

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861065

研究課題名(和文) ヒト胃癌細胞における癌幹細胞様細胞への形質転換とPAR1の関連

研究課題名(英文) PAR1 signaling deeply participates in the ability of multidrug resistance and tumorigenesis in cancer stem-like cell by controlling Hippo-YAP pathway

研究代表者

藤本 大裕 (FUJIMOTO, DAISUKE)

福井大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50646354

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)：PAR1シグナルとHippo-YAPシグナルの関連を胃癌幹細胞様細胞にて調べた。胃癌細胞において、PAR1シグナルで癌幹細胞が多数含まれるside population細胞が増加し、腫瘍形成能、多剤耐性、細胞形態の変化、浸潤能の増強を認めた。PAR1シグナルは、Hippo-YAPシグナルにおけるLats酵素を、Rhoを介して抑制することで、YAPのリン酸化を抑制し、YAPの核内移行を誘導した。また、PAR1シグナルにて誘導される上皮間葉転換に、Hippo-YAPシグナルが関与していた。

研究成果の概要(英文)：We reveal a connection between the Protease-activated receptor 1 (PAR1) signaling pathway and the Hippo-YAP pathway in gastric cancer stem-like cells. The selective PAR1 agonist TFLLR-NH2 induces an increase in the fraction of side population cells which is enriched in CSCs, and promotes tumorigenesis, multi cancer drug resistance, cell morphological change, and cell invasion which are characteristics of CSCs. In addition, PAR1 activation inhibits the Hippo-YAP pathway kinase Lats via Rho GTPase. Lats kinase inhibition in turn results in increased nuclear localization of dephosphorylated YAP. Furthermore, PAR1 activation confers CSCs related traits via the Hippo-YAP pathway, and the Hippo-YAP pathway plays a role in epithelial mesenchymal transition which is induced by PAR1 activation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：胃癌 PAR1 Hippo-YAPシグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍を構成する癌細胞は、等しく腫瘍形成能を有しているわけではなく、形成能を有する細胞と、有さない細胞から成り立っているとの仮説がある。形成能を有する細胞は癌幹細胞と考えられ、近年注目される研究分野であり、癌治療におけるパラダイムチェンジを引き起こしている。癌幹細胞は腫瘍内に存在し、自己複製能と多分化能を併せ持つ細胞であり、放射線や化学療法治療に対する抵抗性や再発・転移への関与が強く示唆される。癌幹細胞と分化した様々な癌細胞を含む細胞集団から癌幹細胞を濃縮・分離するために様々な方法が用いられてきたが、癌幹細胞のみで構成される細胞集団を細胞株として樹立・維持することは困難であった。

side population(sp) 細胞は、DNA 結合色素である Hoechst 33342 で細胞染色を行った際に Bcrp1(Abcg2) を介して Hoechst を排出し、FACS で蛍光の低輝度を示す細胞で、この細胞は高頻度に幹細胞様細胞 (cancer stem like cell:CSLC) を含んでおり、様々な組織から幹細胞様細胞を同定・分離することが容易となってきた。この sp 細胞は、その他の CSLC と比較して腫瘍形成能や転移能が高いといわれており、これらの細胞が従来の化学療法に対しても強い抵抗性を示すことも、その理由と考えられている。

2. 研究の目的

乳癌での浸潤や腫瘍形成能に関する報告がされている。Protease-activated receptor-1(PAR1) に注目し、ヒト胃癌細胞における増殖・浸潤や EMT 様の形態変化について報告してきた。その研究過程で、PAR1 transfected MKN45 細胞(MKN45/PAR1)において、PAR1 を agonist である -thrombin にて活性化させることで、sp 細胞分画の割合が増加することを突き止めている。

MKN74 と si-RNA で PAR1 発現を抑制した MKN74/PAR1(-) 細胞、および MKN45/mock と MKN45/PAR1 細胞を PAR1 agonist で処理してからヌードマウスの腹腔内に接種させた際に、腫瘍結節形成に有意な差を認め、PAR1 と癌幹細胞様細胞との関連を強く示唆させる

結果を得てきた。そこで消化器癌、国内患者死亡数 1 位の胃癌において、PAR1 活性化により癌細胞の形質転換の trigger となり、より悪性度の高い CSLC へと誘導していると考え、PAR1 とヒト胃癌細胞における CSLC への形質転換との関連を解析し、治療抵抗性を示し、再発・転移巣の形成能を有する癌幹細胞の根治療法を開発する糸口を見出すことで新たな癌治療を示すことが目的である。

3. 研究の方法

(1) PAR1 agonist 処理を行ったヒト胃癌細胞における sp 細胞分画の割合変化の検討

確立している MKN45/PAR1 細胞と PAR1 タンパク発現細胞株である MKN74 細胞を用いて、sp 細胞の分画割合の変化を FACS を用いて検討する。コントロールは MKN45/mock 細胞を用いる。

(2) 薬剤抵抗性試験

胃癌治療における key drug である 5-FU, CDDP, Paclitaxel を一定条件で添加した培養液を用いて細胞を培養し、24 時間後に細胞数をカウントおよび MTT assay を行い、薬剤抵抗性について解析を行う。

(3) ABC transporter の発現の解析薬剤抵抗性の獲得に強く関与する ABC transporter で P-gp である ABCG2, MRP1, MDR2 のタンパク発現を細胞より抽出したタンパクを用いて western-blotting 法で検討を行う。

(4) 限界希釈法による in vitro での腫瘍原性能の検討

様々な細胞数で 96 穴プレートに播種し、無血清培地内で 4 日間培養。Sphere が形成されていない well の割合を計測する。

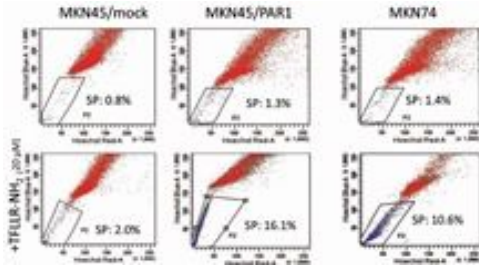
(5) signaling pathway のクロストークの解析

ヒト胃癌細胞において Hippo signaling pathway と PAR1 のクロストークに関わる因子として基底膜に局在する、Scrib/Lgi/Dlg 複合体を候補と考え、これらの局在や不活化を解析し、PAR1 と CSLC への形質転換への関連因子を検討する。

4. 研究成果

(1) sp 細胞の分離・抽出

PAR1 活性により MKN45/PAR1 および MKN74 細胞の sp 細胞分画の増加を認めた.



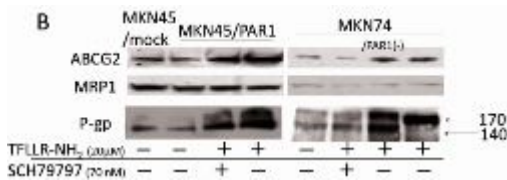
(2) 薬剤抵抗性試験

PAR1 活性により薬剤抵抗性を獲得していた.



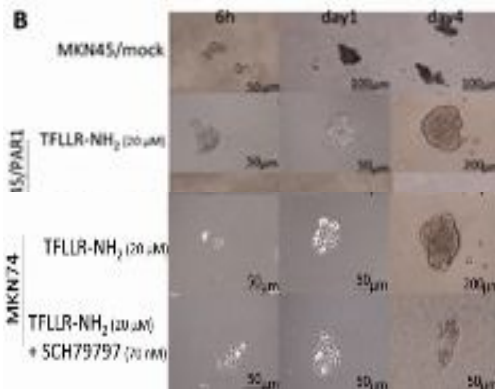
(3) ABC transporter 発現の検討

western blot により, PAR1 活性にて ABC transporter である ABCG2, MRP1, MDR2 の発現の増加を認めた.



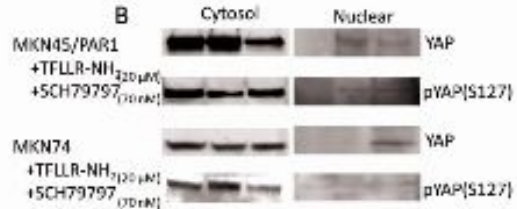
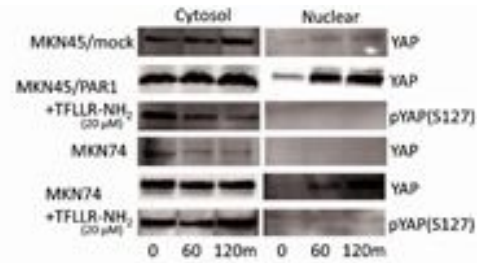
(4) sphere 形成

PAR1 活性で sphere 形成を確認した.



(5) signaling pathway のクロストーク

PAR1 活性にて LTAS のりん酸化が抑制され、そのことで、YAP のりん酸化も抑制され、YAP の核内移行が誘発されている.



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)

Daisuke Fujimoto, Yuki Ueda, Yasuo Hirono, Takanori Goi, Akio Yamaguchi. PAR1 participates in the ability of multidrug resistance and tumorigenesis by controlling Hippo-YAP pathway. (査読有) Oncotarget, 6(33)・34788-34799:2015,10 DOI: 10.18632/oncotarget.5858

[学会発表](計4件)

Daisuke Fujimoto, Yasuo Hirono, Takanori Goi, Akio Yamaguchi.

Protease-activated receptor-1 signaling deeply participates in the ability of tumorigenesis by controlling hippo-yap pathway.

23rd United European Gastroenterology Week

2015,10,24-28

Fira de Barcelona(Barcelona,Spain)

Tadayoshi Otsuki, Daisuke Fujimoto, Mitsuhiro Morikawa, Kenji Koneri, Makoto Murakami, Yasuo Hirono, Takanori Goi, Akio Yamaguchi.

Thrombin induces human gastric cancer cell to epithelial-mesenchymal transition

through par1 activation.
23rd United European Gastroenterology
Week
2015,10,24-28
Fira de Barcelona(Barcelona,Spain)

藤本大裕 ,上田有紀 ,廣野靖夫 ,五井孝憲 ,
山口明夫 .
ヒト胃癌細胞における Hippo-YAP patway と
Protease-activated receptor 1 の関連.
第 74 回日本癌学会学術総会
2015,10,8-10
名古屋国際会議場(名古屋)

Daisuke Fujimoto ,Yuki Ueda ,Yasuo Hirono ,
Takanori Goi ,Akio Yamaguchi .
Potential of PAR1 to be involved in the
acquisition of drug resistance in human
gastric cancer cell .
2015 ASCO Annual Meeting
2015,1,15-17
Moscone West Building(San Francisco,
California)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

藤本 大裕 (FUJIMOTO,DAISUKE)
福井大学・医学部附属病院・助教
研究者番号 : 50646354