

令和 2 年 4 月 17 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06891

研究課題名(和文) 自己組織化の癌治療への応用

研究課題名(英文) Application of self-organisation for cancer treatment

研究代表者

右田 敏郎 (Migita, Toshiro)

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター 分子生物治療研究部・研究員

研究者番号：20462236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：c-mycは肝臓がんのドライバー遺伝子でもあるが、c-mycは肝がん細胞の未分化維持に重要であることがわかった。c-mycを抑制すると有意な増殖抑制効果を示したが、悪性度のマーカーであるAFPには大きな影響を与えなかった。細胞骨格遺伝子であるbeta-actinはがんの治療標的になることが知られている。c-mycとbeta-actinを同時に抑制すると、アルブミンの発現量の上昇とAFPの発現量の減少が同時に観察され、分化の促進と悪性度低下の両方を誘導することが示唆された。さらに、3次元培養でもスフェアの数がc-myc単独の抑制よりも減少したことから、腫瘍原性も強く抑えることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞骨格遺伝子であるbeta-actinのがん細胞での役割については不明な点が多いが、正常細胞よりも量的に増加していることが多い。beta-actinとがん遺伝子であるc-mycを同時に抑制すると、分化促進と悪性度低下が見られたことより、がん細胞が機能的に正常化する可能性が示唆された。がん細胞特異的にbeta-actinの発現を抑制することができれば、beta-actinとc-mycの同時抑制は有望な治療法になると考えられた。

研究成果の概要(英文)：c-myc is a driver oncogene of human liver cancer. We found that c-myc plays an important role in the maintenance of an undifferentiated state of liver cancer cell lines. c-myc depletion significantly inhibited the growth of liver cancer cells; however, it did not affect the level of alpha-fetoprotein (AFP), which is a marker of tumor malignancy.

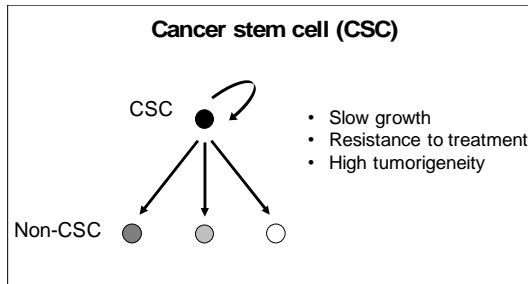
ACTB, a gene encoding cytoskeletal beta-actin, is known as a target of cancer therapy. Inhibition of both c-myc and ACTB expression upregulated albumin expression, but downregulated AFP expression, suggesting the promotion of differentiation and the suppression of malignancy. Moreover, inhibition of both c-myc and ACTB expression strongly inhibited colony formation in 3D-culture compared to inhibition of c-myc alone, suggesting that inhibition of both c-myc and ACTB expression suppresses tumorigenicity.

研究分野：腫瘍学

キーワード：がん幹細胞 自己組織化 分化

1. 研究開始当初の背景

がん組織はモノクローンのがん細胞の集まりではなく、不均一な細胞の集まりである。この中に幹細胞様の性質を持つがん細胞すなわちがん幹細胞 (Cancer stem cell; CSC) と呼ばれる特殊ながん細胞が存在するという説がある。がん幹細胞は自らを複製すると同時に、分化したがん細胞も産生するため、このことががん組織の不均一性を生む原因とされる。がん幹細胞の特徴は増殖が遅く、抗がん剤などの治療に抵抗性があり、腫瘍原性が強いなど正常組織の幹細胞と多くの類似点がある (下図)。



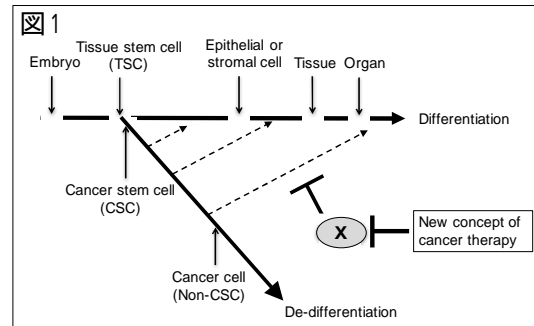
正常細胞が胚細胞から細胞分裂を繰り返す、最終的には機能的な分化細胞に変化していくのに対して、がん細胞は遺伝子異常により正常分化過程の途中から脱分化した細胞なので分化細胞になることはない。通常、がんは別の種類の組織への形質転換は見られず、lineage が保たれているため、がんの起源は組織幹細胞 (Tissue stem cell; TSC) であるとする説が有力である。

最近の研究によれば、がん細胞は可塑性を持ち、がん幹細胞 (CSC) と非がん幹細胞 (Non-CSC) は環境に応じて互いに入れ替わることもわかってきた。CSC は正常細胞で言えば組織幹細胞 (TSC) に近い性質の細胞であるため、可塑性が向上すれば Non-CSC よりも正常分化プロセスに戻りやすい細胞と考えられる (図 1)。

DNA の二重らせん構造など、分子が自発的に集まって、構造や機能を持つようになることを自己組織化 (Self-organization) と呼ぶ。細胞においても Embryonic stem cells (ES 細胞) や TSC から試験管内で立体的な下垂体、網膜、大脳皮質、乳腺などの作製に成功した例があるが、これも自己組織化を応用したものである (Shackleton M et al, Nature 2006; Suga H, Nature 2011; Nakano T, Cell stem cell 2012)。一方、がん細胞の自己組織化の報告例はない。正常細胞は胚細胞から細胞分裂を繰り返した後、自己組織化により機能的な組織を形成する。一方、固形腫瘍におけるがん細胞は TSC に近い細胞が遺伝子異常により脱分化しているため、細胞間コミュニケーションが極度に低下している。このため、組織のような集団となる性質は弱く、逆に集団から離脱しようとする性質の方が強

い。

我々が以前行った研究で、ゲノムの不安定化と細胞分化を明らかにした報告がある。多くのがん細胞は細胞の寿命を決定する染色体末端の反復配列であるテロメアが短く、ゲノムは不安定である。がん細胞のテロメアを強制的に伸長させると、がん細胞がマウスの体内で腺管を構築することを見出した (Hirashima K, Migita T et al. Mol Cell Biol 2013)。これはゲノムの安定化により、がん細胞の自己組織化が促進された可能性がある。さらに、この分化誘導現象には STAT1, ISG15, OAS3 などいくつかの遺伝子の発現抑制を伴う事も明らかになった。これらの事実から、がん組織には自己組織化を阻害する何らかの分子が存在し (図 1 ; 分子 X)、これらを抑制できれば脱分化状態を元に戻し、がん治療に応用できるのではないかと考えた (図 1 ; New concept of cancer therapy)。



がん細胞は分化した正常上皮細胞よりは明らかに未分化な細胞ではあるが、不完全ながら分化した機能も一部持っていることが多い。よって、分化度の観点からすれば、がん細胞は幹細胞と上皮細胞の間ぐらいに位置すると考えられる。しかし、がん細胞を分化誘導しても、正常細胞のような機能性を獲得することはない。この理由としては、がんの本質的な性質である自律性増殖の問題が関与していると思われる。がん細胞を分化させても、接触阻害の抑制や無限増殖する性質は変わらないため、分化したまま増殖が維持されるのではないかと考えられる。

よって、がん細胞を自己組織化させるためには、分化誘導と自立性増殖の両方を抑えることが必要と考えられる。具体的には、分化を誘導するために、がんの未分化能を維持する分子を抑制し、同時に、自立性増殖能の抑制のためにがんのドライバー遺伝子の働きを抑制することである。

本研究ではがん細胞の自己組織化を誘導するための普遍的な方法論を確立する前に、がん細胞の変化をより簡便にモニターできるような細胞株を選び、その細胞株に適した培養条件でがんの自己組織化を実証していく。ヒト肝がん細胞株はアルブミン産生能が保たれており、同時に、がんの悪性化のマー

カーである alfa-fetoprotein (AFP)を産生しているものがある。また、Induced pluripotent stem cells (iPS 細胞)を用いた先行研究では、iPS 細胞からヒトのミニ肝臓の立体組織を作製することができることも報告されており、ヒト肝がん細胞は本研究の実験材料として最適と考えられた。

2. 研究の目的

がん細胞は細胞同士のコミュニケーションが極度に弱く、このため組織としてまとまった機能を発揮することができない。今回、がん細胞の失われた自己組織化能の回復、つまりがん細胞による再組織化を目標に、がんの未分化性を維持している分子や自律性増殖の鍵となる分子を同時阻害することにより、がんの正常分化を試みる。さらに自己組織化を応用した新しいがん治療法のための基礎的実験を行う。がん種を肝臓に絞り、がん細胞の自己組織化を阻害しているメカニズムの一端を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 肝がん細胞は分化する時にアルブミンの増加や alfa-fetoprotein (AFP)の減少など分化状態をモニターしやすいマーカーを持つ。本研究では実験材料としてヒト肝がん細胞株である Huh-7 細胞を選んだ。また、AFP をほとんど発現していないヒト肝がん細胞株である PLCPRF/5 も実験材料とした。

(2) 細胞培養は接着性の通常培養用のプレートと非接着のコーティングをしている3次元プレートの2種類で行った。培地は 10% ウシ胎児血清とカナマイシン入りの low glucose DMEM を用いた。

(3) RNA 抽出は細胞から RNA easy kit(Qiagen)を用いて、細胞から total RNA を抽出した。RNA からの cDNA 合成は Superscript III cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher)を用いた。遺伝子発現量は LightCycler 96 (Roche)を用いて、mRNA の量をリアルタイム PCR 法で測定した。目的遺伝子は c-myc, Nanog, SOX2, KLF4, Oct4, CD44, p16, p19, p21, E-cadherin, vimentin, ALB, CYP3A4, CYP1B1, TERT, AKR1C1, UGT1A1, AFP とした。beta-Actin または GAPDH の発現量を同時に測定し、標的遺伝子の発現量を標準化した。

(4) 細胞増殖能は 96 well ディッシュに細胞を播種し、CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (プロメガ)にて測定した。siRNA によるノックダウン処理をして、48 時間または 72 時間後に細胞増殖能を測定した。

(5) 細胞死は 96 well ディッシュに細胞を播種し、CytoSelect Cell Viability and

Cytotoxicity Assay Kit (Cell Biolabs) にて生細胞と死細胞を同時に観察した。生細胞は CalceinAM 試薬により、死細胞は EthD-1 試薬により判定し、蛍光顕微鏡下に観察した。

(6) 遺伝子ノックダウンの siRNA oligo は Silencer Select (Ambion)を用いた。標的遺伝子の siRNA oligo を RNAiMax (インビトロジェン)とともに細胞に添加して、48 時間から 72 時間処理した。標的とした遺伝子は c-myc, KLF4, SOX2, Oct4, hTERT, beta-catenin, AFP, beta-actin とした。

(7) 阻害剤として、c-myc 阻害剤 (10058-f4)(Wako)と Actin 重合阻害剤 (Latrunculin A)(Wako)を Huh-7 細胞に投与し、細胞増殖や遺伝子発現を調べた。

4. 研究成果

(1) 3次元培養による細胞分化

Huh-7 はアルブミンも AFP も多量に産生していることをリアルタイム PCR で確認した。肝臓がんの細胞株である Huh-7 を用いて、3次元培養を行うと、肝前駆細胞が分化した際に発現が上昇するアルブミンなどの遺伝子の発現が促進されることがわかった。さらに、これらの3次元培養では細胞数が多いほど分化が促進されたことから、3次元培養というなかば強制的な細胞間接着においても細胞分化が促進されることがわかった。

(2) Huh-7 細胞の未分化維持遺伝子の内因性発現量

iPS 細胞の作製に必須の転写因子、c-myc, SOX2, Oct4, KLF4 の内因性発現量を調べると Huh-7 細胞の、c-myc 以外の遺伝子の発現量はかなり少ないことがわかった。

(3) c-myc の抑制による未分化維持の転写因子の亢進と分化誘導

c-myc の発現を抑制すると、SOX2, Nanog, KLF4 などの他の幹細胞性維持に関わる遺伝子の発現上昇が見られた。また、c-myc と KLF4 を同時に抑制すると SOX2, Nanog の発現はさらに上昇した。また、c-myc の発現を抑制すると、アルブミンだけでなく、肝臓の酵素である AKR1C1, CYP1A1, CYP3A4 なども上昇することがわかり、c-myc が肝がん細胞の分化を制御するマスター遺伝子であることが示唆された。

(4) 胎児性がん抗原である AFP を抑制した場合の細胞分化

Huh-7 細胞は胎児性がん抗原である AFP を大量に産生しているが、その産生量は分化度と相関することが知られている。そこで、AFP を siRNA にて抑制すると、細胞増殖が抑制されることがわかった。さらに、c-myc と AFP を同時に抑制すると細胞増殖は相対的に抑制された。

(5) c-myc 阻害剤と hTERT 阻害剤の相加的増殖抑制効果

hTERT 阻害剤は AFP の発現量を抑制することが知られている。Huh-7 細胞に c-myc 阻害剤と hTERT 阻害剤を同時に投与すると相加的に増殖が抑制された。

(6) c-myc と beta-actin の同時抑制による細胞分化と増殖抑制

細胞骨格遺伝子である beta-actin は細胞種ごとに特異的に発現している遺伝子を制御し、細胞の初期化を阻害している (Ikeda T et al. Nature comm 2018; 9:1387)。肝芽細胞や神経前駆細胞の beta-actin を抑制すると初期化が促進され、効率よく iPS 細胞が作製できる。がん細胞は一般的に正常細胞よりも beta-actin の発現量が高く、Actin 阻害剤はがん細胞の分裂を阻害し、細胞死を招くため、臨床においても治療効果が確認されている。今回、Huh-7 細胞においても beta-actin を siRNA で抑制すると細胞増殖が抑制された。さらに、beta-actin と c-myc を同時に抑制すると相加的増殖抑制効果が見られた。

(7) まとめ

c-myc は代表的ながん遺伝子であり、肝臓がんのドライバー遺伝子でもある。今回の研究で、c-myc は肝がん細胞の未分化維持に重要であることがわかった。さらに、c-myc を抑制すると有意な増殖抑制効果を示し、他の研究でも既に報告されているように c-myc の阻害薬は肝臓がんの有効な治療法となりえることが裏付けられた。しかし、c-myc を抑制しても悪性度のマーカーである AFP には大きな影響を与えなかった。そこで、c-myc と AFP を同時に抑制すると、c-myc 阻害による増殖抑制効果はさらに増強することを確認した。

beta-actin は細胞骨格や細胞分裂に関わる分子であるが、がんの治療標的になることが知られている。c-myc と beta-actin を同時に抑制すると、アルブミンの発現量の上昇と AFP の発現量の減少が同時に観察され、分化の促進と悪性度低下の両方を誘導することが示唆された。さらに、3次元培養でも c-myc と beta-actin を同時に抑制すると、スフェア-の数が c-myc 単独の抑制よりも減少したことから、腫瘍原性も強く抑えることが示唆された。

(8) 今後の方針

c-myc と beta-actin を同時に阻害した上で、3次元培養のスフェア-のアルブミンや AFP の発現量を調べる。また、c-myc 阻害剤と Actin 重合阻害剤を同時に投与し、3次元培養でスフェア-を形成させる。細胞が死なずに、スフェア-培養を継続できる薬剤至適濃度を決定し、阻害剤入りの培地で長期培養できる方法を確立する。長期スフェア-培養

でのアルブミンや AFP などの発現量の経過を調べる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

右田 敏郎 (MIGITA, Toshiro)
公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター 分子生物治療研究部・研究員
研究者番号: 20462236

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし