

令和元年6月18日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07014

研究課題名(和文) 癌幹細胞におけるアポトーシス性容積減少を標的とした食道癌新規治療の開発

研究課題名(英文) The development of targeted therapy to ion transporters of esophageal cancer stem cells

研究代表者

工藤 道弘 (Kudou, Michihiro)

京都府立医科大学・京都市上京区・専攻医

研究者番号：20804264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：食道癌細胞株より癌幹細胞を分離し遺伝子解析にかけた結果、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>関連分子が変動していた。[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>はapoptosisに關与することから、癌幹細胞ではこれらイオン輸送体を介し[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>が調整がされることでapoptosis耐性を獲得しているという仮説を新たに構築した。高発現分子の内ATP2A1にはthapsigargin(TGN)という阻害剤が存在し、癌幹細胞特異的治療が可能か検証した。TGNを癌幹細胞に用いると通常癌細胞と比較して増殖抑制効果を示した。癌幹細胞のATP2A1を標的とした治療は癌幹細胞特異的治療となる可能性があり、さらなる検証が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道癌における抗腫瘍治療は未だ効果は限定的であり、治療に対する耐性化や遠隔期の再発などが問題として挙げられている。これらには癌幹細胞が關連するとされ、治療標的として注目されている。今回の我々の研究では、癌幹細胞のイオン環境という独創的なアプローチで癌幹細胞の治療耐性獲得機序の解明を試み、Ca<sup>2+</sup>イオン動態、高発現Ca<sup>2+</sup>イオン輸送体が關連している可能性を見出した。これを新たに標的とする治療が開発できれば、これまでにない全く新しい機序の標的治療が可能であり、一般化学療法と組み合わせることで相乗的な効果が得られる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Gene profiles of esophageal cancer stem cells (CSCs), which were isolated from human cell lines, were analysed using a micro-array method, revealing the gene over-expression of ion transporters which were associated with the regulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (ATP2A1, ATP2A3, ORAI3, and S100). Previous studies described that [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> was strongly related to the mechanism of apoptosis. Therefore, we developed a novel hypothesis that the resistance of apoptosis in CSCs is derived from the activated regulation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> via the over-expressed ion transporters. To validate the hypothesis, the drug sensitivity assay of thapsigargin(TGN), a specific inhibitor of ATP2A1, was performed, resulting in the strong suppression effect of CSCs proliferation. In conclusion, ATP2A1 in CSCs of esophageal cancer can be a novel therapeutic target.

研究分野：腫瘍学

キーワード：食道癌 癌幹細胞 分子標的療法 イオン輸送体 アポトーシス

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

本研究開始前の先行研究により、様々なイオン輸送体が癌幹細胞において通常の癌細胞よりも強く発現していることが判明していた。これらイオン輸送体は様々な働きを有するが、細胞容積や形態の変化に強く関与していると報告されている。あらゆる細胞はプログラム細胞死であるアポトーシスが生じる場合、apoptotic volume decrease (AVD) とされる生理的細胞容積減少が生じることが知られており、これらが生じる際、多くのイオン輸送体の活性化、抑制が起こる。この AVD の機序と、我々の先行研究のデータから、癌幹細胞ではこの AVD に抵抗するイオン輸送体が高発現、活性化しており、アポトーシスを誘導する治療 (抗癌剤や放射線治療) に抵抗性を獲得しているのではないかとこの仮説をたてた。本研究はこの仮説を検証するために立案されたものである。

## 2. 研究の目的

本研究では『食道癌幹細胞がイオン輸送体の特異的変化を介して、AVD に抵抗性を獲得している。このイオン輸送体に対する標的薬剤を併用し癌幹細胞における AVD 抵抗性を解除、化学療法への感受性を高めることで、化学療法による殺腫瘍効果を飛躍的に向上することができる。』という実験仮説の検証を行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 1. ヒト食道癌細胞株、手術切除組織からの癌幹細胞の分離と細胞株樹立

当研究室で保管されている細胞株より cell sorter (SONY SH800) を用いて、ALDEFLUOR 試薬で標識された ALDH1 (食道癌幹細胞マーカー) が高発現する細胞のみを分離し培養する。食道癌切除組織から微小片を採取し細かく刻みトリプシンで細胞間結合を弛緩させた後破碎し、この破碎液を 40 μm のフィルターを通過させ回収された癌細胞を ALDEFLUOR 試薬で処理し、同様に cell sorter で分離、培養する。

### 2. 食道癌幹細胞の網羅的遺伝子解析と、標的分子 (主にイオン輸送体) の探索

項目 1 で樹立した食道癌細胞株、切除検体由来の癌幹細胞株より total RNA を抽出する。これらと、各々の元の癌細胞、組織より抽出した total RNA の遺伝子発現プロファイルの差異を、マイクロアレイ法により解析する。

### 3. 標的遺伝子に対する標的治療法の開発

方法 2 で同定された分子に対する標的薬剤を用いて、癌幹細胞に対して特異的に作用を示すか否か検証する。通常の癌細胞に対して、標的薬剤による薬物容量曲線と、癌幹細胞における薬物容量曲線を描き、それぞれの増殖抑制効果を IC50 で比較する。

### 4. 標的薬剤使用時の癌幹細胞の自己複製能に対する効果、細胞内イオン動態に対する影響

標的薬剤を使用した際の自己複製能に対する影響を Sphere が形成させる数やサイズなどを評価することで確認する。また、標的薬剤使用時の細胞内イオン濃度を測定し、これらに対する影響を評価する。

## 4. 研究成果

### 1. ヒト食道癌細胞株、手術切除組織からの癌幹細胞の分離と細胞株樹立

まず、食道癌ヒト細胞株に対し、Aldefluor assay を用いて、ALDH1 活性を網羅的に評価した。結果、図 1 に示したとおり、TE-4 (4.7%), TE-5 (6.4%), TE-8 (3.9%), TE-13 (7.9%), KYSE170 (7.6%), KYSE790 (17.6%) で比較的 ALDH1 活性の高い細胞集団が多くみられた。TE-8 については既に癌幹細胞株の樹立に成功していたため、その他の細胞株について、方法 1 で癌幹細胞の抽出、培養を試みた。その結果、TE-4 由来の癌幹細胞の樹立に成功した。(図 2)

次に食道癌切除標本を用いて癌幹細胞の樹立を試みた。食道癌手術後の検体を、即座に処理し同様にセルソーターでのソーティングを試みた。しかしながら、数回施行したところ、細胞の抽出や、染色結果が予想と反して結果が得られなかった。食道扁平上皮癌は比較的組織量が少なく、近年では術前に化学療法がされている症例が多いこともあり、続行不能と判断、細胞株由来の癌幹細胞のみで研究を遂行することとした。

・ Aldefluor assay

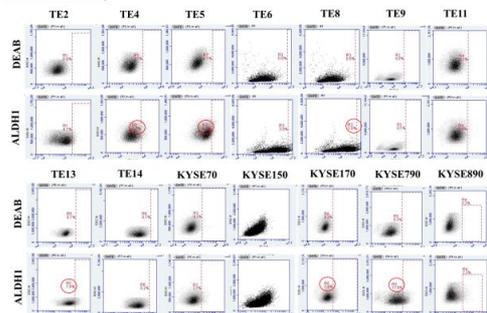
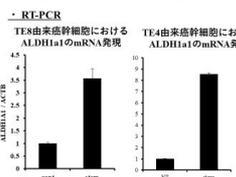
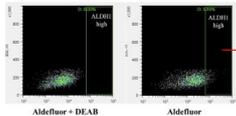


図 1 食道癌細胞株における ALDH1 発現の評価

・ Aldefluor assay



・ Sphere formation assay

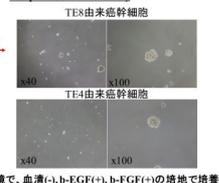


図 2 TE-4, TE-8 からの癌幹細胞の樹立

## 2. 食道癌幹細胞の網羅的遺伝子解析と、標的分子（主にイオン輸送体）の探索

次に TE-4, TE-8 由来の癌幹細胞株と各々の起源となった通常細胞株をペアとして、マイクロアレイ法による遺伝子解析に提出、イオン輸送体発現の変化を評価した。本研究の仮説としては、癌幹細胞においては、AVD に関連するイオン輸送体、クロライドイオンやカリウムイオンなどに関連するイオン輸送体に変化していると予想していたが、図 3 で示した様に、予想に反してカルシウムイオンに関連するチャンネルやトランスポーターが両癌幹細胞株で高発現していた (ATP2A1, ATP2A3, ORAI3 など)。この解析結果の内、標的薬剤が存在する ATP1B2, ATP2A1, SLC12A2 をピックアップし、RT-PCR 法でも遺伝子発現を再評価したところ、マイクロアレイの結果の通り、癌幹細胞での発現亢進を認めた (図 4)。この評価を行った分子の内、ATP2A1 は ATP 駆動性のカルシウムチャンネルである。これらは、細胞内におけるカルシウム濃度を一定に保つために重要な役割を果たしている (図 5)。実際に両癌幹細胞株では、同カルシウム濃度の維持に関わる ORAI チャンネルや、カルシウムイオンと結合して細胞内カルシウム濃度を一定に保つ作用のある S100 タンパクも上昇していた。細胞内カルシウム濃度は、上昇するとアポトーシスが誘導されることが知られており、癌幹細胞では、このカルシウム濃度を一定に維持する作用が亢進しており、この機序によりあらゆる治療に対する耐性を獲得しているのではないかという仮説に着想するに至った。そこで、この ATP2A1 に代表されるカルシウム濃度維持に関わる分子を標的とすることで、癌幹細胞特異的治療が開発できないという検証を続けることとした。

Gene Symbol	Description	UniGeneID	TE4EXP-Change	TE8EXP-Change
ANO7	Homo sapiens anoctamin 7 (ANO7), transcript variant NGEF-S, mRNA [NM_001001666]	Hs_163909	1.767197	1.783694
ATP1B2	Homo sapiens ATPase, Na+/K+ transporting, beta 2 polypeptide (ATP1B2), transcript variant 1, mRNA [NM_001676]	Hs_643540	2.534705	4.715834
ATP2A1	Homo sapiens ATPase, Ca++ transporting, cardiac muscle, fast twitch 1 (ATP2A1), transcript variant 8, mRNA [NM_173201]	Hs_657344	2.311312	2.266926
ATP2A3	Homo sapiens ATPase, Ca++ transporting, ubiquitous (ATP2A3), transcript variant 7, mRNA [NM_174958]	Hs_513870	3.3889	1.521209
CLCA2	Homo sapiens chloride channel accessory 2 (CLCA2), mRNA [NM_006536]	Hs_241551	26.32538	16.3081
CLCN5	Homo sapiens chloride channel, voltage-sensitive 5 (CLCN5), transcript variant 1, mRNA [NM_00117899]	Hs_166486	1.700095	2.213847
CLDN3	Homo sapiens claudin 3 (CLDN3), mRNA [NM_001306]	Hs_647023	1.803376	4.880074
CLIC3	Homo sapiens chloride intracellular channel 3 (CLIC3), mRNA [NM_004609]	Hs_64746	9.747973	3.847543
ORAI3	Homo sapiens ORAI calcium release-activated calcium modulator 3 (ORAI3), mRNA [NM_152288]	Hs_745104	1.64952	1.938184
ORAI3	Homo sapiens ORAI calcium release-activated calcium modulator 3 (ORAI3), mRNA [NM_152288]	Hs_745104	1.547965	1.918091
ORAI3	Homo sapiens ORAI calcium release-activated calcium modulator 3 (ORAI3), mRNA [NM_152288]	Hs_745104	1.576719	1.868965
ORAI3	Homo sapiens ORAI calcium release-activated calcium modulator 3 (ORAI3), mRNA [NM_152288]	Hs_745104	1.657434	1.828007
ORAI3	Homo sapiens ORAI calcium release-activated calcium modulator 3 (ORAI3), mRNA [NM_152288]	Hs_745104	1.505958	1.76189
ORAI3	Homo sapiens ORAI calcium release-activated calcium modulator 3 (ORAI3), mRNA [NM_152288]	Hs_745104	1.501124	1.611376
ORAI3	Homo sapiens ORAI calcium release-activated calcium modulator 3 (ORAI3), mRNA [NM_152288]	Hs_745104	1.517922	1.603524
SLC12A2	Homo sapiens solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporter), member 2 (SLC12A2), transcript variant 1, mRNA [NM_001046]	Hs_162585	4.396626	1.575916
SLC24A3	Homo sapiens solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 3 (SLC24A3), mRNA [NM_020689]	Hs_654790	2.247542	5.182813
SLC47A2	Homo sapiens solute carrier family 47 (multidrug and toxin extrusion), member 2 (SLC47A2), transcript variant 1, mRNA [NM_152908]	Hs_126830	5.676114	2.341551
SLC9A3R1	Homo sapiens solute carrier family 9, subfamily A (NHE3, cation proton antiporter 3), member 3 regulator 1 (SLC9A3R1), mRNA [NM_004252]	Hs_724482	1.82483	1.514303
SLC9A9	Homo sapiens solute carrier family 9, subfamily A (NHE3, cation proton antiporter 9), member 9 (SLC9A9), mRNA [NM_173653]	Hs_302257	2.742255	1.812884

図 3 Micro array data

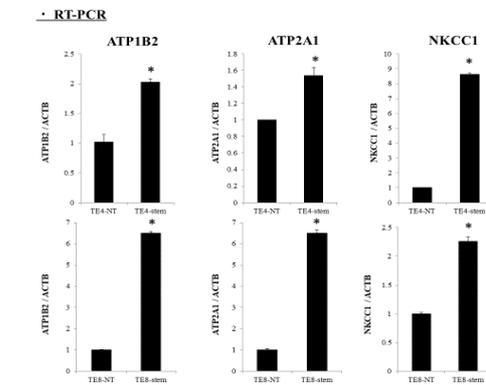


図 4 候補分子の遺伝子発現 (RT-PCR 法)

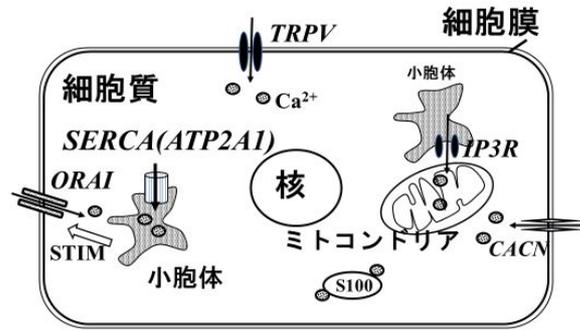


図 5 細胞内カルシウム濃度の維持に関わる分子

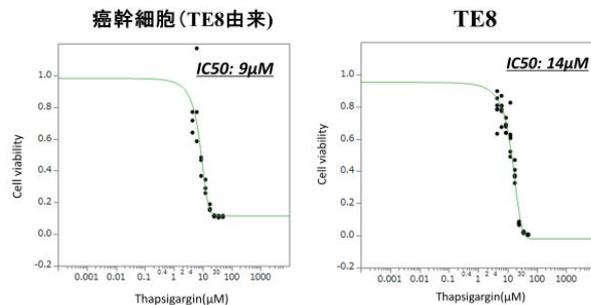
## 3 標的遺伝子に対する標的治療法の開発

ATP2A1 の標的薬剤として、タブシガルギン (TGN) が存在する。これらを用いた際に癌幹細胞特異的に効果があるか評価するため、もともとの起源の癌細胞株に対する増殖抑制効果と、癌幹細胞に対する増殖抑制効果を薬物容量曲線で IC50 を算出することで比較した。その結果、TE4, TE8 とともに若干 IC50 が癌幹細胞で低く、TGN が癌幹細胞により効果を示している傾向がみられた (図 6)。

## 6 食道癌細胞、癌幹細胞に対するタブシガルギン薬物容量曲線

## 4 癌幹細胞の細胞内カルシウムイオン動態

細胞内カルシウムイオン濃度を蛍光強度として評価可能な薬剤 fluo-8 を用いて TE-8 と TE-8 由来の癌幹細胞に対して、細胞内カルシウム濃度の測定を行ったところ、蛍光顕微鏡観察では、図の如くやや癌幹細胞で蛍光量が增大している蛍光がみられた (図 7)。これらについては、さらにフローサイトメトリを用いた定量評価を行っていく予定である。



## 5 今後の研究課題について

今後は以下について、さらに研究を継続予定である。

- ・ TGN 使用時の Ca 濃度動態の変化
- ・ TGN 使用時の ER ストレス関連分子の変化
- ・ TGN 使用時の、自己複製能の変化
- ・ ノードマウスを用いた再現性の確認
- ・ SERCA1 の免疫染色

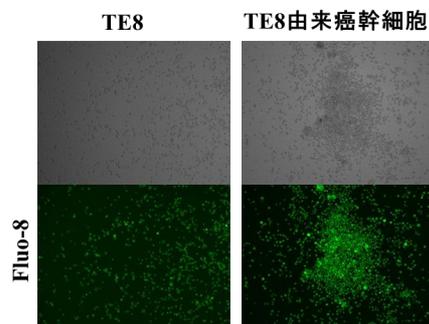


図7 癌幹細胞における細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2件)

- 1, Shiozaki A, Kudou M, et al. Functional analysis and clinical significance of sodium iodide symporter expression in gastric cancer. Gastric Cancer. 2019 May;22(3):473-485. (査読有)
- 2, Shiozaki A, Kudou M, et al. Anion exchanger 2 suppresses cellular movement and has prognostic significance in esophageal squamous cell carcinoma. Oncotarget. 2018 May 25;9(40):25993-2600 (査読有)

〔学会発表〕(計 6件)

- 1, Anticancer effects of heat shock on liver cancer via autophagic degradation of aquaporin 5, Keita Katsurahara, Atsushi Shiozaki, Michihiro Kudou, et al. The 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
- 2, Expression and role of Na<sup>+</sup> /K<sup>+</sup> -ATPase in human esophageal squamous cell carcinoma Toshiyuki Kobayashi, Atsushi Shiozaki, Michihiro Kudou, et al. The 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
- 3, Role of CLIC1 in human esophageal squamous cell carcinoma, Yoshihsa Matsumoto, Atsushi Shiozaki, Michihiro Kudou et al. The 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
- 4, Functional analysis and prognostic value of sodium iodide symporter (NIS) in gastric cancer, Atsushi Shiozaki, Michihiro Kudou et al. The 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
- 5, Enhancement of paclitaxel uptake into gastric cancer cells via the hypotonicity-induced cell volume regulation, Toshiyuki Kosuga, Atsushi Shiozaki, Michihiro Kudou, et al. The 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
- 6, Regulatory Volume Decrease was suppressed by hypothermia stress in gastric cancer cells, Yuzo Yamazato, Atsushi Shiozaki, Michihiro Kudou, et al. The 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

## 6 . 研究組織

(1) 研究分担者

(2) 研究協力者

塩崎 敦(Atsushi Shiozaki) 京都府立医科大学付属病院 外科学教室 消化器外科学部門 学内講師、研究者番号： 40568086

小菅 敏幸(Toshiyuki Kosuga) 京都府立医科大学付属病院 外科学教室 消化器外科学部門 助教、研究者番号： 00457946

松本 順久(Yoshihisa Matsumoto) 京都府立医科大学付属病院 外科学教室 消化器外科学部門、大学院生

丸中 良典(Yoshinori Marunaka) 京都府立医科大学 名誉教授 (細胞生理学教室 前教授)

立命館大学 総合科学技術研究機構 創薬科学研究センター チェアプロフェッサー

江蘇大学 国際食栄養安全研究所 教授(併任)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。