

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18908

研究課題名(和文) がん幹細胞中でのグアニン四重鎖によるSOX2発現制御機構のin vivo解析

研究課題名(英文) Mechanism of SOX2 expression through G-quadruplex in cancer stem cells

研究代表者

飯田 圭介 (Iida, Keisuke)

千葉大学・大学院理学研究院・助教

研究者番号：70719773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：がんの転移を促進する因子として、がん幹細胞性に関与するSOX2に着目した。SOX2は正常な皮膚では発現していないが、発がんに伴いその発現上昇が認められ、腫瘍形成に寄与している。本研究では、発がん二段階実験を実施し、SOX2の発現上昇を確認した。現在はSOX2陽性細胞の培養条件を検討中である。また、SOX2以外のがん転移を促進する因子としてAXLを見出した。細胞弾性を転移能の指標として探索すると、受容体チロシンキナーゼの一つであるAXLが見出され、このAXLのリン酸化が細胞軟化、運動能亢進を導くことが明らかとなった。今後はこのAXLを抑制する新規手法について検討していく。

研究成果の概要(英文)：SOX2 are thought to contribute to tumorigenesis in squamous cell carcinoma. We monitored Sox2 expression in the epidermis of mice treated with DMBA/TPA or DMBA/OA. As a results, SOX2 expression is absent in the epidermis of control mice but appears in epidermal hyperplasia during chemical-induced carcinogenesis. Now, optimize condition of culture for SOX2 positive cells are currently underway. Moreover, we found AXL, tyrosine kinase receptor as factor of malignant progression in non-small cell lung cancer cells. Phosphorylation of AXL stimulates cellular softening and motility. Knockdown of AXL led to cellular stiffening and decrease of motility. Now we are trying to repress of AXL expression by small molecules.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：SOX2 AXL がん 細胞弾性

1. 研究開始当初の背景

がん組織中には新たに腫瘍を形成する造腫瘍能を持ち、既存の抗がん剤に耐性を示すが幹細胞 (Cancer Stem Cell : 以下 CSC) が存在する。従って現在のがん化学療法では、CSC が残存し、がんの再発や転移の原因となる (図 1)。2014 年、Blanpain らは転写因子 SOX2 が、皮膚扁平上皮がんの腫瘍形成、幹細胞性 (stemness) の維持に必要なことを報告した。当該研究は、皮膚が、前がん病変から浸潤性がんへと変化していく過程で、SOX2 の高発現が継続的に CSC の表現系を制御し、CSC 中での SOX2 の抑制が、抗がんアプローチとして有望であることを示した。

2. 研究の目的

皮膚のがん組織においては SOX2 を発現する CSC は全体のごく一部であり、大部分は SOX2 を発現していないため、SOX2 の発現の差異を正しく評価することが困難である。また、一般に CSC は通常の培養条件では幹細胞の性質に由来し、分裂しない、非 CSC へ分化する、等の問題が生じる。そのため、CSC に対する G4 リガンドの作用を調査するためには、SOX2 を指標とした CSC の効率的な濃縮、幹細胞性を維持しながら培養できる適切な条件が必要である。

そこで本研究では、SOX2/GFP ノックインマウスを用いた発がん実験を行い、セルソーターでの SOX2 陽性細胞の分離、幹細胞培養条件を種々条件検討することで、SOX2/GFP を恒常的に発現する CSC の樹立を行うことを見出した。

3. 研究の方法

SOX2/GFP ノックインマウスを用いた発がん二段階実験により、SOX2 陽性細胞を取得する。手法は以下の通り (図 4 : 発がん実験は申請者が所属する菅沼研究室で既に確立されている)。

1. SOX2/GFP ノックインマウスの皮膚に対し、DMBA を塗布し、イニシエーションを行う。
2. 発がんプロモーターとして okadaic acid あるいは TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate) を週二回処理する。
3. 過形成、パピローマ、扁平上皮がん、それぞれの状態で組織を採取する。
4. 採取した組織をコラゲナーゼ I で処理し、セルソーターにより SOX2 陽性細胞を分取する。
5. SOX2 陽性細胞が CSC の表現系 (幹細胞マーカーの発現、スフェア形成能、造腫瘍能) を有していることを確認する。

以上より、SOX2 陽性細胞を取得すると同時に、過形成、パピローマ、扁平上皮がんが存在する SOX2 陽性細胞の割合、造腫瘍能の差異を比較し、CSC 樹立性との相関を検討する。

4. 研究成果

・発がん二段階実験

前述の発がん二段階実験を行い、実際に発がんプロモーターの塗布に伴い、SOX2 の発現が増加するかを調査した。その結果、control (acetone 塗布) では SOX2 陽性細胞が 6% であったのに対し、発がんプロモーター TPA、OA の処理ではそれぞれ SOX2 陽性細胞は 16%、29% へ増加していた (Figure 1)。このことから、確かにがん化の過程において SOX2 の発現が上昇していくことが確認された。現在これらの細胞のソーティングと培養条件について検討中である。

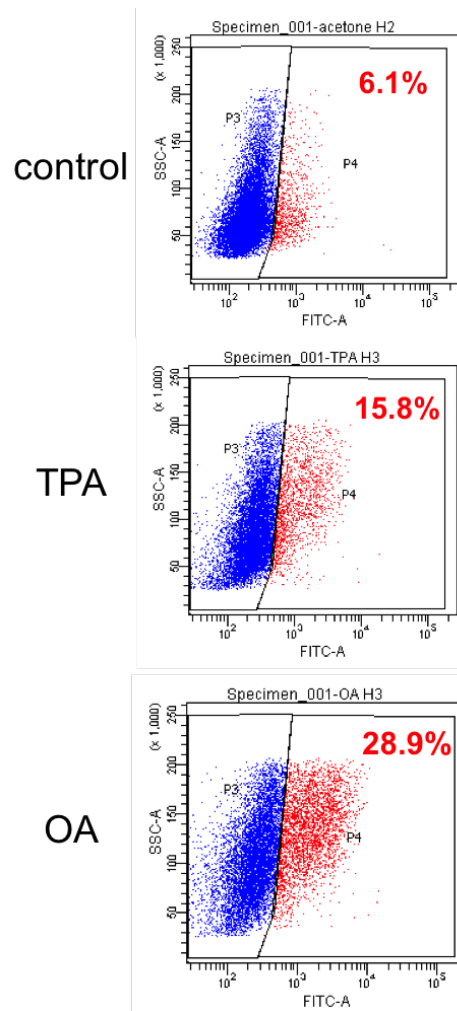


Figure 1. 発がんプロモーターによる SOX2 陽性細胞の増加

・細胞を軟化し転移能を促進する因子 AXL

細胞弾性は近年転移能を反映する表現系として注目されている。6種の肺がん細胞株を用いて SOX2 以外に転移能を促進する因子を探索したところ、受容体チロシンキナーゼの一つである AXL を見出した。

具体的には、6種の肺がん細胞株について、転移能を反映する細胞運動能と、細胞弾性を調査すると、これらは逆相関の関係にあり、柔らかい細胞ほど高い運動能を示すことが確認された (Figure 2)。そこで、この柔らか

く運動能の高い細胞群 (H1703, LC-AI, Lu99) で転移能を促進している因子を探索したところ、これら三種の細胞において AXL のリン酸化レベルが共通して高いことが見出された。(Figure 3)

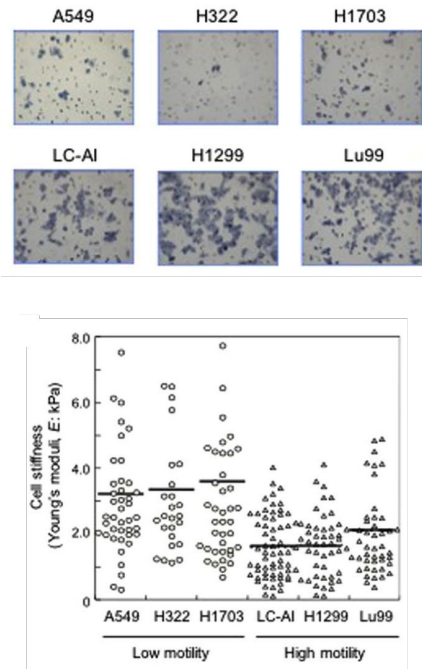


Figure 2. 6種の肺がん細胞株の運動能と細胞弾性

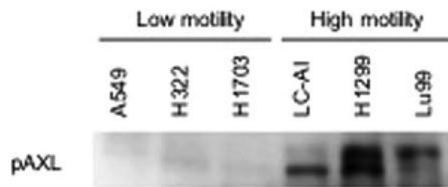


Figure 3. 運動能が高く軟化した細胞群でのAXLの高リン酸化

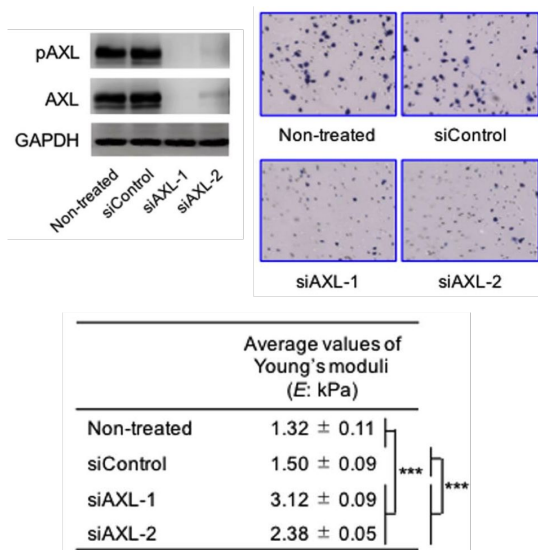


Figure 4. AXL をノックダウンした H1299 細胞での運動能低下と細胞弾性の増加
そこで AXL が運動能亢進と細胞軟化を誘

導しているとの仮説に基づき、H1299 細胞に対し 2 種の siRNA を用いて AXL をノックダウンした際の運動能と細胞弾性を調査した。その結果、AXL をノックダウンした細胞では、運動能は低下し、さらに細胞弾性は約 2 倍増加していた (Figure 4)。これらのことから AXL が細胞を軟化するとともに運動能を亢進していたことが示唆された。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 11 件)

- [1] Yoshida, W., Saikyo, H., Nakabayashi, K., Yoshioka, H., Bay, D. H., Iida, K., Kawai, T., Hata, K., Ikebukuro, K., Nagasawa, K. & Karube, I. Identification of G-quadruplex clusters by high-throughput sequencing of whole-genome amplified products with a G-quadruplex ligand. *Sci. Rep.* **8**, 3116 (2018). DOI:10.1038/s41598-018-21514-7
- [2] Oya, Y., Mondal, A., Rawangkan, A., Umsumarng, S., Iida, K., Watanabe, T., Kanno, M., Suzuki, K., Li, Z., Kagechika, H., Shudo, K., Fujiki, H. & Suganuma, M. Down-regulation of histone deacetylase 4, -5 and -6 as a mechanism of synergistic enhancement of apoptosis in human lung cancer cells treated with the combination of a synthetic retinoid, Am80 and green tea catechin. *J Nutr Biochem* **42**, 7-16 (2017). DOI: 10.1016/j.jnutbio.2016.12.015
- [3] Nakamura, T., Okabe, S., Yoshida, H., Iida, K., Ma, Y., Sasaki, S., Yamori, T., Shin-Ya, K., Nakano, I., Nagasawa, K. & Seimiya, H. Targeting glioma stem cells in vivo by a G-quadruplex-stabilizing synthetic macrocyclic hexaoxazole. *Sci. Rep.* **7**, 3605 (2017). DOI: 10.1038/s41598-017-03785-8
- [4] Maleki, P., Ma, Y., Iida, K., Nagasawa, K. & Balci, H. A single molecule study of a fluorescently labeled telomestatin derivative and G-quadruplex interactions. *Nucleic Acids Res.* **45**, 288-295 (2017). DOI: 10.1093/nar/gkw1090
- [5] Liu, X., Ishizuka, T., Bao, H. L., Wada, K., Takeda, Y., Iida, K., Nagasawa, K., Yang, D. & Xu, Y. Structure-Dependent Binding of hnRNPA1 to Telomere RNA. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 7533-7539 (2017). DOI: 10.1021/jacs.7b01599
- [6] Iida, K., Sakai, R., Yokoyama, S., Kobayashi, N., Togo, S., Yoshikawa, H. Y., Rawangkan, A., Namiki, K. & Suganuma, M. Cell softening in malignant progression of human lung cancer cells by activation of receptor tyrosine kinase AXL. *Sci. Rep.* **7**, 17770 (2017). DOI:

10.1038/s41598-017-18120-4

[7] Hirose, K., Tsuchida, M., Asakura, H., Wakui, K., Yoshimoto, K., Iida, K., Sato, M., Shibukawa, M., Suganuma, M. & Saito, S. A single-round selection of selective DNA aptamers for mammalian cells by polymer-enhanced capillary transient isotachopheresis. *Analyst* **142**, 4030-4038 (2017). DOI: 10.1039/c7an00909g

[8] Fujiki, H., Suttajit, M., Rawangkan, A., Iida, K., Limtrakul, P., Umsumarng, S. & Suganuma, M. Phorbol esters in seed oil of *Jatropha curcas* L. (saboondam in Thai) and their association with cancer prevention: from the initial investigation to the present topics. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **143**, 1359-1369 (2017). DOI: 10.1007/s00432-017-2341-6

[9] Yoshida, W., Yoshioka, H., Bay, D. H., Iida, K., Ikebukuro, K., Nagasawa, K. & Karube, I. Detection of DNA Methylation of G-Quadruplex and i-Motif-Forming Sequences by Measuring the Initial Elongation Efficiency of Polymerase Chain Reaction. *Anal. Chem.* **88**, 7101-7107 (2016). DOI: 10.1021/acs.analchem.6b00982

[10] Tsukakoshi, K., Ikuta, Y., Abe, K., Yoshida, W., Iida, K., Ma, Y., Nagasawa, K., Sode, K. & Ikebukuro, K. Structural regulation by a G-quadruplex ligand increases binding abilities of G-quadruplex-forming aptamers. *Chem. Commun.* **52**, 12646-12649 (2016). DOI: 10.1039/c6cc07552e

[11] Suganuma, M., Takahashi, A., Watanabe, T., Iida, K., Matsuzaki, T., Yoshikawa, H. Y. & Fujiki, H. Biophysical Approach to Mechanisms of Cancer Prevention and Treatment with Green Tea Catechins. *Molecules* **21**, 1566 (2016). DOI: 10.3390/molecules21111566

〔学会発表〕(計7件)

[1] 牧野 宏輝、飯田 圭介、荒井 孝義「光学活性アミノイミノフェノール-銅錯体を用いるエナンチオ選択的 3-ベンゾイルオキシピロロインドリン化合物の合成」日本化学会第98春季年会 2018年3月20日(火)~23日(金)、東京都 日本大学理工学部 船橋キャンパス

[2] 馬 悦、飯田 圭介、長澤 和夫「グアニン四重鎖と相互作用する大環状オキサゾール型蛍光リガンドの創製」日本化学会第98春季年会 2018年3月20日(火)~23日(金)、東京都 日本大学理工学部 船橋キャンパス

[3] 飯田 圭介「4本鎖DNAと結合する化合物の合成と評価」有機合成化学協会関東支部若手研究者のためのセミナー(招待講演) 2017

年7月8日(土)、東京都 東京大学

[4] 飯田圭介、酒井瞭、ソントヤアムサムアーン、アンチェリーラワン ガーン、菅沼雅美「受容体型チロシンキナーゼAXLの活性化はヒト非小細胞肺癌において 細胞弾性の低下とともに転移性の促進をもたらす」2016年10月06日~2016年10月08日、神奈川県横浜市 パシフィコ横浜

[5] 土田真帆、廣瀬和生、朝倉妃奈子、飯田圭介、佐藤誠、吉本敬太郎、菅沼雅美、渋川雅美、齋藤伸吾「高分子増強過渡的等速電気泳動法を用いるヒト非小細胞肺癌株 PC 9 結合型DNAアプタマーの選抜」第36回キャピラリー電気泳動シンポジウム、2016年11月09日~2016年11月11日、徳島県 徳島市 徳島大学 常三島キャンパス

[6] 吉岡仁美、飯田圭介、長澤和夫、池袋一典、軽部征夫、吉田亘「定量PCR法を用いた四重鎖中のメチル化DNA検出法の開発」第39回日本分子生物学会大会、2016年11月30日~2016年12月02日、神奈川県 横浜市 パシフィコ横浜

[7] 酒井瞭、飯田圭介、ラワンカーン アンチェリー、菅沼雅美「緑茶カテキンの細胞硬化を介した転移抑制機構における受容体型チロシンキナーゼAXL抑制の重要性」第89回日本生化学会大会、2016年09月25日~2016年09月27日、宮城県 仙台市 仙台国際センター、東北大学川内北キャンパス

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯田 圭介 (KEISUKE IIDA)

千葉大学・大学院理学研究院・助教

研究者番号：70719773