

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22112004

研究課題名（和文）がん幹細胞と微小環境の相互作用の解明とその分子機構を標的とした治療法開発

研究課題名（英文）Analysis of the interaction between cancer stem cells and their microenvironment.

研究代表者

秋山 徹（Aiyama, Tetsu）

東京大学・分子細胞生物学研究所・教授

研究者番号：70150745

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 248,300,000 円

研究成果の概要（和文）：1）膠芽腫幹細胞の造腫瘍性にPCDH10、PCDH17、PTPRD、SOX9、LGR5、ALK、Pleiotrophin、TET1が重要であることを明らかにした。2）血管内皮細胞の発現するNotchリガンドDLLが、大腸がん細胞のNotch-Asef経路を活性化することを明らかにした。3）TET1によりヒドロキシメチル化されたシトシンにCHTOPが結合してメチロソーム複合体をリクルートし、がん化に重要な遺伝子群の発現を促進することを明らかにした。4）大腸がん細胞の造腫瘍性に重要な新規non-coding RNA CASCA、RNA-Y、UPAT、MYUを見出し機能を解析した。

研究成果の概要（英文）：We have identified and characterized genes involved in the tumorigenicity of glioblastoma and colon cancer cells and obtained the following results:

1) PCDH10, PCDH17, PTPRD, SOX9, LGR5, ALK, Pleiotrophin and TET1 play important roles in the tumorigenicity of glioblastoma cells. 2) Endothelial DLL4 induces Notch3-Asef pathway-mediated cell migration. 3) TET1-mediated production of 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) is required for the tumorigenicity of glioblastoma cells. 5hmC recruits the CHTOP-methylosome complex to selective sites on the chromosome, where it methylates H4R3 and activates transcription of cancer-related genes.

研究分野：がん微小環境

キーワード：微小環境 がん がん幹細胞 造腫瘍性 non-coding RNA hydroxymethyl化

1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞が微小環境と相互作用して自己複製・分化する分子機構を明らかにし、分子標的薬を開発するための基礎研究を行う。これまでに、ヒト神経膠芽腫および大腸がん検体から単離・培養したがん幹細胞に、RNAi ライブラリーを導入し、CD133、Nestin、Lgr5 などのがん幹細胞マーカーの発現変化を指標にがん幹細胞性に重要と思われる遺伝子を同定してきた。さらに、これらの遺伝子をノックダウンしたがん幹細胞を SCID マウスに移植して、造腫瘍性に重要な遺伝子を選別し、Notch、bFGF (FGF-2) シグナル関連因子や機能未知の一回膜貫通蛋白質、7 回膜貫通蛋白質などをコードする遺伝子が腫瘍形成に必須であることを明らかにした。本研究では、同様の検索を継続すると同時に、これまでに同定された蛋白質の腫瘍形成における役割を微小環境との相互作用に着目して解析する。特に、これまでに見出したがん幹細胞の造腫瘍性に関わる遺伝子の中には、上述のように機能未知の新たな遺伝子が含まれていることから、がん化に重要な新規の細胞間および細胞内シグナル伝達経路が見出される可能性がある。さらに、我々の見出した膜蛋白質やリガンドを標的としたモノクローナル抗体、アンタゴニストを創製することにより、全く新しいがんの治療法の開発へと発展することが期待される。

2. 研究の目的

最近の研究により、がん組織中のがん細胞は均一でなく、がん幹細胞と呼ばれるごく一部の細胞のみが強い造腫瘍性をもつことが明らかとなり注目を集めている。がん幹細胞は、自己複製能と分化能をもち、抗がん剤や放射線に耐性で、がんの再発や転移の元凶であると考えられている。したがって、がん幹細胞の実体を明らかにし、

これを標的とした治療法を開発することは現在のがん研究の最も重要な課題の一つであると考えられる。一方、腫瘍の増殖は周辺の微小環境との相互作用に大きく依存していることが明らかになってきている。そこで、大腸がんや脳腫瘍のがん幹細胞について、その造腫瘍性、幹細胞性 (stemness) を維持する分子機構を RNAi ライブラリーを用いて系統的に明らかにし、さらにこれらのがん幹細胞の造腫瘍性、幹細胞性を微小環境細胞との相互作用の面から検討し、がん幹細胞を標的とした新たな治療法の開発のための基礎的知見を得ることを目的として研究を進める。

既に我々は、大腸がんや脳腫瘍のがん幹細胞に RNAi ライブラリーを導入し、がん幹細胞マーカー CD133、Nestin、Lgr5 の発現変化を指標にして幹細胞性に関与する可能性のある遺伝子を同定してきた。さらにこれらの遺伝子をノックダウンしたがん幹細胞を SCID マウスに移植して、造腫瘍性に重要な遺伝子を同定した。本研究では、同様の検索を継続すると同時に、これまでに同定された各種シグナル伝達関連因子や機能未知の膜蛋白質や転写因子の腫瘍形成における役割を微小環境との相互作用に着目して解析する。

3. 研究の方法

(1) がん幹細胞の幹細胞性、造腫瘍性に重要な遺伝子の検索。Lee らの方法 (Cancer Cell 9, 391-403, 2006) に基づいてヒト神経膠芽腫および大腸がん検体を無血清、EGF、bFGF 存在下で培養し、がん幹細胞に富む sphere に RNAi ライブラリーを導入して、がん幹細胞マーカーである CD113、Nestin および Lgr5 の発現を指標にがん幹細胞の幹細胞性に重要な遺伝子を選別する。さらにレンチウイルスを用いて shRNA を発現することにより標的遺伝子の発現を抑制したがん幹細胞を SCID

マウスに移植し、造腫瘍性に重要な遺伝子を同定する。

(2)上記のスクリーニングによりこれまでに同定された遺伝子について、RNAiにより一つの遺伝子の発現を抑制したときの他の遺伝子の発現を RT-PCR により解析することにより上下関係を明らかにし、関連したシグナル経路毎にこれらの遺伝子をグループ分けする。この実験から得られる知見により、新規分子の機能解析が容易となり、がん幹細胞の腫瘍形成能、微小環境との相互作用に重要なシグナル伝達経路の描出が可能となる。

(3)機能未知の1回膜貫通型蛋白質 PCDH10, PCDH17, PTPRD のがん細胞間、がん細胞-間質細胞間相互作用における役割を明らかにする。免疫沈降-質量分析および two-hybrid システムにより細胞内ドメインに結合する分子を検索し、得られた遺伝子を shRNA によりノックダウンして造腫瘍性への影響を検討し、重要な遺伝子を同定する。同定された蛋白質を手がかりにして、さらに下流のシグナル経路を明らかにする。

(4)腸管上皮幹細胞マーカー Lgr5(Barker et al., Nature 449, 1003-1007, 2007) が、大腸がんおよび神経膠芽腫の腫瘍形成能に重要であることを見出したので、リガンドの同定、細胞内ドメイン結合タンパク質の同定を進める。Lgr5 の発現が腫瘍で増大しているのは、Wnt シグナルに加えて GATA-6 による転写活性化が重要であることを見出しているため、Lgr5 のプロモーター解析や GATA-6 の発現が腫瘍で増大している分子機構を明らかにする。

(5)周辺微小環境との相互作用に重要な役割を果たし、腸管腺腫の発症に重要な APC 結合性 GEF 分子 Asef および Asef2 が、大腸がんでは過剰発現している分子機構を明らかにする (Kawasaki et al., Science 289, 1194-1197, 2000, Nat. Cell Biol. 5, 211-215, 2003, EMBO Rep. 10, 1355-1362, 2009 など)

(6)神経膠芽腫の造腫瘍性に TET1 が重要であることを見出したので、神経膠芽腫でのゲノムのハイドロキシメチル化の状態を次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析する。さらにハイドロキシメチル化シトシンに結合するタンパク質を質量分析により同定し、機能を明らかにする。

(7)大腸がんの造腫瘍性に重要な long non-coding RNA 3種の機能を結合タンパク質の解析により明らかにする。

4. 研究成果

大腸がんおよび脳腫瘍の造腫瘍性、幹細胞性、微小環境細胞との相互作用について解析し、以下の結果を得た。

1)大腸がんではAsefの発現が亢進しているが、これにはNOTCH3の発現増大が重要な役割を果たしていることを見出した。また、大腸がんではNOTCH3の発現を抑制するmicroRNA-1の発現が低下しているためにNOTCH3の発現が亢進していると考えられた。さらに、血管内皮細胞の発現するNotchリガンドDLLが、大腸がん細胞のNotch-Asef経路を活性化することを明らかにした。

2)神経膠芽腫の造腫瘍性及び細胞運動に重要であることを明らかにした1回膜貫通型蛋白質PCDH10, PCDH17 が、ユビキチンライゲース複合体に含まれるKLHL20と結合し、ポリユビキチン化修飾の基質となること、細胞局在の制御を受けていることを明らかにした。

3)大腸がんでは幹細胞マーカーLGR5の発現が亢進しているが、これには転写因子GATA6の発現増大が重要であることを明らかにした。さらに、GATA6の発現を抑制する機能をもつmicroRNA-363の発現低下がGATA6の大腸がんにおける発現亢進に重要であることを見出した。

4)神経膠芽腫では転写因子SOX9がLGR5の発現を促進していること、造腫瘍性に重要な役割を果たしていることを見出した。

5) 神経膠芽腫の造腫瘍性にはALK及びPleiotrophinが重要な役割を果たしていることを明らかにした。

6) 大腸がん細胞の造腫瘍性に重要な役割を果たすnon-coding RNA (ncRNA) UPATが転写因子UHRF1と複合体を形成することを見出し、さらにユビキチンリガーゼ - TRCP - proteasomeによるUHRF1の分解を阻害して安定化することを明らかにした。

7) Wnt/ -catenin シグナルの最も重要な標的遺伝子 c-Myc の標的遺伝子を探索することにより新規 ncRNA を同定し MYU と命名した。MYU はゲノム上において機能未知の遺伝子 Vps9d1 の相補鎖に存在し、アンチセンス RNA として機能して Vps9d1 の発現を抑制することを明らかにした。さらに、Vps9d1 が膜タンパク質のエンドサイトーシスに関わる G タンパク質 Rab5 の GEF (guanine-nucleotide exchange factor) として機能することを明らかにした。また、Vps9d1 が EGFR のシグナル伝達及びエンドサイトーシスに関わるアダプタータンパク質 Grb2 と結合することも明らかとなった。これらの結果から、MYU が Vps9d1 の発現制御を介して、EGF シグナリングの調節を担う可能性が示唆された。

さらに、MYUは、hnRNPKと結合することによりCDK6を安定化し、その発現亢進を引き起こすことにより細胞周期のG1-S移行を促進することを見出した。Wnt/ -catenin/c-Myc経路はCDK4の直接制御とMYUを介したCDK6の活性制御とにより細胞周期を制御していると考えられる。

8) 大腸がん検体から分離した大腸がん幹細胞 (CD44+CD133+) の造腫瘍性に重要なncRNA CASCA(命名)及びNR-Yを見出した。CASCAまたはNR-Yの発現抑制により、大腸がん細胞の無血清三次元培養での増殖および免疫不全マウスでの増殖が抑制された。二次元平面培養での大腸がん細胞の増殖は影響を受けなかった。

9) DNAのhydroxymethyl化を触媒する酵素 TET1の発現をノックダウンすると神経膠芽腫は造腫瘍性を失うことを見出した。さらに、hydroxymethyl化されたcytosineにはCHTOPが特異的に結合してmethylosome複合体をリクルートし、がん化に重要な遺伝子群の発現を促進す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 34件)

1. Nakamura T., Hayashi T., Mimori-Kiyosue Y., Sakaue F., Matsuura K., Iemura S., Natsume T. and *Akiyama T. (2010) The PX-RICS/14-3-3 zeta/theta complex couples N-cadherin/ β -catenin with Dynein/Dynactin to mediate its export from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 285, 16145-16154 査読有 doi: 10.1074/jbc.M109.081315
2. Taniue, K., Oda, T., Hayashi, T., Okuno, M., *Akiyama, T. (2011) A member of the ETS family, EHF, and the ATPase RUVBL1 inhibit p53-mediated apoptosis. *EMBO Rep.* 12, 682-689 査読有 doi: 10.1038/embor.2011.81
3. Matsuura, K., Jigami, T., Taniue, K., Morishita, Y., Adachi, S., Senda, T., Nonaka, A., Aburatani, H., Nakamura, T., *Akiyama, T. (2011) Identification of a link between Wnt/ β -catenin signaling and the cell fusion pathway. *Nat. Commun.* 2, 548 査読有 doi:10.1038/ncomms155
4. Yanagida, S., Taniue, K., Sugimasa, H., Nasu, E., Takeda, Y., Kobayashi, M., Yamamoto, T., Okamoto, A. and *Akiyama, T. (2013) ASBEL, an ANA/BTG3 antisense transcript required for tumorigenicity of ovarian carcinoma. *Scientific Reports* 3, 1305 査読有 doi:10.

5. Koyama-Nasu, R., Nasu-Nishimura, Y., Todo, T., Ino, Y., Saito, N., Aburatani, H., Funato, K., Echizen, K., Sugano, H., Haruta, R., Matsui, M., Takahashi, R., Manabe, E., Oda, T. and * Akiyama, T. (2013) The critical role of cyclin D2 in cell cycle progression and tumorigenicity of glioblastoma stem cells. *Oncogene* 32, 3840-5 査読有 doi: 10.1038/onc.2012.399
6. Koyama-Nasu, R., Haruta, R., Nasu-Nishimura, Y., Taniue, K., Katou, Y., Shirahige, K., Todo, T., Ino, Y., Mukasa, A., Saito, N., Matsui, M., Takahashi, R., Hoshino-Okubo, A., Sugano, H., Manabe, E., Funato, K., * Akiyama, T. (2013) The pleiotrophin-ALK axis is required for tumorigenicity of glioblastoma stem cells. *Oncogene* 33, 2236-44. 査読有 doi: 10.1038/onc.2013.168.
7. Echizen, K., Nakada, M., Hayashi, T., Sabit, H., Furuta, T., Nakai, M., Koyama-Nasu, R., Nishimura, Y., Taniue, K., Morishita, Y., Hirano, S., Terai, K., Todo, T., Ino, Y., Mukasa, A., Takayanagi, T., Ohtani, R., Saito, N., * Akiyama, T. (2013). PCDH10 is required for the tumorigenicity of glioblastoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 444, 13-18 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2013.12.138 .
8. Furukawa, S., Kawasaki, Y., Miyamoto, M., Hiyoshi, M., Kitayama, J., * Akiyama, T. (2013) The miR-1-NOTCH3-Asef pathway is important for colorectal tumor cell migration. *PLoS One*. 8(11):e80609. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0080609
9. Tsuji, S., Kawasaki, Y., Furukawa, S., Taniue, K., Hayashi, T., Okuno, M., Hiyoshi, M., Kitayama, J., * Akiyama, T. (2014) The miR-363-GATA6-Lgr5 pathway is critical for colorectal tumorigenesis. *Nat. Commun.* 5, 3150 査読有 doi: 10.1038/ncomms4150
10. Takai, H., Masuda, K., Hiraoka, K., Echizen, K., Koyama-Nasu, R., Nasu-Nishimura, Y., Ogawa, H., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Todo, T., Ino, Y., Mukasa, A., Saito, N., Toyoshima, C., Shirahige, K. and * Akiyama, T. (2014) 5-hydroxymethylcytosine plays a critical role in glioblastomagenesis by recruiting the methylosome. *Cell Rep.* 9, 48-60 査読有 doi: 10.1016/j.celrep.2014.08.071
- 〔学会発表〕(計 33 件)
1. 癌抑制遺伝子産物 APC の機能解析. 川崎 善博, 秋山 徹. 愛知県名古屋市名古屋国際会議場. 第70回日本癌学会学術総会. 2011. 10. 3-5
 2. ETS familyであるEHF, 及びATPase活性を持つRUVBL1はp53依存的なapoptosisを阻害する. 谷上 賢瑞, 小田 健昭, 林 寛敦, 奥野 ます美, 秋山 徹. 第70回 日本癌学会学術総会愛知県名古屋市名古屋国際会議場. 第70回日本癌学会学術総会. 2011. 10. 3-5
 3. The cancer stem cell marker CD133 is required for desmosome formation. 那須 亮, 高橋 理那, 柳田 聡, 西村 教子, 尾山 大明, 秦 裕子, 春田 諒, 眞鍋 瑛美, 大久保 明美, 尾見 裕子, 矢内原 臨, 岡本 愛光, 田中 忠男, 秋山 徹. 北海道札幌市口イトン札幌. 第71回日本癌学会学術総会. 2012. 9. 19-21
 4. miR-1-Notch3-Asef 経路は大腸癌細胞の運動能亢進に重要である. 川崎 善博, 古川 史織, 秋山 徹. 福岡県福岡市福岡国際会議場. 第 35 回日本分子

- | | |
|--|--|
| <p>生物学会年会.2012.12.11-14</p> <p>5. SOX2-pleiotrophin-ALK 軸はグリオブラストーマ幹細胞の腫瘍形成能に必須である. 那須 亮, 春田 諒, 西村 教子, 谷上 賢瑞, 加藤 由紀, 白髭 克彦, 藤堂 具紀, 稲生 靖, 武笠 晃丈, 斎藤 延人, 松井 真弓, 高橋 理那, 大久保 明美, 菅野 陽元, 真鍋 瑛美, 船戸 洸佑, <u>秋山 徹</u>. 第 35 回日本分子生物学会年会.2012.12.11-14</p> <p>6. 神経膠芽腫の発症における 5-hydroxymethylcytosine の役割. 高井 弘基 <u>秋山 徹</u>. 神奈川県横浜市パシフィコ横浜. 第 72 回日本癌学会学術総会.2013.10.3-5</p> <p>7. RNA 結合タンパク質 D8 は c-jun の転写後制御を介して APC (Min/+)マウスにおける腫瘍形成を制御する. 山角 祐介, 渡邊 紘介, 小田 健昭, 佐藤 裕美, <u>秋山 徹</u>. 第 72 回日本癌学会学術総会.2013.10.3-5</p> <p>8. Long non-coding RNA ASBEL required for tumorigenicity of colon cancer. 谷上 賢瑞, <u>秋山 徹</u>. 米国サンタフェ. Long Noncoding RNAs: Marching toward Mechanism. 2014.2.27-3.4</p> <p>9. 大腸がん幹細胞における新規長鎖非コード RNA の機能解析, 松村 厚佑, 宮本 昌弥, 川崎 善博, 斎藤 晋祐, 日吉 雅也, 北山 丈二, <u>秋山 徹</u>. 神奈川県横浜市パシフィコ横浜. 第 37 回日本分子生物学会年会. 2014.11.25-27</p> <p>10. 5-Hydroxymethylcytosine Plays a Critical Role in Glioblastomagenesis by Recruiting</p> | <p>the CHTOP-Methylosome Complex. 高井 弘基, <u>秋山 徹</u>. 米国コロラド. Keystone Symposia: Epigenetics and Cancer. 2015.1.25-30</p> <p>〔図書〕(計 0 件)</p> <p>〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)</p> <p>名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :</p> <p>取得状況 (計 0 件)</p> <p>名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :</p> <p>〔その他〕
ホームページ等</p> <p>6 . 研究組織
(1)研究代表者
秋山 徹 (AKIYAMA, Tetsu)
東京大学・分子細胞生物学研究所・教授
研究者番号 : 70150745</p> |
|--|--|