

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16573

研究課題名(和文)ゲノム脱メチル化により規定される大腸がん脱分化メカニズム解明

研究課題名(英文)Analysis of defined factor of de-differentiation of colon cancer stem cells

研究代表者

高橋 あかり (TAKAHASHI, Akari)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：80457697

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)：本研究において、ヒト大腸がん幹細胞の脱分化における分子メカニズムを解析した。ヒト大腸がん株SW480から分離した非がん幹細胞は、*in vitro* 培養においてがん幹細胞に脱分化することは無かったが、脱メチル化剤処理、*in vivo* での腫瘍形成によりSP細胞に脱分化した。脱分化メカニズムとして幹細胞関連分子SOX2、*in vivo* 腫瘍微小環境として線維芽細胞を検討したが、いずれも、MP細胞を脱分化させる事は無かった。脱メチル化により発現上昇する分子群で、脱分化に直接関与する分子特定には至らなかった。非がん幹細胞がどのように脱分化を遂げるか、その分子メカニズムが課題であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんは、多様な細胞集団からなりたつ。多様な細胞集団の中でも造腫瘍能が高く、治療抵抗性を示すがん細胞は、「がん幹細胞」として知られる。造腫瘍能が高い為、がん幹細胞に対する有効な治療法が必要となる。がん幹細胞は非がん幹細胞に分化すると、脱分化はあまりしないとされてきた。しかしながら、今回、ヒト大腸がんにおいて脱分化する経路が存在する事を確認した。その分子メカニズムの詳細については不明であったが、脱メチル化により発現誘導される遺伝子群、あるいは、腫瘍微小環境における刺激、が必要であることが示唆された。今後、がん幹細胞が出来るメカニズムを解明する事により、がん幹細胞に対する治療法への基盤とした

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the de-differentiation mechanisms of human colon cancer cells. Non-cancer stem cells (CSCs) derived from human colon cancer line SW480 did not show de-differentiation into CSC *in vitro* culture. However, non-CSCs de-differentiated into CSCs by (1) de-methylation and (2) *in vivo* tumor formation. We then analyzed the whether SOX2 a stem cell related factor or fibroblast one of a major cell component of tumor micro-environment, but both SOX2 and fibroblast are not sufficient for de-differentiation. We screened genes induced by de-methylation, but we could not identify the gene that is related to de-differentiation. Further analysis is needed to clarify the molecular mechanisms of de-differentiation.

研究分野：実験病理

キーワード：がん幹細胞 脱分化 メチル化 腫瘍微小環境 大腸がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) がんはゲノムレベル、エピゲノムレベルの多様性により、heterogenous な細胞亜集団から構成される。がん細胞のなかでもひととき造腫瘍能が高く、自己複製能および多分化能を備えた亜集団は「がん幹細胞」と定義される。さらに、がん幹細胞は化学療法、放射線療法、分子標的療法といった既存の治療法に抵抗性を示す。これらの性格を有する為に、治療後の再発や遠隔転移など、がん患者の生命予後を左右するイベントにがん幹細胞は深く関わり、がんの根治を目指す上で治療抵抗性がん幹細胞に対する有効な治療戦略が必要となる。

(2) がん幹細胞は、自己複製能を有すると共に、多分化能を有する。すなわち、分離したがん幹細胞を *in vitro* で培養する事により、非がん幹細胞への分化を観察する事が出来る。しかしながら一方では、非がん幹細胞からがん幹細胞へ脱分化する経路が存在する事も知られている (Chaffer et al., PNAS 2011)。我々は、ヒト大腸がんにおけるがん幹細胞の分化および脱分化を単細胞レベルで検討する為に、がん幹細胞クローンおよび非がん幹細胞クローンの樹立を試みた。ヒト大腸がん株 SW480 からは、Side population (SP) 細胞としてがん幹細胞を分離出来る事が報告されている (Haraguchi et al., Stem cells 2006, Inoda et al., Am J Pathol 2011)。そこで、我々は SW480 細胞からがん幹細胞として SP 細胞を、非がん幹細胞として main population (MP) 細胞分離し、単細胞培養を行った。その結果、SP 細胞から得られたクローン細胞 (SP クローン) は、MP 細胞から得られたクローン細胞 (MP クローン) と比較して高い SP 細胞比率を示し、また、免疫不全マウスにおいて高い造腫瘍能を示した (Takaya et al., PLoS One 2016)。これらの結果は SP クローンにがん幹細胞が濃縮されている事を示す。

(3) 非常に興味深い事に、SP クローン細胞は 2 か月以上の比較的長い *in vitro* 培養を経ても、比較的高い SP 細胞の含有率を示した。一方では、MP 細胞は *in vitro* 培養を経ても SP に脱分化する事は無く、安定した MP (非がん幹細胞) クローンであることが判明した。免疫不全マウスを用いた造腫瘍能試験では、SP クローン株は $10^2 \sim 10^3$ 個の細胞数で造腫瘍能を示した。その一方で MP クローン株を移植したマウスでは 10^4 個移植マウスにおいて 15 匹中 1 匹でのみ造腫瘍能を観察した。この結果は、SP クローンには安定して高いがん幹細胞が含まれる事を示唆すると同時に、MP 細胞から造腫瘍能を示す細胞 (すなわちがん幹細胞) が生じている事を示唆する。そこで、我々は MP クローンから出来た腫瘍から新たに細胞株を樹立し、SP 解析を行った。その結果 MP クローン腫瘍から樹立した細胞株からは SP 細胞を観察した。この結果は、*in vitro* において MP 細胞が脱分化する事は無かったが、*in vivo* において MP 細胞が脱分化を行った事を示唆し、MP クローンにも脱分化しうる可能性がある事を示す。

2. 研究の目的

(1) 上記研究結果から、MP クローン細胞が脱分化する分子群の発現がエピジェネティックに制御されるという仮説を立て、がん幹細胞と非がん幹細胞の分化と脱分化に関わる分子群を検索、機能解析を行う事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) MP クローン細胞を脱分化させる刺激に関して、エピジェネティックな制御を受ける遺伝子群が脱分化に関わる可能性を考え、MP 細胞をメチル化阻害剤 (5-AC) およびヒストンアセチル化酵素阻害剤 (VPA, TSA) にて処理し、SP 解析にて脱分化について検討する。

(2) MP 細胞を脱分化させた *in vivo* の腫瘍微小環境について検討するために、MP 細胞および線維芽細胞を共培養し、SP 細胞が出現するか検討する。

(3) SP 細胞に特異的に発現する遺伝子群を網羅的にスクリーニングする為、SP 細胞および MP 細胞から精製した RNA を用いて cDNA マイクロアレイ法を行う。

(4) 幹細胞関連分子である SOX2 および、我々が発見したがん幹細胞関連分子 DNAB8 が MP 細胞における脱分化に直接かわるか、それぞれの遺伝子につき MP 細胞に遺伝子導入を行い安定発現株を作製する。SOX2 安定発現株および DNAB8 安定発現株において、MP 細胞が脱分化を示すか SP 解析によって検討する。

(5) 先ず初めに、SW480 MP 細胞でメチル化によりサイレンシングされる遺伝子を網羅的に解析する。

我々のこれまでの検討から、SW480 MP 細胞の脱分化には、ゲノムメチル化によりサイレンシングされている遺伝子が関与する可能性が示唆される。この結果を踏まえ、本申請研究では先ず、SW480 MP 細胞においてゲノムメチル化によりサイレンシングされる遺伝子の網羅的解析を行う。具体的に、SW480 MP 細胞を脱メチル化剤 (5-aza-2 deoxycytidine (5-AC)) にて 48 時間処理後、total RNA を精製する。コントロール RNA との遺伝子発現をマイクロアレイ法にて網羅的にス

クリーニングする。また、SW480 MP 細胞から精製したゲノム DNA を用いてメチル化感受性制限酵素処理を行ったサンプルを用いてマイクロアレイ法にてスクリーニングを行う。

当該2種類のマイクロアレイ法にて、脱メチル化剤により発現が上昇し、実際にプロモーター領域がメチル化されている遺伝子群をスクリーニングし、SW480 MP 細胞脱分化の候補責任遺伝子とする。

4. 研究成果

(1) MP クローン細胞を、メチル化阻害剤(5-AC)およびヒストンアセチル化酵素阻害剤 (VPA, TSA)にて処理した。その結果、HDAC 阻害剤処理では MP クローン細胞から SP 細胞は観察されなかった。しかしながら、5-AC 処理にて MP クローン細胞から SP 細胞が、わずかながら観察された。この結果から、DNA メチル化によりサイレンシングされている分子が、MP 細胞から SP 細胞への脱分化に関わる事が示唆された。

(2) MP 細胞を免疫不全マウスに 10^4 個移植すると、15 匹中 1 匹において腫瘍形成がみられた。同腫瘍部位から採取されたがん細胞を解析すると、SP 細胞がみられた。この結果から、MP 細胞が *in vivo* における造腫瘍能を獲得する過程において、SP 細胞に脱分化していた可能性が示唆される。MP 細胞は *in vitro* の培養において SP 細胞を生み出すことは無かった。つまり、MP から SP 細胞に脱分化する上で、*in vivo* における腫瘍微小環境が重要であった可能性が示唆される。そこで、我々は腫瘍微小環境を作る主な細胞成分である線維芽細胞に脱分化のカギがあるのではないかと考え、*in vitro* において MP 細胞と線維芽細胞を共培養した。その結果 MP 細胞から SP 細胞への脱分化は観察されなかった。この結果から、腫瘍微小環境を作る線維芽細胞との接触では、MP 細胞の脱分化には不十分であることが示唆された。

(3) SP 細胞と MP 細胞の遺伝子発現の差異を網羅的に解析するため、cDNA マイクロアレイを行った。その結果、SP クローン細胞において、幹細胞関連分子 (SOX2, Oct3/4, NANOG, LGR5) 発現が高い事を見出した。また、MP 細胞において DNA メチル化関連分子 (SETD7, METTL9, NNMT, TRMT5, DNMT3A 等) 発現が高い事を見出した。これらの結果から、MP 細胞では DNA メチル化が亢進している可能性が示唆された。

(4) SP 細胞では SOX2 などの幹細胞関連分子が過剰発現していた。そこで、幹細胞関連分子として SOX2、がん幹細胞関連分子として DNAJB8 に、MP 細胞を脱分化させる機能があるのか検討した。MP 細胞に SOX2 あるいは DNAJB8 を過剰発現し、SP 解析を行った。その結果、MP 細胞に SOX2 を過剰発現させても、DNAJB8 を過剰発現させても SP 細胞は観察されなかった。この結果から、SOX2、DNAJB8 分子単独では脱分化を誘導するには不十分であることが確認された。

(5) MP 細胞を脱メチル化剤処理にて処理後に発現変化がみられる遺伝子群を網羅的に解析するため、cDNA マイクロアレイを行った。しかしながら、SOX2 などの幹細胞関連遺伝子群発現上昇は明確ではなかった。DNA メチル化によりエピジェネティックな発現制御を受ける遺伝子群は多くみられ、その多くの分子はがん幹細胞に関係ない分子群が多い印象であった。MP 細胞の脱分化に関わる遺伝子は DNA 脱メチル化により発現が誘導される様であるが、脱メチル化により発現が変化する遺伝子群はあまりに多く、特異的遺伝子群の絞り込みが必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Miyamoto S, Kochin V, Kanaseki T, Hongo A, Tokita S, Kikuchi Y, Takaya A, Hirohashi Y, Tsukahara T, Terui T, Ishitani K, Hata F, Takemasa I, Miyazaki A, Hiratsuka H, Sato N, Torigoe T.	4. 巻 Vol 6
2. 論文標題 The Antigen ASB4 on Cancer Stem Cells Serves as a Target for CTL Immunotherapy of Colorectal Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Immunol Res	6. 最初と最後の頁 358-369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2326-6066.CIR-17-0518.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kusumoto H, Hirohashi Y, Nishizawa S, Yamashita M, Yasuda K, Murai A, Takaya A, Mori T, Kubo T, Nakatsugawa M, Kanaseki T, Tsukahara T, Kondo T, Sato N, Hara I, Torigoe T.	4. 巻 Vol 109
2. 論文標題 Cellular Stress Induces Cancer Stem-Like Cells Through Expression of DNAJB8 by Activation of Heat Shock Factor 1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 741-750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13501.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Horibe R, Hirohashi Y, Asano T, Mariya T, Suzuki T, Takaya A, Saijo H, Shionoya Y, Kubo T, Nakatsugawa M, Kanaseki T, Tsukahara T, Watanabe K, Atsuyama E, Toji S, Hirano H, Hasegawa T, Takahashi H, Sato N, Torigoe T.	4. 巻 Vol 12
2. 論文標題 Brother of the Regulator of the Imprinted Site (BORIS) Variant Subfamily 6 Is a Novel Target of Lung Cancer Stem-Like Cell Immunotherapy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0171460
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0171460.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Inoue R, Hirohashi Y, Kitamura H, Nishida S, Murai A, Takaya A, Yamamoto E, Matsuki M, Tanaka T, Kubo T, Nakatsugawa M, Kanaseki T, Tsukahara T, Sato N, Masumori N, Torigoe T.	4. 巻 Vol 8
2. 論文標題 GRIK2 Has a Role in the Maintenance of Urothelial Carcinoma Stem-Like Cells, and Its Expression Is Associated With Poorer Prognosis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 28826-28839
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.16259.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yasuda K, Hirohashi Y, Mariya T, Murai A, Tabuchi Y, Kuroda T, Kusumoto H, Takaya A, Yamamoto E, Kubo T, Nakatsugawa M, Kanaseki T, Tsukahara T, Tamura Y, Hirano H, Hasegawa T, Saito T, Sato N, Torigoe T.	4. 巻 Vol 8
2. 論文標題 Phosphorylation of HSF1 at Serine 326 Residue Is Related to the Maintenance of Gynecologic Cancer Stem Cells Through Expression of HSP27	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 31540-31553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.16361.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----