

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14409

研究課題名(和文) がん幹細胞の自己複製能と多分化能を制御する因子の解明とがん治療への応用

研究課題名(英文) Identification of factors regulating the capacity for both self-renewal and pluripotent differentiation of cancer stem cells and application to cancer treatment.

研究代表者

杉本 芳一 (Sugimoto, Yoshikazu)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・教授

研究者番号：10179161

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：SP(+)細胞は、色素Hoechst 33342の排出能を持つ細胞で、幹細胞形質の一つである。ヒト大腸がん細胞由来116/slug-25細胞より分取したSP(+)細胞では、薬物排出トランスポーターABCG2とヒストンアセチル基転移酵素HAT1の発現が上昇し、ヒストンメチル基転移酵素EZH2の発現が低下していた。116/slug-25細胞のSP(+)細胞は、ヒストンのアセチル化/メチル化に関連する酵素の阻害薬により著明に減少した。SP(-)細胞にshRNAライブラリーを導入するスクリーニングにより、細胞のSP(+)形質を制御する遺伝子を得た。

研究成果の概要(英文)：SP(+) cells have a property of Hoechst 33342 exclusion and are considered as stem-like cells. SP(+) cells isolated from human colorectal cancer 116/slug-25 cells showed higher expression of drug efflux transporter ABCG2 and histone acetyl transferase HAT1, and lower expression of histone methyltransferase EZH2 than SP(-) cells. Treatment of 116/slug-25 cells with inhibitors of histone acetyltransferases and methyltransferases diminished SP(+) cells. Genes regulating this SP(+) phenotype have been identified from a screening with shRNA library.

研究分野：分子生物学、がん化学療法

キーワード：分子標的治療 がん幹細胞 ABCG2

1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞は、自己複製能と多分化能を持ち、強い造腫瘍性、高転移能、抗がん剤抵抗性を特徴とする。このためがん薬物療法の効果を高めるためには、がん幹細胞固有の形質を制御する因子を同定し、これを標的とした新しい治療法を開発することが必要である。申請者らは、ヒト大腸がん細胞株 HCT116 に *SLUG* 遺伝子を導入して上皮間葉転換 (EMT) を誘導した 116/sluc-25 細胞が、10~15% の side population(+) 細胞 (SP(+) 細胞) を含むことを見出した。セルソーターを用いて分取した細胞を培養すると、SP(+) 細胞からは、SP(+) 細胞と SP(-) 細胞を含む細胞集団が形成された。また細胞の高い浸潤能と抗がん剤耐性も確認された。よってこの SP(+) 細胞は、がん幹細胞のモデルと位置づけることができる。本研究では、この SP(+) 細胞を用いて、SP(+) 細胞形質を制御する因子の同定と、これを標的とした新しいがん分子標的治療の戦略の開発を目指す。本研究で用いる 116/sluc-25 細胞は高率に SP(+) 細胞を含むため、セルソーターによる SP(+) 細胞の大量分取が可能であり、種々の実験が再現性を持って行えるという利点がある。

2. 研究の目的

本研究では、SP(+) 細胞の自己複製能と多分化能を制御する因子を同定し、これを標的としたがん幹細胞に対する分子標的治療の戦略を開発することを目的とする。SP(+) 細胞を高率に含む 116/sluc-25 細胞より SP(+) 細胞、SP(-) 細胞を分取して遺伝子発現解析を行い、両者の比較により、SP(+) 細胞の形質を制御する遺伝子を同定する。候補分子の活性を制御する化合物による SP(+) 細胞形質、がん幹細胞形質の制御の可能性を検討する。SP(-) 細胞に shRNA ライブラリーを導入して SP(+) 細胞に移行した細胞に組み込まれた shRNA を同定するスクリーニングにより、SP(+) 細胞の形質を制御する遺伝子を同定する。

3. 研究の方法

セルソーターを用いて 116/sluc-25 細胞より SP(+) 細胞と SP(-) 細胞を分取し、RNA を精製して、Agilent 社の SurePrint G3 Human Gene Expression 8x60K array を用いて遺伝子発現を調べた。SP(+) 細胞と SP(-) 細胞で発現の異なる遺伝子を抽出した。得られた遺伝子群の機能を検討し、SP(+) 細胞の形質を制御する候補分子を選択した。SP(+) 細胞で活性が上昇している候補分子について、その活性を低下させる化合物のスクリーニングを行った。得られた候補化合物の、SP(+) 細胞形質に与える効果について検討した。

また、116/sluc-25 細胞由来の SP(+) 細胞を SP(-) 細胞に移行させる化合物のスクリーニングを行った。得られた候補化合物が SP(+) 細胞形質に与える効果について検討し

た。

セルソーターを用いて 116/sluc-25 細胞より SP(-) 細胞を分取し、Cellecra 社の DECIPHER shRNA ライブラリーを導入した。SP(-) 細胞分画より SP(+) 細胞分画に移行した細胞を分取し、導入された shRNA クローンを次世代シーケンサーにより解析した。得られた遺伝子のうち、SP(+) 細胞で SP(-) 細胞より発現が低下している遺伝子を選択し、得られた候補遺伝子の産物が SP(+) 細胞形質に与える効果について検討した。

4. 研究成果

ヒト結腸がん細胞 HCT116 に *SLUG* 遺伝子を導入して上皮間葉転換 (EMT) を誘導した 116/sluc-25 細胞は、10% 以上の SP(+) 細胞を含んでいた。セルソーターを用いて 116/sluc-25 細胞より SP(+) 細胞を分取して培養すると、SP(+) 細胞の割合は分取 1 日後に 96%、5 日後に 67%、10 日後に 24% であった。cDNA マイクロアレイを用いて各細胞株の mRNA 発現を検討したところ、116/sluc-25 細胞の遺伝子発現は親株である HCT116 細胞と大きく異なっていたが、116/sluc-25 細胞由来の SP(+) 細胞と SP(-) 細胞の遺伝子発現の違いは非常に小さかった。その中で、SP(+) 細胞では *ABCG2* の発現が亢進していた。また、SP(+) 細胞ではヒストンアセチル基転移酵素 *HAT1* の関連遺伝子の発現が上昇傾向にあり、ヒストンメチル基転移酵素 *EZH2* の関連遺伝子の発現が低下傾向にあった。116/sluc-25 細胞を種々の阻害薬で処理したところ、ヒストンのアセチル化/メチル化に関連する酵素の阻害薬により、SP(+) 細胞は著明に減少した。以上より、SP(+) 細胞の形質にエピジェネティックな発現制御の関与が示唆された。116/sluc-25 細胞より分取した SP(-) 細胞に shRNA ライブラリーを導入し、SP(+) 細胞分画に移行した細胞を分取して、導入された shRNA クローンを次世代シーケンサーにより解析した。その結果、遺伝子ノックダウンによりエピジェネティックな発現を制御する遺伝子を得た。この遺伝子は、116/sluc-25 細胞の SP(+) の形質を制御する遺伝子と考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Tanaka N, Mashima T, Mizutani A, Sato A, Aoyama A, Gong B, Yoshida H, Muramatsu Y, Nakata K, Matsuura M, Katayama R, Nagayama S, Fujita N, Sugimoto Y, Seimiya H. APC mutations as a potential biomarker for sensitivity to tankyrase inhibitors in colorectal cancer. *Mol Cancer Ther*, 16(4): 752-762, 2017. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0578. (査読有)
2. Noguchi K, Hongama K, Hariki S, Nonomiya Y, Katayama K, Sugimoto Y. Functional

Effects of AKT3 on Aurora Kinase Inhibitor-induced Aneuploidy. *J Biol Chem*, 292(5): 1910-1924, 2017. doi: 10.1074/jbc.M116.747048. (査読有)

3. Nonomiya Y, Noguchi K, Tanaka N, Kasagaki T, Katayama K, Sugimoto Y. Effect of AKT3 expression on MYC- and caspase-8-dependent apoptosis caused by polo-like kinase inhibitors in HCT 116 cells. *Cancer Sci*, 107(12): 1877-1887, 2016. doi: 10.1111/cas.13093. (査読有)

4. Katayama K, Fujiwara C, Noguchi K, Sugimoto Y. RSK1 protects P-glycoprotein/ABCB1 against ubiquitin-proteasomal degradation by downregulating the ubiquitin-conjugating enzyme E2R1. *Sci Rep*. 6: 36134, 2016. doi: 10.1038/srep36134. (査読有)

5. Wang J, Abe M, Sasamoto E, Maeda D, Sugimoto Y, Miki Y, Masutani M. Suppression of -irradiation-induced deletion mutations under Parp-1 deficiency in mice. *Scholars Acad J Biosci*, 3(12): 998-1004, 2015. (査読有)

6. Kondo S, Hongama K, Hanaya K, Yoshida R, Kawanobe T, Katayama K, Noguchi K, Sugimoto Y. Upregulation of cellular glutathione levels in human ABCB5- and murine Abcb5-transfected cells. *BMC Pharmacol Toxicol*. 16: 37, 2015. doi: 10.1186/s40360-015-0038-5. (査読有)

7. Saeed M, Jacob S, Sandjo, L, Sugimoto Y, Khalid H, Opatz T, Thines T, Efferth T. Cytotoxicity of the sesquiterpene lactones neoambrosin and damsine from *Ambrosia maritima* against multidrug-resistant cancer cells. *Front. Pharmacol*, 6: 267, 2015. doi: 10.3389/fphar.2015.00267. (査読有)

8. Saeed M, Abdelgadir H, Sugimoto Y, Khalid HE, Efferth T. Cytotoxicity of 35 medicinal plants from Sudan towards sensitive and multidrug-resistant Cancer cells. *J Ethnopharmacol*, 174: 644-658, 2015. doi: 10.1016/j.jep.2015.07.005. (査読有)

[学会発表](計 38 件)

1. 藤原千明, 村松由起子, 矢守隆夫, 杉本芳二, 清宮啓之. テロメラーゼ阻害剤 MST-312 の即時的制がん効果を規定する因子. 日本薬学会第 137 年会, 2017/3/27, 仙台国際センター (宮城県・仙台市).

2. 徳永未来, 加藤優, 杉本芳二, 野口耕司, 片山和浩. 上皮間葉転換に伴って誘導される side population 細胞の性状解析. 日本薬学会第 137 年会, 2017/3/27, 仙台国際センター (宮城県・仙台市).

3. 高見麻由, 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳二. PKC α は Pim-1L の発現を制御する.

日本薬学会第 137 年会, 2017/3/27, 仙台国際センター (宮城県・仙台市).

4. 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳二. HSP90 阻害剤は quizartinib 耐性細胞の増殖を抑制する. 日本薬学会第 137 年会, 2017/3/27, 仙台国際センター (宮城県・仙台市).

5. 宮澤雅典, 野口耕司, 片山和浩, 杉本芳二. KSHV RTA の IL-10 プロモーター活性化における Sp3 結合領域の役割. 日本薬学会第 137 年会, 2017/3/27, 仙台国際センター (宮城県・仙台市).

6. 野々宮悠真, 野口耕司, 片山和浩, 杉本芳二. PLK 阻害剤に対する薬剤感受性規定因子の探索. 日本薬学会第 137 年会, 2017/3/25, 仙台国際センター (宮城県・仙台市).

7. 高木佳奈, 近藤慎吾, 杉本芳二, 野口耕司, 片山和浩. ABCB5 発現細胞における基質化合物の輸送及びメタボローム解析. 日本薬学会第 137 年会, 2017/3/25, 仙台国際センター (宮城県・仙台市).

8. 田中伯享, 吉田喜香, 松村由起子, 杉本芳二, 清宮啓之. 大腸がん細胞株のタンキラーゼ阻害剤に対する感受性予測バイオマーカー候補因子. 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/8, 仙台国際センター (宮城県・仙台市).

9. 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳二. RSK は UBE2R1 の自己ユビキチン化を誘導し、P-糖タンパク質の分解を抑制する. 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/8, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市).

10. 野口耕司, 片山和浩, 杉本芳二. Aurora kinase 阻害剤耐性細胞に於いて、Akt3 は細胞分裂に関する KIF23 を制御する. 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/8, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市).

11. 野々宮悠真, 野口耕司, 片山和浩, 杉本芳二. AKT-Myc シグナルは、PLK 阻害剤耐性に関与する. 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/8, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市).

12. 高見麻由, 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳二. PKC による Pim-1L-Ser65 のリン酸化の機能解析. 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/8, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市).

13. 宮澤雅典, 野口耕司, 片山和浩, 杉本芳二. RTA による IL-10 プロモーター活性化に働く協調分子の同定. 第 60 回日本薬学会関東支部大会, 2016/9/17, 東京大学 (東京都).

14. 伊藤賢司, 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳二. FLT3-ITD の D835 変異による quizartinib 耐性. 第 60 回日本薬学会関東支部大会, 2016/9/17, 東京大学 (東京都).

15. 針木志織, 本釜圭太, 野口耕司, 片山和浩, 杉本芳二. Akt は Aurora kinase 阻害剤による細胞の巨核化を抑制する. 第 60 回日本薬学会関東支部大会, 2016/9/17, 東京大学 (東京都).

16. 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. P-糖タンパク質による抗がん剤耐性に対する新規治療標的としての RSK の可能性. 第 20 回日本がん分子標的治療学会, 2016/5/31, 別府国際コンベンションセンター (大分県・別府市).

17. 野口耕司, 片山和浩, 杉本芳一. Aurora kinase 阻害剤が誘導する細胞分裂不全に対する Akt3 の作用. 第 20 回日本がん分子標的治療学会, 2016/5/31, 別府国際コンベンションセンター (大分県・別府市).

18. 近藤慎吾, 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. ABCB5 はグルタチオン合成阻害薬の効果を低下させる. 日本薬学会第 136 年会, 2016/03/28, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市).

19. 宮澤雅典, 野口耕司, 片山和浩, 杉本芳一. KSHV RTA による interleukin-10 プロモーターの活性化. 日本薬学会第 136 年会, 2016/03/28, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市).

20. 石塚周平, 野口耕司, 片山和浩, 杉本芳一. BET 阻害剤に対する耐性メカニズムの検討. 日本薬学会第 136 年会, 2016/03/28, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市).

21. 高見麻由, 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. PKC による Pim-1L の制御. 日本薬学会第 136 年会, 2016/03/27, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市).

22. 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. RSK1 によるユビキチン連結酵素 UBE2R1 のリン酸化と抗がん剤耐性. 日本薬学会第 136 年会. 日本薬学会第 136 年会, 2016/03/27, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市).

23. Katayama K, Noguchi K, Sugimoto Y. RSK1 regulates a ubiquitin-conjugating enzyme E2 R1 that is associated with multidrug resistance in cancer cells. Tenth AACR-JCA Joint Conference, "Breakthroughs in Cancer Research: From Basic to Therapeutics" 2016/02/16, Maui, HI, (USA).

24. Noguchi K, Katayama K, Sugimoto Y. AKT3 expression modulates chemosensitivity to aurora kinase inhibitors. AACR-NCI-EORTC International Conference, Molecular Targets and Cancer Therapeutics, 2015/11/07, Boston, MA, (USA).

25. 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. RSK は P-糖タンパク質 / ABCB1 のユビキチン化酵素 UBE2R1 をリン酸化する. 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015/10/10, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市).

26. 田中伯享, 吉田喜香, 村松由起子, 杉本芳一, 清宮啓之. 大腸癌細胞株でのタンキラーゼ阻害剤に対する感受性規定因子. 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015/10/10, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市).

27. 野口耕司, 片山和浩, 杉本芳一. Aurora kinase 阻害剤感受性に及ぼす AKT3 の効果.

第 74 回日本癌学会学術総会, 2015/10/9, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市).

28. 近藤慎吾, 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. ABCB5 遺伝子導入細胞の BSO 耐性機構. 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015/10/9, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市).

29. 高見麻由, 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. P-glycoprotein の発現を制御する FLT3/Pim-1 シグナル経路における protein kinase C の役割. 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015/10/9, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市).

30. 野々宮悠真, 野口耕司, 片山和浩, 杉本芳一. Plk 阻害薬耐性細胞における細胞死メカニズムの変化. 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015/10/9, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市).

31. 片山和浩, 氣谷晋太郎, 野口耕司, 杉本芳一. BCRP による抗がん剤耐性に対する 2 量体フラボノイドの効果. 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015/10/9, (愛知県・名古屋市).

32. 近藤慎吾, 本釜圭太, 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. ABCB5 は細胞内グルタチオンを変動させる. 第 59 回日本薬学会関東支部大会, 2015/09/12, (千葉県・船橋市).

33. 野々宮悠真, 野口耕司, 片山和浩, 杉本芳一. Polo-like kinase 阻害剤耐性細胞における耐性形質の解析. 第 59 回日本薬学会関東支部大会, 2015/09/12, 日本大学薬学部 (千葉県・船橋市).

34. 本釜圭太, 野口耕司, 片山和浩, 杉本芳一. AKT3 は Aurora kinase 阻害剤に対する抵抗性を付与する. 第 59 回日本薬学会関東支部大会, 2015/09/12, 日本大学薬学部 (千葉県・船橋市).

35. 高見麻由, 渡辺環太郎, 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. PKC 阻害剤は P-gp 発現を低下させる. 第 59 回日本薬学会関東支部大会, 2015/09/12, 日本大学薬学部 (千葉県・船橋市).

36. 石塚周平, 野口耕司, 片山和浩, 杉本芳一. Bromodomain-containing protein 4 阻害剤の耐性形質の解析. 第 59 回日本薬学会関東支部大会, 2015/09/12, 日本大学薬学部 (千葉県・船橋市).

37. 野口耕司, 片山和浩, 杉本芳一. Aurora kinase 阻害剤に対する薬剤感受性規定因子の探索. 第 19 回日本がん分子標的治療学会, 2015/06/12, 松山全日空ホテル (愛媛県・松山市).

38. 片山和浩, 野口耕司, 杉本芳一. P-糖タンパク質 / ABCB1 のプロテアソーム分解における RSK の関与. 第 19 回日本がん分子標的治療学会, 2015/06/11, 松山全日空ホテル (愛媛県・松山市).

〔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

[http://www.pha.keio.ac.jp/research/ct/c
hair.html](http://www.pha.keio.ac.jp/research/ct/c
hair.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉本 芳一 (SUGIMOTO, Yoshikazu)

慶應義塾大学・薬学部・教授

研究者番号: 10179161