

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：82601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670041

研究課題名(和文) ユビキチンリガーゼCHIPによる乳癌幹細胞の制御機構の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Regulation of breast cancer stem cells by E3 ubiquitin ligase CHIP and new anti-cancer drug development

研究代表者

諫田 泰成 (Kanda, Yasunari)

国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・室長

研究者番号：70510387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌は癌幹細胞により形成されると考えられるが、未だ癌幹細胞を標的とする治療薬は実現していない。本研究では、ALDH陽性の癌幹細胞モデルの遺伝子解析により、癌幹細胞の新規標的分子としてCHIPを明らかにした。CHIPのノックダウンによりALDH陽性細胞が増加し、逆にCHIP過剰発現により減少したことから、CHIPは癌幹細胞を負に制御することが示唆された。次に、CHIP発現を上昇する化合物により、濃度依存的にALDH陽性細胞の増殖が抑制された。さらに、CHIPによる制御機構を明らかにするため、現在、CHIPの基質の探索を進めている。以上により、CHIPによる乳癌幹細胞の増殖制御を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Growing evidence suggest that breast cancer is originated form a minor population which is called cancer stem cells (CSCs). However, there is no agent for CSCs. Here, using microarray screening in aldehyde dehydrogenase (ALDH)-positive CSC model, we identified a novel role for a CHIP/Stub1 ubiquitin ligase in breast CSC regulation. Knockdown of CHIP increased ALDH-positive cells in MCF-7 cells. In contrast, overexpression of CHIP reduced ALDH-positive cells. These data suggest that CHIP negatively regulate breast CSCs. We next examined the effect of compounds that increase expression levels of CHIP. The compound decreased the proportion of ALDH-positive cells in MCF-7 cells. Since knockdown of CHIP did not affect the target gene for the stem cell signaling pathway (Notch, Hedgehog, and Wnt), CHIP is considered to regulate other stem cell target. Taken together, our findings suggest a novel target of CHIP in breast CSCs. CHIP might be a target for drug development against breast cancer.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：乳癌 癌幹細胞 ユビキチンリガーゼ 薬剤耐性 創薬

1. 研究開始当初の背景

女性の乳癌罹患率は胃癌を超え現在第1位である。罹患率・死亡率ともに上昇傾向にあり、乳癌の克服は社会的に見ても極めて重要な課題である。現在、乳癌の治療にはエストロゲン受容体等を標的とした医薬品が使用されているが、抗癌剤による治療には限界があり、長期投与による薬剤抵抗性など解決すべき課題が残されている。

近年の研究により、既存の薬剤に対して抵抗性を示す「癌幹細胞」(または腫瘍始原細胞とも呼ばれる)が存在し、薬剤による治療後も数パーセントの癌幹細胞が残存して癌が再発・転移することが明らかになってきた。癌幹細胞は、正常組織における幹細胞と同様に、未分化状態で増殖する「自己複製能」と多様な細胞を生み出す「多分化能」を有する細胞と定義される。癌の治療の際、薬剤や放射線、外科手術などにより多くの癌細胞を除去できるが、治療抵抗性が高い非常にわずかな癌幹細胞が残存してしまうと癌の再発や転移がおこると考えられる。従って、癌幹細胞を標的とした創薬や診断法の開発が急務である。

癌幹細胞は細胞数が少なく同定・単離が困難であり、その実体が不明であった。現在は、細胞表面抗原、スフィアと呼ばれる細胞塊を形成する方法、薬剤排出能を利用する方法(SP細胞)、細胞内アルデヒド脱水素酵素(ALDH)の酵素活性を利用する方法など様々な技術開発により癌幹細胞を同定あるいは濃縮できるようになりつつある。しかしながら、癌幹細胞の増殖制御機構など明らかになっていない点も多く、癌幹細胞の増殖を選択的に抑制できるような治療薬もいまだ開発されていない。

2. 研究の目的

本研究において、ヒト乳癌細胞株から乳癌幹細胞のモデル細胞を作製し、自己複製を誘導するシグナル経路の検討を行う。特に、エストロゲンによって乳癌幹細胞の増殖が誘導されることから、エストロゲン受容体に結合する分子に着目して、乳癌幹細胞の増殖の関連を検討した。

本研究では、癌幹細胞を負に制御する分子としてCHIPユビキチンリガーゼを新たに見出した。CHIPは新たな乳癌治療薬の標的分子として期待される。

3. 研究の方法

1) 細胞培養

ヒト乳癌細胞株 MCF-7 あるいは MDA-MB-231 (ATCC より購入) は、10%FBS を添加した DMEM 培地で培養した。

2) ALDH 染色

MCF-7 あるいは MDA-MB-231 細胞を用いて、Aldefluor アッセイキット (Stem Cell Technologies) により染色を行った。具体的には、ALDH 酵素の蛍光基質である BODIPY-aminoacetaldehyde (BAAA) を細胞に取り込ませて 37 °C で 30 分間培養したあと、ALDH による代謝産物 BAA の蛍光を FACS Aria II (BD Bioscience) により解析した。ALDH 選択的阻害剤である diethylaminobenzaldehyde (DEAB) の存在下で BAA による蛍光が認められないことを確認した。

2) SP アッセイ

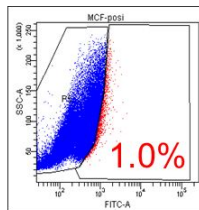
MCF-7 細胞を用いて、SP アッセイを行った。具体的には、Hoechst 33342 を細胞に取り込ませて UV レーザー (407nm) で細胞を照射し、放出される蛍光を Hoechst Blue および Hoechst Red により展開した。ABC トランスポーター阻害剤で消失する細胞分画を SP 細胞とした。

4. 研究成果

1) ヒト乳癌細胞株を用いた ALDH 陽性細胞の割合

我々は転移能の異なるヒト乳癌細胞株を用いて ALDH 染色を行った。その結果、MCF-7 細胞には約 1%、MDA-MB-231 細胞には約 2%の ALDH 陽性細胞が存在することを明らかにした。

非転移株
MCF-7



高転移株
MDA-231

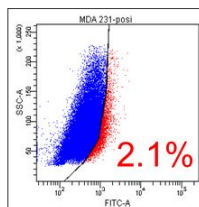


図 1. MCF-7 細胞、MDA-MD-231 細胞における ALDH 陽性細胞の割合

2) 乳癌幹細胞株の ALDH 陽性細胞の割合を指標としたシグナル分子の探索

癌幹細胞の増殖を誘導するホルモンを探索したところ、エストロゲンによって増殖されるが、プロゲステロンなどでは増殖が誘導されなかった。過去の報告により、エストロゲンの下流で PI3 キナーゼを介して増殖制御されることが報告されているので (PNAS 2009, 107, 21737-21742) エストロゲン受容体に結合する分子の中から負に制御する因子の探索を行った。ALDH 陽性細胞において親細胞よりも発現が低い分子に焦点を当てて探索したところ、新たに CHIP ユビキチンリガーゼを見出した。

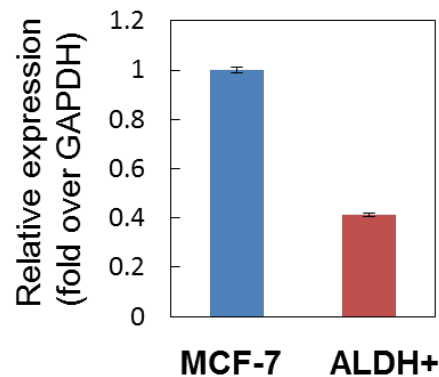


図 2. ALDH 陽性細胞における CHIP の発現
MCF-7 細胞から ALDH 陽性細胞をソートして、ER 結合する分子の中から陽性細胞に発現が低い分子を探索した。

次に、MCF-7 細胞の CHIP ユビキチンリガーゼのノックダウンを行った。その結果、ALDH 陽性細胞が増加した。一方、もともと陽性の細胞の割合の多い MDA-MB-231 細胞に関しては、CHIP を過剰発現することにより ALDH 陽性細胞の増加が観察された。

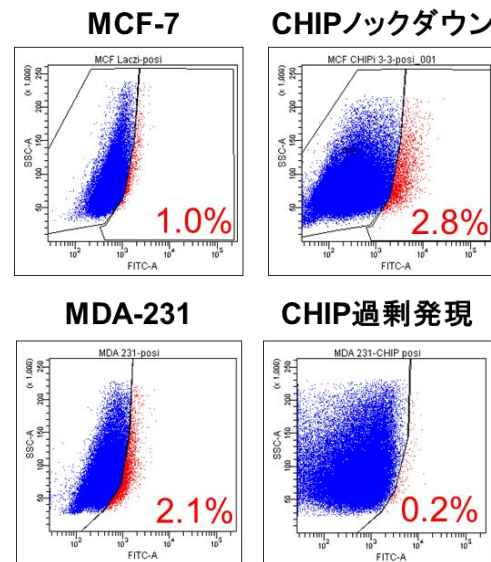


図 3. CHIP と ALDH 陽性細胞の関連
MCF-7 細胞の CHIP をノックダウンすると ALDH 陽性細胞が増加した。逆に MDA-MB-231 細胞に CHIP を過剰発現すると ALDH 陽性細胞が減少した。

さらに、ALDH アッセイの結果を確認するために、別の癌幹細胞のアッセイである SP アッセイを行った。その結果、ALDH の結果と同様に、CHIP のノックダウンにより SP 細胞の増加が認められた。従って、CHIP が癌幹細胞を負に制御することが示唆された。

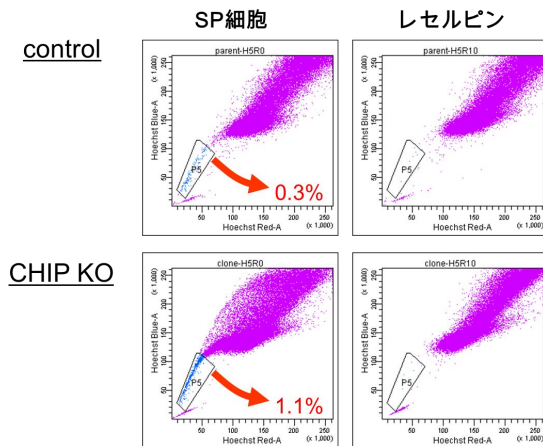


図 4. CHIP と SP 細胞の関連

CHIP ノックダウンにより SP 細胞の増加が認められた。

3) 乳癌幹細胞に対する CHIP を標的とした化合物の影響

過去の報告にもとづき、CHIP 発現を亢進させる化合物の探索を行った。その結果、いくつかの化合物が ER 陽性の乳癌細胞において CHIP タンパク質の発現を有意に増加させることを見いだした。

さらに、化合物 A を用いて、MCF-7 細胞の ALDH アッセイを行った結果、ALDH 陽性細胞の割合が濃度依存的に顕著に抑制された (n=2)。一方、既存のエストロゲン受容体アンタゴニストであるタモキシフェンではこのような作用は認められなかった (data not shown)。

従って、CHIP ユビキチンリガーゼは乳癌幹細胞の新規標的分子となる可能性が示唆された。

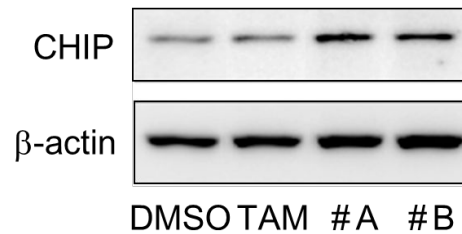


図 5. 化合物による MCF-7 細胞における CHIP 発現亢進

化合物 A あるいは B (1 μ M、48 時間) の処理により CHIP 発現が増加した。同じ濃度のタモキシフェン (TAM) では作用は認められなかった。

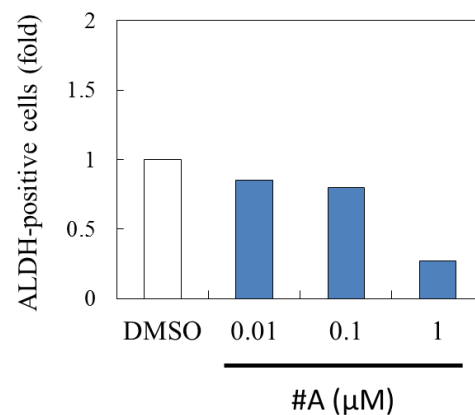


図 6. ALDH 陽性細胞の割合に対する化合物の影響

MCF-7 細胞に化合物 A を添加して、96 時間後に ALDH アッセイを行った (n=2)。

4) CHIP ユビキチンリガーゼによる乳癌幹細胞の増殖制御

CHIP ユビキチンリガーゼの下流で作用する幹細胞シグナルの探索を行った。既存の幹細胞シグナルである Notch, Hedgehog, Wnt などの標的遺伝子はいずれも影響されなかった。この結果から、CHIP により従来のシグナルとは異なる新たな幹細胞シグナルが存在すると考えられた。

そこで、CHIP ユビキチンリガーゼの基質の探索を試みた。既報の中から CHIP

の基質の候補となる分子を調べて、過剰発現により ALDH 陽性細胞の割合が増加する分子を探索した。しかしながら、調べた範囲では、CHIP の基質と考えられる分子は特定できなかった。現在、異なるアプローチとしてタンパク質の網羅的な解析を進めて、ALDH 陽性細胞において発現が多いタンパク質の検討を行っている。基質の同定により、新たな癌幹細胞の制御機構の解明につながると考えられ、将来的治療薬の開発などが期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

1. Hirata N., Yamada S., Shoda T., Kurihara M., Sekino Y., and Kanda Y.* Sphingosine-1-phosphate regulates cancer stem cell phenotype via Notch signaling. *Nature Communications* 5:4806 (2014). *C.A.
 2. Hiyoshi H., Goto N., Tsuchiya M., Iida K., Nakajima Y., Hirata N., Kanda Y., Nagasawa K., Yanagisawa J. YL-109 is a novel antitumor agent suppressing triple-negative breast cancer progression by inducing ubiquitin ligase CHIP. *Scientific Reports* 4:7095 (2014).
 3. Tsuchiya M, Nakajima Y, Hirata N, Morishita T, Kishimoto H, Kanda Y., Kimura K. Ubiquitin ligase CHIP suppresses cancer stem cell properties in a population of breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 452:928-32 (2014).
 4. Demizu Y, Misawa T, Nagakubo T, Kanda Y., Okuhira K, Sekino Y, Naito M, Kurihara M. Structural development of stabilized helical peptides as inhibitors of estrogen receptor (ER)-mediated transcription. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 23:4132-8 (2015).
5. 平田尚也、諫田泰成：癌幹細胞の解析モデルと創薬への応用、**CBI 学会誌**、3:10-14 (2015).
- 〔学会発表〕(計16件)
1. Yasunari Kanda: S1P induces proliferation of cancer stem cells via a ligand-independent Notch activation. FASEB, Banff, 2015.08.25
 2. 諫田泰成：リゾリン脂質による乳癌幹細胞の増殖制御と創薬応用、第136回日本薬学会シンポジウム、2016.03.28
 3. 諫田泰成：GPCR によるリガンド非依存的な Notch シグナルの活性化機構、BMB2015 (第38回日本分子生物学会、第88回日本生化学会の合同大会) ワークショップ、神戸、2015.12.02
 4. 平田尚也、関野祐子、諫田泰成：リゾフォスファチジン酸はトリプルネガティブ乳癌幹細胞の増殖を誘導する、第89回日本薬理学会年会、バシフィコ横浜、東京、2016.03.09
 5. 平田尚也、関野祐子、諫田泰成：スフィンゴシン1リン酸による Notch3 を介したグリオーマ幹細胞の増殖、第133回日本薬理学会関東部会、2015.10.10
 6. 平田尚也、諫田泰成：前立腺癌幹細胞に対するスフィンゴシン1リン酸の機能、第74回日本癌学会学術総会、名古屋、2015.10.08
 7. 平田尚也、山田茂、出水庸介、栗原正明、関野祐子、諫田泰成：エストロゲンによる NO を介した乳癌幹細胞の増殖機構、第132回日本薬理学会関東部会、2015.07.04
 8. Naoya Hirata, Yosuke Demizu, Masaaki

- Kurihara, Yuko Sekino, Yasunari Kanda. Estrogen induces proliferation of breast cancer stem cells via NO/sGC/cGMP signaling pathway. 第 13 回幹細胞シンポジウム、東京、2015.05.29
9. 平田尚也、関野祐子、諫田泰成：スフィンゴシン 1 リン酸受容体 S1PR3 を介したグリオーマ幹細胞の増殖、第 14 回再生医療学会、横浜、2014.03.21
 10. 諫田泰成：スフィンゴシン 1 リン酸による癌幹細胞の新たな増殖制御機構、第 88 回日本薬理学会シンポジウム、名古屋、2015.03.20
 11. 平田尚也、関野祐子、諫田泰成：S1P 刺激によって前立腺癌幹細胞の増殖が誘導される、第 88 回日本薬理学会、名古屋、2015.03.19
 12. 平田尚也、関野祐子、諫田泰成：前立腺癌幹細胞の増殖に対するスフィンゴシン 1 リン酸の影響、第 37 回日本分子生物学会、横浜、2014.11.25
 13. 平田尚也、山田茂、正田卓司、栗原正明、関野祐子、諫田泰成：A novel role of sphingosine-1-phosphate receptor in proliferation of breast cancer stem cells. CBI 学会 2014 年大会、東京、2014.10.28 (最優秀ポスター賞受賞)
 14. 平田尚也、山田茂、正田卓司、栗原正明、関野裕子、諫田泰成：スフィンゴシン 1 リン酸と Notch のクロストークによる乳癌幹細胞の増殖機構、第 131 回日本薬理学会関東部会、2014.10.11 (若手優秀発表賞受賞)
 15. 平田尚也、諫田泰成：グリオーマ幹細胞の増殖に対するスフィンゴシン 1 リン酸の影響、第 73 回日本癌学会、横浜、2014.09.25
 16. 平田尚也、山田茂、関野祐子、諫田

泰成：Sphingosine-1-phosphate induced cancer stem cell proliferation via a ligand-independent Notch activation. 第 12 回幹細胞シンポジウム、九州、2014.05.20

〔図書〕(計 1 件)

1. 諫田泰成：癌幹細胞の創薬応用、技術情報協会 (2016).

〔産業財産権〕
なし

〔その他〕
ホームページ等
薬理部第二室

<http://www.nihs.go.jp/phar/lab/lab2.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

諫田 泰成 (Kanda, Yasunari)

国立医薬品食品衛生研究所

薬理部第二室・室長

研究者番号：70510387

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし