている。

### 低酸素応答とエピジェネティクス

細胞は低酸素下におかれた後、HIF family 制御下の早期低酸素応答が起き、それに続くエピジェネティックな制御機構により恒常的な低酸素に適応する細胞の性質が維持されていくのではないかと提唱されてきている (Watson JA, *Epigenetics*. 2012)。この様な状況の下、我々は、臨床材料を用い恒常的低酸素環境下の大腸癌細胞における低酸素応答を研究していく中で、ヒストン脱メチル化酵素である JMJD1A が低酸素下で誘導されることを明らかにし、さらにこれが大腸癌の増殖/浸潤に関わり予後マーカーとしても有用であることを明らかにした (Uemura M, *Clin Cancer Res*. 2010)。また、我々の先行実験のデータからも、恒常的低酸素下におけるエピジェネティックな制御機構が EMT のみならず、癌幹細胞性付与にも密接に関連していることが強く示唆されている。従って、恒常的低酸素下における癌幹細胞性付与に関する機構を明らかにすることにより、癌幹細胞産生メカニズムの解明とそれに立脚した癌の根治につながる新たな治療法の創出に多大なる貢献ができるものと期待される。

## 2. 研究の目的

癌の抗癌剤・放射線治療抵抗性や再発には、癌幹細胞の存在が関与していると考えられる。一方、低酸素は癌の基本的環境で、多くの研究がおこなわれてきたが、近年、低酸素による上皮間葉移行 (EMT) 誘導や、EMT による幹細胞性付与等の報告がなされてきており、低酸素と癌幹細胞との関連が注目されている。エピジェネティック制御がこの関係の中核に存在することが示唆されているが、詳しい制御機構は不明なままである。本研究ではこれらの機序に関わる因子及び標的遺伝子を解明し、制御することにより、癌

幹細胞の産出を抑制し癌の根治につながる新たな治療法を創出することを目標としている。

### 3. 研究の方法

・大腸癌細胞の低酸素下培養における JMJD1A 上昇と EMT との関連を検討し、さらに浸潤能や薬剤耐性との関連性を検討。  
・JMJD1A 抗体を用いた免疫沈降にてヒストン構造変化による EMT inducer の転写活性変化を検討。

・効率の良い大腸癌幹細胞分離による幹細胞性研究のため、低プロテアソーム活性(以下 LPA; low proteasome activity)に着目し、などの特性を調べるために、低プロテアソームを標識する imaging vector を利用し、LPA 状態の大腸癌細胞における癌幹細胞性を検討。

・LPA と大腸癌幹細胞性、治療抵抗性等を in vivo, in vitro 実験にて検討。

### 4. 研究成果

In vitro 実験において大腸癌細胞株を低酸素下で培養すると、継時的に有意に JMJD1A の上昇を認め、上皮性マーカーである E-cadherin が有意に減少、間葉性マーカーである Vimentin が上昇し、EMT を認めた。同時に invasion assay において低酸素下では通常酸素下と比較し、invasion 能の上昇を、さらには 5-FU、SN-38 の薬剤抵抗性がより増悪し

た。低酸素領域で誘導される JMJD1A 発現を JMJD1A- siRNA により抑制すると EMT は誘導されなかった。浸潤能、薬剤感受性においてコントロールと比較して改善が認められた。免疫沈降法にて JMJD1A 抗体で沈降させると EMT inducer である Snail、ZEB1、Slug の発現上昇を認めた。低酸素下では JMJD1A の発現が上昇し、ヒストン構造を変化させ、EMT inducer の転写活性を引き起こしている。JMJD1A 発現を抑制すると EMT が阻止され、治療抵抗

性が改善された。JMJD1A は EMT の誘導を通じて治療抵抗性に関与している可能性が示唆され、JMJD1A 発現を抑制することで治療感受性が亢進され、予後の改善が期待できると考えられた。

また、低酸素誘導因子による大腸癌の癌幹細胞性維持機構に関して検索していく中で、低プロテアソーム活性が Sphere formation の亢進に関わり、低プロテアソーム活性下の大腸癌細胞において各種の幹細胞マーカーが上昇しているなど、大腸癌幹細胞性と密接な関連性を示し、癌幹細胞の抗癌剤耐性(大腸癌治療における key drug である 5-Fu とオキサリプラチン)や放射線治療耐性に関与することが明らかとなった。これら、治療抵抗性にかかわる原因遺伝子として EID3 (EP300 Interacting Inhibitor of Differentiation 3)の関与を証明した。また、その他に低酸素誘導因子と癌細胞の治療抵抗性との因果関係を検索していく中で secretoglobin, family 2A, member 1 (SCGB2A1)の発現が、幹細胞関連遺伝子である Wnt、Zeb1、Twist の発現と関連性を示すことや、Sphere formation を亢進させるなど、癌幹細胞性と密接に関連していることが明らかとなった。さらに、in vitro 実験において抗癌剤耐性や放射線治療耐性とも関連性が証明できた。また、実際の大腸癌切除サンプルを用いた検討でも、SCGB2A1 高発現が大腸癌患者の予後因子となりうることを明らかにした。また、低酸素誘導遺伝子である ALDOA (aldolase A) に関しても SCGB2A1 と同様に治療抵抗性に関与し、大腸癌患者の予後因子となり得ることを明らかにした。

### 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 12 件)

1. Hiraki M, Nishimura J, Takahashi H, Wu X,

- Takahashi Y, Miyo M, Nishida N, Uemura M, et. al. Concurrent Targeting of KRAS and AKT by MiR-4689 Is a Novel Treatment Against Mutant KRAS Colorectal Cancer. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2015 Mar 10;4:e231. doi: 10.1038/mtna.2015.5.
2. Naito A, Yamamoto H, Kagawa Y, Naito Y, Okuzaki D, Otani K, Iwamoto Y, Maeda S, Kikuta J, Nishikawa K, Uemura M, et. al. RFPL4A increases the G1 population and decreases sensitivity to chemotherapy in human colorectal cancer cells. *J Biol Chem*. 2015 Mar 6;290(10):6326-37. doi: 10.1074/jbc.M114.614859
  3. Nonaka R, Nishimura J, Kagawa Y, Osawa H, Hasegawa J, Murata K, Okamura S, Ota H, Uemura M, et. al. Circulating miR-199a-3p as a novel serum biomarker for colorectal cancer. *Oncol Rep*. 2014 Dec;32(6):2354-8. doi: 10.3892/or.2014.3515.
  4. Hamabe A, Yamamoto H, Konno M, Uemura M, et. al. Combined evaluation of hexokinase 2 and phosphorylated pyruvate dehydrogenase-E1 $\alpha$  in invasive front lesions of colorectal tumors predicts cancer metabolism and patient prognosis. *Cancer Sci*. 2014 Sep;105(9):1100-8. doi: 10.1111/cas.12487.
  5. Wada H, Yamamoto H, Kim C, Uemura M, et. al. Association between ephrin-A1 mRNA expression and poor prognosis after hepatectomy to treat hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*. 2014 Sep;45(3):1051-8. doi: 10.3892/ijo.2014.2519.
  6. Munakata K, Uemura M, et. al. SCGB2A1 is a novel prognostic marker for colorectal cancer associated with chemoresistance and radioresistance. *Int J Oncol*. 2014 May;44(5):1521-8. doi: 10.3892/ijo.2014.2316.
  7. Ogino T, Nishimura J, Barman S, Kayama H, Uematsu S, Okuzaki D, Osawa H, Haraguchi N, Uemura M, et. al. Increased Th17-inducing activity of CD14<sup>+</sup> CD163<sup>+</sup> low myeloid cells in intestinal lamina propria of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2013 Dec;145(6):1380-91.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2013.08.049.
  8. Suzuki R, Yamamoto H, Ngan CY, Ohtsuka M, Kitani K, Uemura M, et. al. Inhibition of angiotensin 2 attenuates lumen formation of tumour-associated vessels in vivo. *Int J Oncol*. 2013 Nov;43(5):1447-55. doi: 10.3892/ijo.2013.2076.
  9. Ohtsuka M, Yamamoto H, Oshiro R, Takahashi H, Masuzawa T, Uemura M, et. al. Concurrent expression of C4.4A and Tenascin-C in tumor cells relates to poor prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2013 Aug;43(2):439-46. doi: 10.3892/ijo.2013.1956.
  10. Haraguchi N, Ishii H, Mimori K, Ohta K, Uemura M, et. al. CD49f-positive cell population efficiently enriches colon cancer-initiating cells. *Int J Oncol*. 2013 Aug;43(2):425-30. doi: 10.3892/ijo.2013.1955.
  11. Ohtsuka M, Yamamoto H, Masuzawa T, Takahashi H, Uemura M, et. al. C4.4A expression is associated with a poor prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2013 Aug;20(8):2699-705. doi: 10.1245/s10434-013-2900-2.
  12. Ohta K, Haraguchi N, Kano Y, Kagawa Y, Konno M, Nishikawa S, Hamabe A, Hasegawa S, Ogawa H, Fukusumi T, Uemura M, et. al. Depletion of JARID1B induces cellular senescence in human colorectal cancer. *Int J Oncol*. 2013 Apr;42(4):1212-8. doi: 10.3892/ijo.2013.1799.
- 〔学会発表〕(計 3 件)  
 発表者：宗方幸二、植村守、西村潤一、畑泰司、竹政伊知朗、水島恒和、山本浩文、土岐祐一郎、森正樹  
 題名：大腸癌における低プロテアソーム活性と治療抵抗性  
 学会名：第 72 回日本癌学会学術総会  
 発表年月日：2013/10/3  
 発表場所：神奈川
- 発表者：宮崎進、山本浩文、原口直紹、植村守、西村潤一、畑泰司、竹政伊知朗、水島恒和、土岐祐一郎、森正樹  
 題名：ヒストン修飾による大がん治療抵抗性における JMJD1A の意義  
 学会名：第 113 回 日本外科学会定期学術集会  
 発表年月日：2013/4/11  
 発表場所：福岡
- 発表者：Miyazaki S, Yamamoto H, Hiraki M, Uemura M, Haraguchi N, Nishimura J, Hata T, Takemasa I, Mizushima T, Doki Y, Mori M  
 題名：Role of JMJD1A in hypoxia-induced EMT and therapeutic resistance in colorectal cancer  
 学会名：Ninth AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference: Breakthroughs in Basic and Translational Cancer Research  
 発表年月日：2013/2/11  
 発表場所：Mau i ,USA
- 〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

植村 守 (Uemura Mamoru)

大阪大学大学院医学系研究科消化器外科

学 助教

研究者番号：10528483

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：