

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K20654

研究課題名(和文)高機能ハイドロゲル誘導癌幹細胞を制御するエピジェネティクス変異の解析

研究課題名(英文)Analysis of epigenetic mutations in hydrogel-induced cancer stem cells

研究代表者

鈴鹿 淳(Suzuka, Jun)

北海道大学・医学研究院・特任助教

研究者番号：90823328

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)：癌幹細胞は治療抵抗性を有するため、癌の根治には癌幹細胞を標的とした治療法の確立が求められる。しかし、癌幹細胞は癌組織中にはごく僅かしか存在しないため、解析が困難である。我々は生体適合性を有するハイドロゲルを用いた迅速な癌幹細胞誘導システムを確立した。本研究ではハイドロゲル上での幹細胞性誘導に關するエピジェネティックな変化について検討し、エピジェネティクス関連酵素の遺伝子発現変動に伴うヒストン修飾やDNAメチル化、転写因子のクロマチンアクセシビリティが変化することにより、癌幹細胞誘導に寄与することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌幹細胞については幹細胞性を有する細胞に発現するマーカー分子の存在は多数明らかになってきているものの、それらを治療標的とした検討は難渋している。また、癌幹細胞を検出する従来の方法は操作が煩雑であった。本研究ではハイドロゲルを用いた簡便な方法で癌幹細胞を誘導し、遺伝子発現制御の根幹にあるエピジェネティックな変化を検討することができた。簡単かつ効率的に癌幹細胞を扱うことができる本方法で、癌幹細胞特異的に発現するマーカー分子とエピジェネティックな変化の両側面から治療標的を探索することで、癌の根治に繋がる本質的な治療法の開発に結びつくものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells (CSCs) have been focused on therapeutic target for complete cure of cancer because of their resistance against therapeutics. However, the analysis of CSCs is difficult owing to a few number of them in cancer tissues. Our group has developed the rapid and efficient detection system of CSCs using biocompatible hydrogels. In this study, epigenetic changes involved in stem cell induction on hydrogels were investigated. We identified that the alteration of histone modification and DNA methylation by gene expression change of epigenetic enzymes and chromatin accessibility of some transcription factors regulated induction of cancer stemness on hydrogels.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：癌幹細胞 エピジェネティクス ハイドロゲル バイオマテリアル

# 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

癌組織中に存在する癌幹細胞は治療抵抗性を有し、再発の原因となるため、癌幹細胞を標的とした治療法の開発が求められる。しかし、癌組織内の癌幹細胞の数は極めて少数であることから、解析に向けて迅速かつ高効率に癌幹細胞を見出す方法が必要である。我々は北海道大学で開発された高機能ハイドロゲルを用いた癌細胞の培養による迅速な癌幹細胞誘導システムを開発し、長期間の培養で不可逆的に癌幹細胞の性質を誘導することを明らかにした。この現象には高機能ハイドロゲルからの刺激により生じた後天的な遺伝的仕組みの一つであるエピジェネティックな変化の関与が考えられる。

癌とエピジェネティクスに関わりについては、DNAメチル化に伴う癌抑制遺伝子の不活化、ヒストン修飾の変化に伴う癌関連遺伝子の発現変動が多数報告されており、癌の発生・進展に重要な役割を果たす。

## 2. 研究の目的

本研究では、高機能ハイドロゲル上での癌幹細胞誘導に關与する DNAメチル化やヒストン修飾、遺伝子発現を制御するオープンクロマチン領域に着目し、エピジェネティクス変異を解析することを目的とする。これらを明らかにすることで、癌幹細胞の発生機序の解明や癌幹細胞を標的とした新たな治療法の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

高機能ハイドロゲルには、poly-(2-acrylamide-2-methylpropanesulfonic acid) (PAMPS) ゲルと poly-(*N,N'*-dimethylacrylamide) (PDMAAm) ゲルを重合した Double network (DN) ゲルおよびゲル A の 2 種類を使用した。培養コントロールには、通常培養条件として用いられる polystyrene (PS) ディッシュを使用した。培養細胞株には、ヒト脳腫瘍細胞株 KMG4 を使用した。

各種ハイドロゲルおよび PS ディッシュ上で培養した KMG4 細胞を用いて、(1) 定量 RT-PCR 法および Western blotting 法によるヒストン修飾酵素の遺伝子発現レベルや修飾状態の解析、(2) DNAメチル化酵素阻害剤 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dC) およびヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 Trichostatin A (TSA) 処理による幹細胞関連分子の遺伝子発現変動解析、(3) オープンクロマチン領域解析に特化した ATAC-seq 法によるハイドロゲル上特異的に検出される転写因子結合モチーフの解析の 3 点を実施した。

## 4. 研究成果

### 【結果】

(1) エピジェネティック関連酵素の遺伝子発現については、PS ディッシュ上の細胞と比較して DN ゲルおよびゲル A で 3、7、14 日間培養した KMG4 細胞で H3K9 トリメチル化酵素 *SUV39H1* やヒストンリジンアセチル化酵素 *MORF* の遺伝子発現亢進が認められ、さらにゲル A では DN ゲルと比較してヒストンアセチル化酵素 *GCN5* や DNAメチル化酵素 *DNMT3A* の遺伝子発現亢進を認めた (図 1 A)。遺伝子発現結果を踏まえて H3K9me3 および H3K9ac の修飾状態を Western blotting 法にて検討すると、DN ゲルおよびゲル A 上では PS ディッシュと比較していずれも修飾亢進を認め、特にゲル A では DN ゲルよりも H3K9ac の亢進が 7 日目以降に顕著であった (図 1 B)。

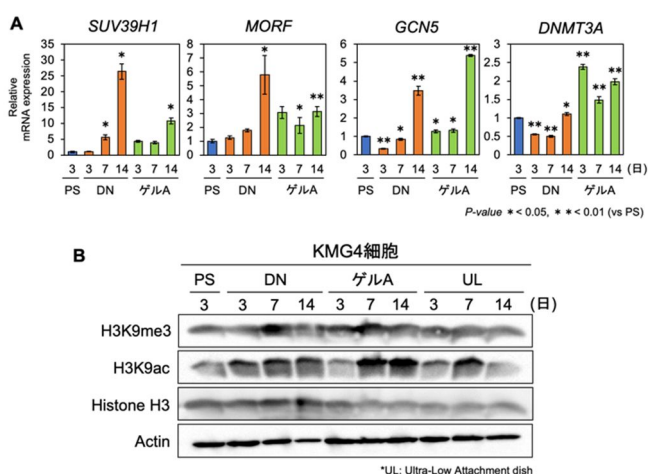


図 1 DN ゲル、ゲル A、PS ディッシュ上で培養 KMG4 細胞の遺伝子発現変動結果 (A) およびヒストン修飾解析結果 (B)

(2) ヒストン修飾の亢進が顕著であったゲルAに着目し、KMG4細胞にTSAを6時間、および5-Aza-dCを72時間事前投与し、ゲルA上にKMG4細胞を播種後、さらに隔日でそれぞれの薬剤を継続投与して14日間培養した。TSA添加群では事前および継続投与したPSディッシュおよびゲルA上で(図2A)、5-Aza-dC添加群では事前投与のみの群または事前および継続投与した群において(図2B)、幹細胞関連分子 *Nanog*、*Oct3/4* の遺伝子発現亢進を認めた。

(3) ATAC-seq法にてゲルA上で培養したKMG4細胞におけるオープンクロマチン領域を解析したところ、PSディッシュ上と比較してゲルA上でのみ特異的に検出される転写因子結合モチーフ配列が複数存在した(図3)。その中でも転写因子Xについて着目し、定量RT-PCR法にて遺伝子発現レベルを検証すると、ゲルA上で培養したKMG4細胞はPSディッシュ上と比較して発現が亢進していることが明らかとなった。

【考察】

エピジェネティックな変化は様々な遺伝子の発現制御に寄与する機構として知られており、幹細胞のみならず分化細胞の維持・誘導にも重要な役割を果たす。本研究においてゲルAで培養した脳腫瘍細胞株を用いた検討では、エピジェネティクス関連酵素の発現変動に伴うヒストンH3K9の修飾やDNAメチル化による幹細胞関連分子への関与や、オープンクロマチン領域については転写因子Xのクロマチンアクセシビリティの変化が認められた。転写因子Xについては、現在ノックダウン細胞株の作成に取り組んでおり、ゲルAにおける癌幹細胞制御メカニズムへの関与や治療応答性を詳細に検討する予定である。

【結語】

高機能ハイドロゲルAはヒストンH3K9の修飾やDNAメチル化、およびクロマチンアクセシビリティの変化を介して癌幹細胞を誘導することが示唆された。

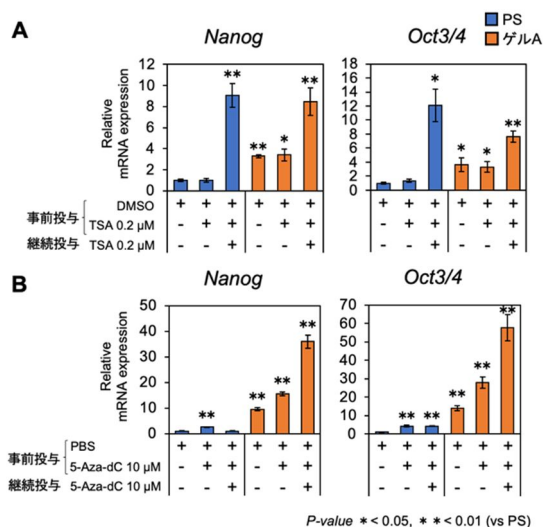


図2 ゲルA、PSディッシュ上培養KMG4細胞へのTSA (A) および5-Aza-dC (B) 投与による遺伝子発現変動結果

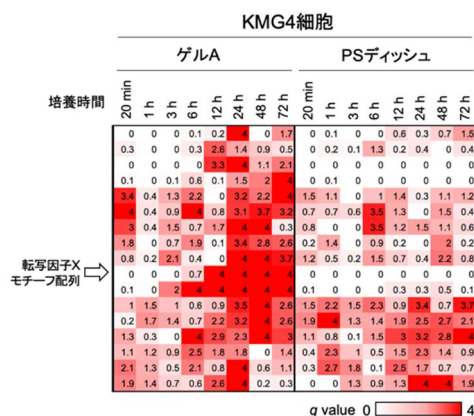


図3 ゲルA、PSディッシュ上培養KMG4細胞における各培養時間でのATAC-seq結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suzuka Jun, Tsuda Masumi, Wang Lei, Kohsaka Shinji, Kishida Karin, Semba Shingo, Sugino Hirokazu, Aburatani Sachiyo, Frauenlob Martin, Kurokawa Takayuki, Kojima Shinya, Ueno Toshihide, Ohmiya Yoshihiro, Mano Hiroyuki, Yasuda Kazunori, Gong Jian Ping, Tanaka Shinya	4. 巻 -
2. 論文標題 Rapid reprogramming of tumour cells into cancer stem cells on double-network hydrogels	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Biomedical Engineering	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/s41551-021-00692-2	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 Uemura Satoko, Wang Lei, Tsuda Masumi, Suzuka Jun, Tanikawa Satoshi, Sugino Hirokazu, Nakamura Toru, Mitsuhashi Tomoko, Hirano Satoshi, Tanaka Shinya	4. 巻 524
2. 論文標題 Signaling adaptor protein Crk is involved in malignant feature of pancreatic cancer associated with phosphorylation of c-Met	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 378 ~ 384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.105	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 -

〔学会発表〕 計23件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 寺島 祐樹、津田 真寿美、倉井 毅、鈴鹿 淳、王 磊、藤島 京祐、グン 剣萍、田中 伸哉
2. 発表標題 高分子ハイドロゲルによる滑膜肉腫幹細胞誘導メカニズムと細胞周期との関連性
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 榎枝 未紗、小田 義崇、津田 真寿美、飛騨 一利、藤井 恭子、杉野 弘和、谷川 聖、鈴鹿 淳、王 磊、石田 雄介、田中 伸哉
2. 発表標題 新規変異BRAFV601K変異を認める良性脳腫瘍（毛様体性星細胞腫）の一例
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hirokazu Sugino, Masumi Tsuda, Jun Suzuka, Lei Wang, Karin Kishida, Jian Ping Gong, Shinya Tanaka
2. 発表標題 Induction of cancer cell stemness through mechanosensitive ion channels
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 津田 真寿美、鈴鹿 淳、王 磊、田中 伸哉
2. 発表標題 EGFR、c-Met、PDGFR各阻害剤耐性膠芽腫細胞における血管内皮細胞様分化転換と代謝亢進
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中 伸哉、鈴鹿 淳、王 磊、津田 真寿美
2. 発表標題 高分子ハイドロゲルによる膠芽腫幹細胞へのリプログラミングと治療応用
3. 学会等名 第38回日本脳腫瘍病理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴鹿 淳、杉野 弘和、仙葉 慎吾、王 磊、津田 真寿美、黒川 孝幸、グン 剣萍、田中 伸哉
2. 発表標題 ハイドロゲル上で誘導される癌幹細胞性を規定する段階的な分子メカニズムの解析
3. 学会等名 2020年度文部科学省新学術領域研究 先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴鹿 淳、津田 真寿美、王 磊、田中 伸哉
2. 発表標題 癌幹細胞性を有するチロシンキナーゼ阻害剤耐性膠芽腫細胞におけるSFRP1とエピジェネティックな変化との関連性
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鉢呂 彩花、鈴鹿 淳、王 磊、津田 真寿美、田中 伸哉
2. 発表標題 薬剤X及びその誘導体を用いた抗腫瘍活性の評価および受容体型チロシンキナーゼに及ぼす影響
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Michio Tani, Masumi Tsuda, Jun Suzuka, Lei Wang, Akinobu Taketomi, Shinya Tanaka
2. 発表標題 CMKLR1 is a candidate molecular target for eradicating liver cancer stem cells
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shinya Tanaka, Jun Suzuka, Masumi Tsuda
2. 発表標題 Rapid induction of glioblastoma stem cells by biomaterial hydrogel
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masumi Tsuda, Jun Suzuka, Lei Wang, Shinji Kohsaka, Hiroyuki Mano, Shinya Tanaka
2. 発表標題 Development of rapid diagnosis of cancer stem cells using double-network hydrogels
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷 道夫、津田 真寿美、王 磊、鈴鹿 淳、杉野 弘和、グン 剣萍、武富 紹信、田中 伸哉
2. 発表標題 ハイドロゲル誘導肝癌幹細胞に対する新規治療法の開発
3. 学会等名 第122回北海道癌談話会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Zannatul Ferdous, Masumi Tsuda, Jean-Emmanuel Clement, Koji Tabata, Yusuke Ishida, Jun Suzuka, Jian Ping Gong, Shinya Tanaka, Tamiki Komatsuzaki
2. 発表標題 Analysis of cancer stem cells in sarcoma model cells by deep neural network
3. 学会等名 THE 21st RIES-HOKUDAI INTERNATIONAL SYMPOSIUM (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 津田真寿美、鈴鹿淳、王磊、田中伸哉
2. 発表標題 膠芽腫における受容体型チロシンキナーゼEGFR, c-Met, PDGFR阻害剤耐性メカニズムの解明
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jun Suzuka, Masumi Tsuda, Karin Kishida, Lei Wang, Takayuki Kurokawa, Kazunori Yasuda, Jian Ping Gong, Shinya Tanaka
2. 発表標題 Novel drug-screening system using hydrogel-induced cancer stem cells
3. 学会等名 第38回札幌国際がんシンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirokazu Sugino, Masumi Tsuda, Jun Suzuka, Lei Wang, Jian Ping Gong, Shinya Tanaka
2. 発表標題 Induction of cancer stem cell properties through mechanosensitive ion channels
3. 学会等名 第38回札幌国際がんシンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 津田真寿美、鈴鹿淳、王磊、高阪真路、小島進也、杉野弘和、岸田佳倫、間野博行、Jian Ping Gong、田中伸哉
2. 発表標題 高機能ハイドロゲルによる癌幹細胞へのリプログラミングと治療応用
3. 学会等名 第60回日本神経病理学会総会学術研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小田義崇、津田真寿美、久世瑞穂、湯澤明夏、王磊、杉野弘和、鈴鹿淳、谷川聖、石田雄介、グン剣萍、田中伸哉
2. 発表標題 ハイドロゲルによって誘導された髄膜腫幹細胞の解析
3. 学会等名 第38回分子病理研究会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 岸田佳倫、鈴鹿淳、石塚大暉、王磊、津田真寿美、黒川孝幸、安田和則、グン剣萍、田中伸哉
2. 発表標題 ハイドロゲル誘導癌幹細胞を制御するエピジェネティックな変化の解析
3. 学会等名 第16回日本病理学会カンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴鹿淳、津田真寿美、王磊、岸田佳倫、黒川孝幸、グン剣萍、田中伸哉
2. 発表標題 ハイドロゲルを用いた迅速な癌幹細胞誘導法の開発および治療への応用
3. 学会等名 2019年度文部科学省新学術領域研究 先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴鹿淳、津田真寿美、王磊、田中伸哉
2. 発表標題 高分子ハイドロゲルを用いた癌幹細胞標的新規薬剤スクリーニング法の開発
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masumi Tsuda, Shinji Kohsaka, Jun Suzuka, Lei Wang, Jian Ping Gong, Hiroyuki Mano, Shinya Tanaka
2. 発表標題 Single cell RNA sequencing of cancer stem cells rapidly generated by hydrogels
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岸田佳倫、鈴鹿淳、石塚大暉、王磊、津田真寿美、黒川孝幸、安田和則、グン剣萍、田中伸哉
2. 発表標題 ハイドロゲル上での癌幹細胞性を規定するエピジェネティックな変化の解析
3. 学会等名 第120回北海道癌談話会例会
4. 発表年 2019年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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