

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07577

研究課題名（和文）がん幹細胞発生でのAktシグナル経路によるエピゲノム制御と代謝制御の解明

研究課題名（英文）Elucidation of epigenomic and metabolic control by Akt signaling in the development of cancer stem cells

研究代表者

関田 洋一（Sekita, Yoichi）

北里大学・理学部・准教授

研究者番号：20431950

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：がん組織は、ほとんどの場合、組織内にさまざまな種類の細胞を含んでおり、このような性質を「がん組織の不均一性（heterogeneity）」という。がん治療が難しいのは、がん組織を構成する細胞種ごとに、薬剤や放射線への影響が異なることが大きな原因となっている。がん組織のheterogeneityを生み出すメカニズムとして、がん幹細胞（cancer stem cell, CSC）の存在が重要だと考えられている。本研究では、CSCが発生する分子機構の解明を目指して、シグナル伝達経路の役割についての解析と、脳腫瘍の一種である膠芽腫由来細胞を使ったCSCを可視化する実験系の構築を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん幹細胞は、がん治療が困難であることの元凶だと考えられるが、その発生メカニズムなど生物学的な知見は乏しい。本研究で得られた、がん幹細胞とAKTシグナル経路の関連や、がん幹細胞を可視化する実験系は、がん幹細胞の基礎研究に貢献すると考えられる。また、がん幹細胞発生に関する遺伝子の探索や治療薬の探索に活用される可能性を持っている。

研究成果の概要（英文）：Cancer tissues, in most cases, contain various types of cells within the tissue, a characteristic referred to as 'heterogeneity of cancer tissues'. One of the major reasons why cancer treatment is difficult is that the impact of drugs and radiation varies depending on the type of cell that forms the cancer. The existence of cancer stem cells (CSC) is considered important as a mechanism that creates the heterogeneity of cancer tissues. In this study, we aimed to elucidate the molecular mechanism of CSC formation, and conducted an analysis of the role of signal transduction pathways, and the construction of an experimental system to visualize CSC using cells derived from glioblastoma, a type of brain tumor.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：がん幹細胞 エピジェネティクス AKTシグナル 膠芽腫

1. 研究開始当初の背景

がん組織は、ほとんどの場合、組織内にさまざまな種類の細胞を含んでおり、このような性質を「がん組織の不均一性 (heterogeneity)」という。がん治療が難しいのは、がんを構成する細胞種ごとに、薬剤や放射線への影響が異なることが大きな原因となっている。がん組織の heterogeneity を生み出すメカニズムとして、がん幹細胞 (cancer stem cell, CSC) の存在が重要だと考えられている。CSC はがん組織中に少数存在し、さまざまながん細胞へと分化する能力を持つ。CSC がどのように出現してくるのかということに関しては、二つの仮説が考えられている。一つは、健全な生体に存在する体性幹細胞や前駆細胞ががん化するというもの、もう一つは、終末分化した体細胞から生じたがん細胞が、脱分化することによって CSC となるというものである。現時点では、どちらが正しいのか、あるいは全く別の機構があるのか、不明なことが多く残っている。

私たちは、iPS 細胞研究から、細胞の増殖を促進したり代謝を活性化したりすることで知られる AKT シグナル経路が、細胞の初期化や脱分化にも重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。iPS 細胞は、最終分化した細胞に 3 種類ないし 4 種類の転写因子 (山中因子) を強制発現させて、脱分化させることで作製される。この過程で、AKT シグナル経路を人為的に活性化すると、細胞の脱分化が強力に促進され、iPS 細胞の産生効率が大幅に上昇する。私たちは、AKT シグナル経路の活性化による脱分化の促進機構として、代謝経路のリモデリングによるアルファケトグルタル酸 (αKG) の産生亢進と、αKG を補因子としながら DNMT 脱メチル化反応に働く TET の発現上昇が誘導されること、そして、それらの相乗効果としてゲノム DNA の脱メチル化を含むエピジェネティックリプログラミングが促進されることを明らかにしたのである。多くのがん組織では AKT シグナル経路が異常に活性化している。そのことと、活性化 AKT が細胞の初期化や脱分化を促進することから、がん細胞の脱分化を促進し、CSC を誘導しているという仮説が考えられたが、CSC における AKT シグナルの役割は分かっていない。

一方、脳の神経膠細胞が腫瘍化した膠芽腫 (glioblastoma multiforme, GBM) では、CSC の出現に細胞の脱分化が関わっていることを示唆する現象が知られている。GBM 組織内にも CSC が存在し、これにより組織内の heterogeneity が生じていると考えられているが、GBM 細胞では、がん幹細胞状態と非がん幹細胞状態を双方向に遷移する、state transition という現象が観察されているのである。GBM 細胞が State transition を起こすため、CSC を標的とした治療だけでは、一時的に CSC を消失させられたとしても、非がん幹細胞 (non-CSC) から再び CSC が生じるために治療が難しくなっていると考えられる。State transition の機構はほとんどわかっていないが、細胞の脱分化が関わっていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、2つのアプローチで、がん幹細胞の出現機構の解明を目指した。1つ目は、AKT シグナルが脱分化を促進することに着目し、AKT の活性化とがん細胞のがん幹細胞化の関係を調べることである。もう一つは、GBM 細胞を利用して、state transition を可視化し、その分子機構を解明するというものである。

3. 研究の方法

(1) がん細胞での活性化 AKT とがん幹細胞化の関係を調べるため、非がん幹細胞である乳がん由来の細胞株 (MDA-MB-231) と卵巣がん由来の細胞株 (OVISE) で人為的に AKT を活性化した。細胞に、ミリスチル化した AKT と改変エストロゲン受容体の融合タンパク質 (AKT-Mer) をレンチウイルスによって遺伝子導入した。培養液に Mer のリガンドであるヒドロキシタモキシフェン (4OHT) を投与することにより AKT を活性化した。

(2) GBM 細胞の state transition を可視化するため、がん幹細胞マーカーの CD133 をコードする *PROM1* 遺伝子などの発現制御領域の下流で、蛍光タンパク質 (GFP など) を発現するレンチウイルスベクターを構築し、これを浮遊培養下の GBM 細胞に遺伝子導入した。CD133 と GFP を共発現する細胞を FACS により採取した。また、GFP 蛍光を培養下で経時的に観察した。

4. 研究成果

(1) AKT-Mer を遺伝子導入した MDA-MB-231 と OVISE を、4OHT の存在下と非存在下で培養した。MDA-MB-231 では、AKT 活性化の有無で、がん幹細胞マーカーを発現する細胞数はほとんど変化しなかった。OVISE では、AKT 活性化により、わずかにがん幹細胞マーカーを発現する細胞数が上昇する傾向が見られたが、有意差はなかった。がん幹細胞には、無血清培地で浮遊培養すると、スフェアを形成するという特徴がある。AKT 活性化によるスフェア形成能を調べたところ、MDA-MB-231、OVISE いずれにおいても、有意な差は見られなかった。

(2) GBM 細胞の、培養条件下での state transition 確認するため、無血清培地で浮遊培養した細胞中の、CD133 の陽性細胞の割合 (陽性率) を免疫染色と FACS により測定した。本研究で使用

している細胞系列では CD133 陽性率は約 30%であった。ソーティングにより、CD133 陽性細胞と陰性細胞をそれぞれ単離し、25 日間培養したところ、陰性細胞集団から約 30%の CD133 陽性細胞が出現した(図 1)。このことは、本研究で使った GBM 細胞が、培養条件下で state transition を起こしていることを示唆している。一方、CD133 陽性および 陰性細胞集団間で、がん幹細胞の特徴であるスフェア形成能に顕著な違いはなかった。また、神経系列細胞の分化マーカーの発現を RT-qPCR で測定したところ、2つの集団間で顕著な発現差があるマーカーはなかった。

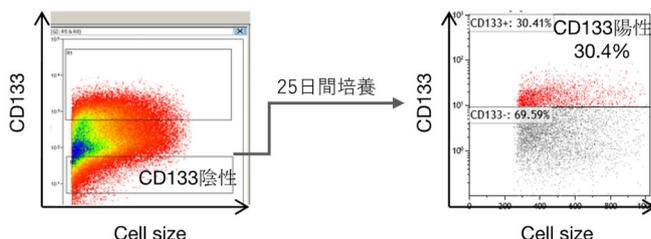


図1 GBM 細胞の state transition

CD133 陰性細胞を 25 日間培養すると、CD133 陽性細胞が出現した。このことは、非がん幹細胞が state transition によってがん幹細胞化したことを示唆している。

CD133 発現細胞をリアルタイムで観察するために、*PROM1* 遺伝子 (CD133 をコードする遺伝子) など、がん幹細胞状態で特異的に発現するいくつかの遺伝子の発現制御エレメント (プロモーターなど) の制御下で GFP を発現するトランスジーンを複数作製した。トランスジーンの一つをレンチウィルスベクターで GBM 細胞に導入して、まず CD133 と GFP の共陽性 (DP) 細胞を FACS で採取した。数週間培養すると、CD133 と GFP の共陰性 (DN) 細胞が出現したので、それらを FACS で採取して培養した。この時の培養では、経時的に GFP の蛍光を定点観察した。すると、播種直後にはすべて GFP 陰性だったが、4 時間後に GFP 陽性となった細胞が出現した(図 2、矢頭)。この細胞は、11 時間後まで陽性であったが、12 時間後までに再び GFP 陰性となった。また別の細胞は、播種後 9 時間は GFP 陰性であったが、10 時間後までに陽性となった(図 2、矢印)。このような GFP 陽性状態と陰性状態を遷移する現象は、state transition と連動している可能性が考えられた。

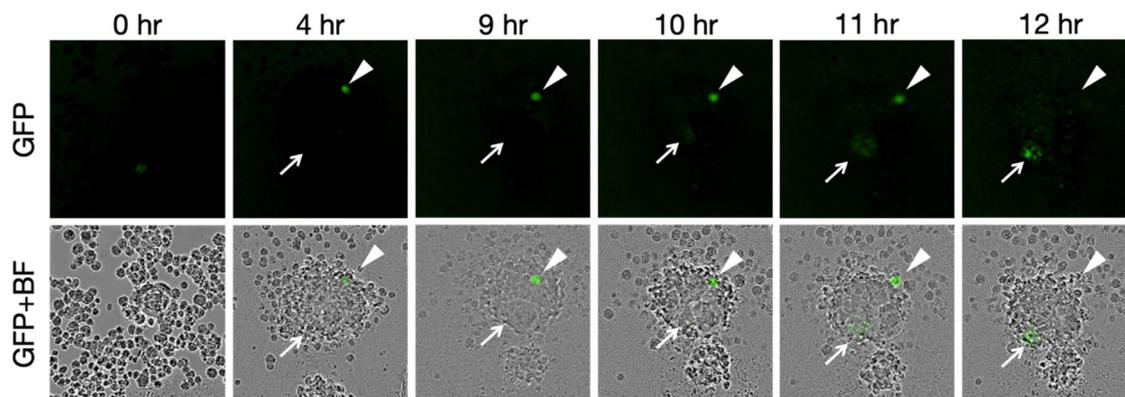


図2 *PROM1*-GFP による state transition の可視化

トランスジーンを導入した GBM 細胞から、CD133/GFP DN 細胞を取得し、播種、定期的に定点観測した。矢頭の細胞は 4 時間後に GFP 陽性となり、11~12 時間後に再び陰性となった。矢印の細胞は、9 時間後まで陰性で、9~10 時間後に陽性となっていた。このような GFP の発現変動は、state transition と連動している可能性がある。

本研究によって、GBM 細胞の state transition を可視化したと考えられる細胞を作製できた。今後、この細胞を使って、state transition における AKT の役割の解明や、state transition の分子メカニズムの解明、state transition の抑制化合物の探索などを行っていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kojima Shin, Shiochi Naoya, Sato Kazuki, Yamaura Mamiko, Ito Toshiaki, Yamamura Nodoka, Goto Naoki, Odamoto Mika, Kobayashi Shin, Kimura Tohru, Sekita Yoichi	4. 巻 50
2. 論文標題 Epigenome editing reveals core DNA methylation for imprinting control in the Dlk1-Dio3 imprinted domain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 5080 ~ 5094
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkac344	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 Ito Toshiaki, Ohta Masami, Osada Atsuki, Nishiyama Akira, Ishiguro Kei Ichiro, Tamura Tomohiko, Sekita Yoichi, Kimura Tohru	4. 巻 28
2. 論文標題 Switching defective/sucrose non fermenting chromatin remodeling complex coordinates meiotic gene activation via promoter remodeling and Meiosin activation in female germline	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 15 ~ 28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12990	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 関田 洋一、木村 透	4. 巻 95
2. 論文標題 AKTシグナルによる細胞初期化促進の分子機構	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 66 ~ 71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950066	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 Ito Toshiaki, Osada Atsuki, Ohta Masami, Yokota Kana, Nishiyama Akira, Niikura Yuichi, Tamura Tomohiko, Sekita Yoichi, Kimura Tohru	4. 巻 11
2. 論文標題 SWI/SNF chromatin remodeling complex is required for initiation of sex-dependent differentiation in mouse germline	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 24074
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-03538-8	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 Sekita Yoichi, Sugiura Yuki, Matsumoto Akari, Kawasaki Yuki, Akasaka Kazuya, Konno Ryo, Shimizu Momoka, Ito Toshiaki, Sugiyama Eiji, Yamazaki Terushi, Kanai Eriko, Nakamura Toshinobu, Suematsu Makoto, Ishino Fumitoshi, Kodera Yoshio, Kohda Takashi, Kimura Tohru	4. 巻 12
2. 論文標題 AKT signaling is associated with epigenetic reprogramming via the upregulation of TET and its cofactor, alpha-ketoglutarate during iPSC generation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 510
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13287-021-02578-1	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 Kanzaki Satoko, Tamura Shiori, Ito Toshiaki, Wakabayashi Mizuki, Saito Koji, Kato Shigeki, Ohta Yasutaka, Sekita Yoichi, Kimura Tohru	4. 巻 160
2. 論文標題 Involvement of Nr1p9a/b/c in mouse preimplantation development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Reproduction	6. 最初と最後の頁 181 ~ 191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/REP-19-0516	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 Wakabayashi Mizuki, Tamura Shiori, Kanzaki Satoko, Kosugi Mayuko, Yoshimura Yuki, Ito Toshiaki, Nagata Kei, Sato Kazuha, Takada Shuji, Sekita Yoichi, Kimura Tohru	4. 巻 534
2. 論文標題 Five multicopy gene family genes expressed during the maternal-to-zygotic transition are not essential for mouse development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 752 ~ 757
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.11.004	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 Murakami Koichi, Sasaki Haruka, Nishiyama Akira, Kurotaki Daisuke, Kawase Wataru, Ban Tatsuma, Nakabayashi Jun, Kanzaki Satoko, Sekita Yoichi, Nakajima Hideaki, Ozato Keiko, Kimura Tohru, Tamura Tomohiko	4. 巻 22
2. 論文標題 A RUNX-CBF -driven enhancer directs the Irf8 dose-dependent lineage choice between DCs and monocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 301 ~ 311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-021-00871-y	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16件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 関田洋一
2. 発表標題 AKTシグナル経路による、iPS細胞作製過程での、代謝リモデリングを介したエピゲノム制御機構
3. 学会等名 第19回北里疾患プロテオーム研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関田洋一、児島進、塩地直弥、木村透
2. 発表標題 エピゲノム編集によるDIK1-Dio3インプリントドメインでのDNAメチル化の機能解析
3. 学会等名 第15回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関田洋一
2. 発表標題 エピゲノム編集によるDIK1-Dio3インプリントドメインでのDNAメチル化の機能解析
3. 学会等名 第45回分子生物学会ワークショップ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoichi Sekita, Shin Kojima, Naoya Shiochi, Tohru Kimura
2. 発表標題 Epigenome editing reveals core DNA methylation for imprinting control in the DIK1-Dio3 imprinted domain.
3. 学会等名 The 21st Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoichi Sekita, Shin Kojima, Naoya Shiochi, Tohru Kimura
2. 発表標題 Epigenome editing reveals core DNA methylation for imprinting control in the Dlk1-Dio3 imprinted domain.
3. 学会等名 Genomic Imprinting, from Biology to Disease (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 御園杏里、山崎瑛司、中村肇伸、木村透、関田洋一
2. 発表標題 STELLAによるZFP57の制御機構の解析
3. 学会等名 第45回分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 永田圭、小杉真由子、大谷舞衣、池田優美、吉川友里香、板倉陽子、豊田雅士、関田洋一、木村透
2. 発表標題 性染色体がコードするヒストン脱メチル化酵素KDM5CとKDM5Dのマウス胚発生における機能的差異と相同性
3. 学会等名 第45回分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横田佳奈、田村史織、永田圭、神崎理子、関田洋一、木村透
2. 発表標題 Nl rp5及びNl rp9の雌マウスの生殖能における役割
3. 学会等名 第45回分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 太田昌美、伊藤駿瑛、長田純輝、 西山晃、石黒啓一郎、田村智彦、関田洋一、木村透
2. 発表標題 SWI/SNFクロマチンリモデリング複合体による生殖細胞の性分化開始機構
3. 学会等名 第45回分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塩地直弥、児島進、木村透、関田洋一
2. 発表標題 エピゲノム編集ツールを用いたインプリントIG-DMRにおけるDNAメチル化の機能解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤駿瑛、長田純輝、太田昌美、横田佳奈、西山晃、新倉雄一、田村智彦、関田洋一、木村透
2. 発表標題 SWI/SNFクロマチンリモデリング複合体による生殖細胞の性分化開始機構の解明
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田村史織、神崎理子、伊藤駿瑛、若林美月、横田佳奈、斉藤康二、加藤重城、太田安隆、関田洋一、木村透
2. 発表標題 着床前および着床後の発生に関与する母性因子としてのNLRP9
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永田圭、小杉真由子、大谷舞衣、池田優美、吉川友里香、板倉陽子、豊田雅士、関田洋一、木村透
2. 発表標題 性染色体がコードするヒストン脱メチル化酵素KDM5CとKDM5Dのマウス胚発生における機能的差異と相同性
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西山晃、村上紘一、佐々木悠、関田洋一、木村透、田村智彦
2. 発表標題 RUNX-CBFbによって駆動されるIrf8エンハンサーが単球か樹状細胞かの系譜選択を決定する
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長田純輝、伊藤駿瑛、西山晃、田村智彦、関田洋一、木村透
2. 発表標題 SWI/SNFクロマチンリモデリング複合体による始原生殖細胞の性分化制御機構
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 児島進、塩地直弥、木村透、関田洋一
2. 発表標題 DNA脱メチル化ツールを用いたIG-DMRにおけるDNAメチル化の機能解析
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020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
研究 分担者	松本 俊英 (Matsumoto Toshihide) (10623184)	北里大学・医学部・講師 (32607)	
研究 分担者	木村 透 (Kimura Tohru) (50280962)	北里大学・理学部・教授 (32607)	

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