

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16782

研究課題名（和文）炎症性ケモカインIL-8依存的に制御される癌幹細胞の同定と制御機構の解析

研究課題名（英文）Mechanism of IL-8 dependent regulation of cancer stem cells.

研究代表者

清水 幹容 (Shimizu, Masahiro)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：00774358

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：がん幹細胞は、転移や再発の原因の1つと考えられている特殊ながん細胞で、近年、がん幹細胞を標的とした治療が注目されている。本研究では、炎症性ケモカインIL-8に着目し、IL-8依存的に制御されるがん幹細胞の同定と制御機構の解明を目指したが、3次元スフェロイドを用いたシングルセル解析では同定には至らなかった。一方、研究の副次的な結果として、がんにおいて頻発するRAS遺伝子の変異がMAPK経路を介してCDK1活性化とタンパク質のO-GlcNAc修飾レベル増大を誘導し、最終的にSOX2の発現を促進することでがん幹細胞を発生させることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではがんを構成する細胞の不均一性に着目し、培養細胞を用いた3次元スフェロイドによるシングルセル解析を行ったが、本手法では実際のがんで見受けられる「細胞の不均一性」を完全には再現できなかったと推測される。予想された結果とは異なるが、患者由来の検体を用いた解析の重要性が改めて明らかとなった。一方、これまで遺伝子変異により生じるがん幹細胞発生機構は全く知られていなかったが、本研究ではがんにおいて頻発するRAS遺伝子の変異によるがん幹細胞発生機構を解明できた。したがって、本研究で明らかとなった機構を阻害する薬剤ががん幹細胞の発生を抑え、がんの転移や再発を抑制することができると期待される。

研究成果の概要（英文）：Cancer stem cells (CSCs) are a subset of tumor cells that exhibit self-renewal ability and generate the diverse cells that comprise the tumor. CSCs show increased quiescence and poor responses to conventional chemotherapy strategies that primarily kill proliferating cells. Therefore, CSCs are correlated with chemoresistance, invasion and relapse of cancer cells. In this study, we try to resolve a mechanism of CSCs population which is highly dependent on IL-8 using single cell analysis of sphere forming cells. However, we could not identify the IL-8 dependently regulated CSCs. In contrast, we showed that RAS/RAF/MAPK pathway-induced CDK1 activation is important for induction of O-GlcNAcylation, and this activation pathway is required for SOX2 expression and subsequent CSCs generation.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん幹細胞 CSC RAS SOX2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞 (Cancer Stem Cells, CSCs) は、腫瘍形成モデルの一つとして提唱されている細胞集団である。1997年に急性骨髄性白血病で初めてその存在が同定され、その後、多くの固形がんにも存在することが報告されてきた。CSCsは腫瘍形成能、自己複製能、薬剤耐性をもつとされ、近年、がんの転移や再発といった悪性化に対して、CSCsの重要性が指摘されている。よってCSCsの発生や機能を阻害することが出来れば非常に有用ながん治療法となることが期待されるが、その機構には不明な点が多い。

この問題に対し解析を進めたところ、以前より注目していた炎症性ケモカインであるIL-8が、タンパク質の糖修飾を介してがん幹細胞の機能を維持していることが明らかとなった。しかし、解析の過程で全てのCSCsがIL-8により制御されているわけではないこともわかってきた。そもそもがんとは特定の変異を持った細胞の塊ではなく、様々な遺伝的背景や特徴をもった多くの細胞集団で形成されている。近年、この「がん細胞の不均一性」が問題視されており、遺伝子発現の多様性から治療抵抗性を生じるため、がんの転移や再発が引き起こされがん患者の予後に影響を与えている (Nat Rev Cancer, 2017)。おそらくIL-8依存的に制御されるCSCsも遺伝子発現の違い、つまり「がん細胞の不均一性」により厳密に制御されていると推測されるが、その分子基盤は全くわかっていない。

2. 研究の目的

IL-8は炎症性の刺激に応じて、免疫系の細胞や炎症部位の細胞から分泌されるケモカインであり、CXCR1/2受容体を介して様々な遺伝子発現変化と細胞応答を引き起こす。そのためIL-8の発現は厳密に制御されており、正常な組織では検出できないほど非常に低い。一方でIL-8は、ほぼ全ての固形がんで高発現しており、その発現量はがんの転移や再発、生存率と相関関係があることが報告されている (Cancer Treat Rev, 2017)。従ってがん細胞からのIL-8の分泌は、がん微小環境内において重要な機能をもつと考えられる。

本研究では、IL-8で制御される細胞集団の違いに着目し、大腸がん細胞のCSCsをシングルセル単位で包括的に解析することで、「がん細胞の不均一性」がもたらすIL-8依存的なCSCs制御機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

解析を行う上で、実際のがん細胞の生物学的性質や不均一性をできる限り再現・維持しつつ、CSCsを単離するモデルが必要となるため、本研究ではスフェロイド培養を用いた。3次元培養法であるスフェロイド培養は、一般的な2次元培養法に比べてがん細胞の生物学的性質や不均一性をより反映している。また、スフェロイド培養はCSCsの特性を持つ細胞集団を選択的に増殖しうる培養法としても知られているため、スフェロイド培養を使用して以下の解析を行った。

(1) 大腸がん細胞HCT116のスフェロイドを作製し、セルソーターを用いてIL-8の受容体であるCXCR1およびCXCR2を発現している細胞集団と、発現していない細胞集団に分離した。その後、それぞれの細胞集団をシングルセル化した後に遺伝子発現解析およびデータ解析を行い、遺伝子発現パターンから、まずCXCR1/2の発現に依存的なCSCsサブグループ群を特定した。

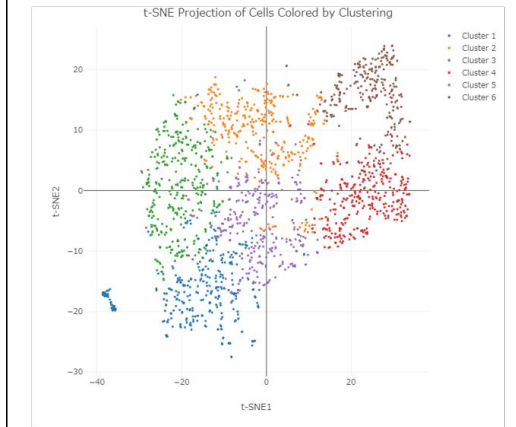
(2) 特定したサブグループ群を、それぞれセルソーターにより分離・回収し、IL-8存在下で各サブグループのスフェロイドを作製した。2次元培養由来の大腸がん細胞では、全体の約1%しかスフェロイドを形成することができないため、IL-8存在下で100%またはそれに近い細胞がスフェロイドを形成するサブグループを「IL-8依存的にCSCs機能を制御される細胞集団」として同定を試みた。

4. 研究成果

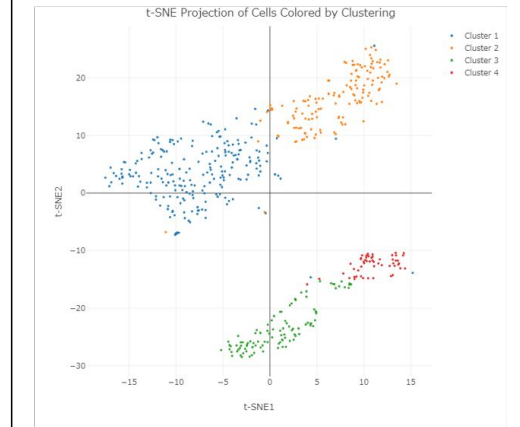
シングルセルでの網羅的な解析により、IL-8受容体の発現の有無によりいくつかのサブグループを得ることができた(図)。このうち、受容体を発現している細胞集団のサブグループ(図右)を解析したところ、Cluster4に含まれる細胞にいくつか特異的な遺伝子が発現していることがわかったため、各遺伝子が発現している細胞集団をセルソーターにより分離し、IL-8存在下でスフェロイド形成を行ったが、約2%の細胞がスフェロイドを形成するのみであった。そこで、各遺伝子の発現をノックダウンした際のスフェロイド形成を調べたが、大きな変化は見られなかった。その後、別のClusterにも着目したが、当初の目的である「IL-8依存的に制御されるがん幹細胞」の同定には至らなかった。培養細胞を用いた3次元スフェロイド形成では、実際のがんで見受けられる「細胞の不均一性」を完全には再現できなかったと推測される。

一方、研究の副次的な結果として、発がん性シグナルによるがん幹細胞発生機構が明らかとなった。がんにおいて頻発するRAS遺伝子の変異が下流のシグナル伝達経路であるMAPK経路を活性化することで、細胞周期制御因子CDK1の活性化とタンパク質翻訳修飾O-GlcNAc化を誘導し、幹細胞因子SOX2の発現を制御することでがん幹細胞が生じることを発見した。

IL-8受容体 陰性サブグループ



IL-8受容体 陽性サブグループ



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shimizu Masahiro, Shibuya Hiroshi, Tanaka Nobuyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Enhanced O-GlcNAc modification induced by the RAS/MAPK/CDK1 pathway is required for SOX2 protein expression and generation of cancer stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-06916-y	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 -
1. 著者名 Sato Atsushi, Shimizu Masahiro, Goto Toshiyasu, Masuno Hiroyuki, Kagechika Hiroyuki, Tanaka Nobuyuki, Shibuya Hiroshi	4. 巻 3
2. 論文標題 WNK regulates Wnt signalling and β -Catenin levels by interfering with the interaction between β -Catenin and GID	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 666
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-01386-2	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 -
1. 著者名 Shimizu Masahiro, Tanaka Nobuyuki	4. 巻 38
2. 論文標題 IL-8-induced O-GlcNAc modification via GLUT3 and GFAT regulates cancer stem cell-like properties in colon and lung cancer cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 1520 ~ 1533
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-018-0533-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimizu Masahiro, Shibuya Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 WNK1/HSN2 mediates neurite outgrowth and differentiation via a OSR1/GSK3 β -LHX8 pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-20271-y	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水 幹容, 澁谷 浩司, 田中 信之
2. 発表標題 CXCR2依存的ながん幹細胞集団の解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水 幹容, 田中 信之, 澁谷 浩司
2. 発表標題 IL-8依存的ながん幹細胞の制御機構の解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 清水 幹容, 田中 信之
2. 発表標題 IL-8はGLUT3とGFATを介してO-GlcNAc修飾を誘導し、癌幹細胞能を制御する
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

遺伝子変異によるがん幹細胞の発生に重要なシグナル経路を発見【清水幹容 助教、澁谷浩司 教授】
<https://www.tmd.ac.jp/press-release/20220228-1/>

「遺伝性の神経障害を引き起こすWNK1/HSN2変異体の機能解明」【澁谷浩司 教授、清水幹容 助教】
<https://www.tmd.ac.jp/press-release/20220926-1/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------