

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21484

研究課題名(和文) 時計遺伝子の機能不全による「がん幹細胞」発生機序の解明と抗がん剤耐性克服法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the generation mechanism of cancer stem cells from circadian clock defective cells and development of strategy for overcoming of chemoresistance

研究代表者

小柳 悟 (Koyanagi, Satoru)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：60330932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,700,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍は不均一な細胞集団によって形成され、線維芽細胞、上皮細胞、免疫担当細胞などが微小環境を構成している。それら細胞は腫瘍の増殖や抗がん剤耐性などにも寄与しているが、がん細胞のなかには「がん幹細胞」という特殊な細胞集団が存在し、がんの再発や抗がん剤耐性などにおいて中心的な役割を担っている。本研究では時計遺伝子の機能不全マウスから調製した正常細胞が形質転換するとがん幹細胞様の特性と抗がん剤耐性を示すことを見出し、そのメカニズム解析と薬剤耐性の改善法について検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、細胞のがん化における時計遺伝子の新たな機能的役割が明らかになった。すなわち、時計遺伝子の発現や機能が低下した細胞が形質転換すると、抗がん剤に対しても高い抵抗性を示す悪性度の高いがん幹様細胞が生じ易くなることが判明した。また、この機序として時計遺伝子によってヒストンのアセチル化状態の変化やmiRNAの発現変容が関与することが示唆された。時計遺伝子の発現回復は、がん細胞の浸潤・転移能を低下させたと共に、その制御下にある因子の機能を阻害すると抗がん剤耐性も改善したことから、概日時計機構を標的とすることは悪性度の高いがん細胞に対する治療戦略のひとつになる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Tumor tissue is composed of not only cancer cells, but also numerous non-cancer cells such as fibroblasts, epithelial cells, and various types of immune cells. Those tumor microenvironmental cells support tumor growth and resistance to chemotherapy. Some specific tumor cell populations present as cancer stem-like cells (CSCs) have a high malignant potential and resistance to chemotherapy, due to their high differentiation and self-renewal capacities. Although disruption of host circadian clock machinery has been implicated in tumorigenesis, we found low expression levels of clock gene in CSCs, but not in non-CSCs in tumor tissue. Introduction of oncogenes into fibroblasts, prepared from clock gene defective animals, induced malignant transformation of cells which exhibit stemness properties. These results provide molecular link connecting circadian clock with cancer stemness and aid to develop the strategy for treatment of malignant tumors.

研究分野：時間薬剤学

キーワード：概日時計 時計遺伝子 がん幹細胞 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

一般に、腫瘍は不均一な細胞集団によって形成され、線維芽細胞、上皮細胞、浸潤した免疫担当細胞などが腫瘍微小環境を構成している(1)。それら細胞は腫瘍の増殖や抗がん剤耐性などにも寄与しているが、がん細胞のなかには高い増殖能と耐性を有する「がん幹細胞」が存在し、増殖・転移・再発などにおいて中心的な役割を担っている。そのため、がんを根治するには、がん幹細胞を根絶することが重要となるが、これら幹細胞は抗がん剤や放射線照射などに対して高い抵抗性を示し、その治療法の開発には試行錯誤が続けられている。

一方、生体機能の概日リズムを制御する体内時計の機能は、夜間における光照射や不規則な生活の繰返しなどによって低下し、がん、糖尿病、心疾患などの発症リスクを増大させることが知られている(2)。生体機能の概日リズムは時計遺伝子と呼ばれる一連の遺伝子群が約24時間周期で発現の増減を繰り返すことで引き起こされる。時計遺伝子群は「転写促進因子」と「転写抑制因子」が互いの発現を調節することでリズムを発振するが(3)、この機構の慢性的な不調や変容は、細胞のがん化や腫瘍の成長を促すことが指摘されていた(4)。しかしながら、フローサイトメーターを用いた解析などにおいて「がん幹細胞マーカー」を高発現する細胞集団では時計遺伝子の発現が顕著に抑制されていることが明らかになり、時計遺伝子とがん細胞の幹様性・悪性度との関連性が指摘されるようになっていた。

2. 研究の目的

時計遺伝子の機能不全動物から調整した線維芽細胞にがん遺伝子を導入すると、がん幹細胞マーカーを高発現する悪性の形質転換が高頻度に誘導されることを見出したことから、本研究では時計遺伝子の機能低下によってがん幹様細胞が発生するメカニズムを解明と抗がん剤耐性の機序を明らかにすることを目的に、その原因となる分子の同定と低下した時計機能を回復させる手法について検討を行った。

3. 研究の方法

3-1. 細胞培養

時計遺伝子 *Period2* の機能不全 (*Per2^{m/m}*) マウスから定法にて胚線維芽細胞を調製し、10% Fetal bovine serum (FBS)を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 培地中で 37°C、5%CO₂ 条件下で培養した。マウス乳がん細胞株 4T1 細胞は、American Type Culture Collection より購入し、10% FBS を含む RPMI Medium 1640 培地で 37°C、5% CO₂/大気条件下で培養し、各実験に用いた。

3-2. がん遺伝子導入による形質転換

がん遺伝子 H-Ras^{V12} と SV40LT の翻訳部位を導入した pBABE-puro retroviral vector (RTV-001-PURO) をパッケージング PT67 細胞にトランスフェクトすることでウイルス液を作成し、正常マウスおよび *Per2^{m/m}* マウス細胞から調製した線維芽細胞に2週間曝露し、細胞の悪性形質転換能を評価した。

3-3. 足場非依存性細胞増殖能の測定

足場非依存性増殖能(コロニー形成能)の測定には 96-Well Cell Transformation Assay Kit を使用した。播種後7日目に形成されたスフェロイドの核を Hoechst33342 で染色し、BZ-X800 オールインワン蛍光顕微鏡を用いてスフェロイドを撮影した。得られた画像を用い、スフェロイドの数と大きさを BZ-X analyzer で解析した。

3-4. 抗がん剤による殺細胞効果の測定

96well プレートにがん化した各細胞液を 1×10^3 cell/well ずつ播種し、24 時間後に Methotrexate (MTX)、Gemcitabin (GEM)、Etoposide (VP-16)、Vincristine (VCR)、Oxaliplatin (L-OHP) を添加した。48 時間後の生細胞数を ATP 含量を指標に評価した。

3-5. 実験動物および担癌モデルマウスの作製

SCID 雄性マウスおよび BALB/cN Sea 雌性マウスは、自由摂食・摂水、明暗周期（明期：7:00-19:00）、恒温（ 24 ± 1 ）条件下で飼育し、各実験に用いた。PBS またはマトリゲル懸濁した細胞をマウスの後肢裏皮下に注入し、担癌モデルを作成した。腫瘍体積は電子ノギスを用いて測定し、 $V = 0.5 \times (\text{長径}) \times (\text{短径})^2$ の計算式に従って算出した。全ての動物実験は九州大学における動物実験委員会の承認後、その指針に従って実施した。

3-6. タンパク質および RNA の定量

各細胞から総 RNA およびタンパク質を抽出した後、mRNA 発現量は RT-PCR 法、タンパク質発現量は Western blotting 法で測定した。

3-7. マイクロアレイ解析

野生型および Per2^{m/m} マウスから調製した正常線維芽細胞とがん遺伝子を導入してこれらのがん化させた細胞から RNA を抽出した。RNA の品質チェック後、Agilent Low-Input QuickAmp Labeling Kit によりラベリング反応を行い、推奨プロトコルでハイブリダイゼーションした。Feature Extraction ソフトウェアによるデータの数値化を行ったのち、統計処理ソフト R を用いて正規化を行った。マイクロアレイデータの解析には DAVID システム上のデータベースを用いて行った。

3-8. 浸潤アッセイ

コラーゲンを充てんした 3D Cell Culture Chip を用いて、がん細胞の浸潤能を評価した。培地には終濃度 20 ng/mL の TGF- β を添加し、培養担体中に浸潤した細胞を顕微鏡下で撮影した。

3-9. 統計解析

統計解析ソフトとして JMP Pro14 を用いた。独立多群間の比較には一元配置分散分析法 (One-way ANOVA) および Tukey-Kramer 's post hoc test を用いた。また、独立二群間の比較には unpaired t-test を用いた。有意水準 5% 以下を有意な差とした。

4. 研究成果

4-1. 時計遺伝子の機能不全による「がん幹細胞」発生機序の解析

過去の研究で、我々は Per2^{m/m} 細胞をがん化させた場合に Oct-4, Sox-2, Nanog などの幹細胞マーカーを高発現する悪性の形質転換が引き起こされることを見出している(5)。この原因を解明するため、野生型および Per2^{m/m} マウスから調製した正常線維芽細胞とがん遺伝子を導入してこれら細胞をがん化させた細胞を対象にマイクロアレイ解析を行った。その結果、がん化した Per2^{m/m} 細胞内ではアルデヒド代謝酵素のひとつである ALDH3a1 の発現が著しく上昇していることが明らかになった。ALDH3a1 の活性上昇はがん幹細胞の指標でもあるが、ALDH3a1 の活性を阻害すると足場非依存性増殖能や細胞の浸潤能は有意に抑制された。このことかた、ALDH3a1 の発現上昇が時計遺伝子の機能不全時における幹細胞発生の原因になっていることが考えられた。

また、がん化した Per2^{m/m} 細胞では *Aldh3a1* 遺伝子の転写開始部位付近への Histone deacetylase の結合量が低下しており、ヒストン 3 の 9 番目のリジン残基のアセチル化量が高値を示していた。がん化した Per2^{m/m} 細胞では *Aldh3a1* 遺伝子の転写開始部位付近におけるヒストン脱アセチル化酵素のリクルート量が低減しており、その修飾状態が転写を活性化させる方向に変容していることが明らかになった。

4-2. 時計遺伝子の機能不全がん化細胞における抗がん剤耐性メカニズムの解析

次に、がん化した Per2^{m/m} 細胞の治療抵抗性を評価するため、がん遺伝子を導入した野生型および Per2^{m/m} 細胞に MTX、GEM、VP-16、L-OHP、VCR の各抗がん剤を曝露し、48 時間後の生存率を測定したところ、がん化した Per2^{m/m} 細胞の生存活性は野生型細胞に比べて有意に高値を示し、これら 5 種の抗がん剤の殺細胞効果に対して抵抗性を示した(6)。抗がん剤の殺細胞効果は細胞内への取り込み量と細胞の薬剤に対する感受性によって決定されるが、野生型と Per2^{m/m} 細胞内への各種抗がん剤の取込み量には有意な差異は認められなかった。

がん化した Per2^{m/m} 細胞では ALDH3a1 の発現が上昇していたが、本遺伝子はマイクロアレイで解析対象になった 39,427 プローブの中で最も高い発現上昇を示し、タンパクレベルおよび酵素活性の上昇も観察された。ALDH3a1 は抗がん剤によって細胞内に発生した活性酸素種 (ROS) の除去を行い、殺細胞効果を減弱させることからがん化した Per2^{m/m} 細胞における ALDH3a1 の高発現と抗がん剤耐性との関連性について検討を行った。その結果、shRNA を用いてがん化した Per2^{m/m} 細胞内での *Aldh3a1* の発現を抑制したところ、各抗がん剤に対する感受性が野生型細胞と同程度にまで回復した(6)。これらの結果から、Per2^{m/m} 細胞における抗がん剤抵抗性は、ヒストン修飾の変化によって生じる *Aldh3a1* 遺伝子の著しい発現上昇によって引き起こされていることが示唆された。

4-3. 時計遺伝子の発現操作によるがん幹細胞の悪性度の改善

Per2 以外の時計遺伝子についても検討を行ったところ、マウス悪性乳がん細胞 4T1 中の ALDH 活性と CLOCK の発現量との間には負の相関があることを明らかになった(7)。ALDH 高活性 4T1 細胞中では CLOCK の発現は低値を示していたが、CLOCK の発現を強制的に上昇させると ALDH 活性は減弱した。その際、腫瘍形成能や浸潤能などのがん細胞の幹細胞性に関わる悪性形質も低下することが明らかとなった。さらに、CLOCK を高発現させた 4T1 細胞をマウスに移植したところ、CLOCK を発現させなかった細胞を移植した場合に比べて腫瘍の増殖は有意に低下し、生存率の延長も認められた。これら結果から ALDH 高活性細胞中での CLOCK の発現を高めることが、乳がん細胞の悪性形質を減弱する手法になり得ることが示唆された。

引用文献

1. Jin MZ et al., *Signal Transduct Target Ther* 5:166, 2020
2. Hastings MH et al., *Nat Re. Neurosci* 4: 649-661,2003
3. Reppert SM and Weaver DR *Nat Genet* 49:146-151,2002
4. Masri S et al., *Cur. Opin Onco.* 27: 50-5, 2015
5. Katamune C et al., *J Biol Chem* 291: 10541-10550,2016
6. Katamune C et al., *J Biol Chem* 294: 547-558,2019
7. Ogino T et al., *ELife* 10:e66155 2021

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 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ogino T, Matsunaga N, Tanaka T, Tanihara T, Terajima H, Yoshitane H, Fukada Y, Tsuruta A, Koyanagi S, Ohdo S	4. 巻 10
2. 論文標題 Post-transcriptional repression of circadian component CLOCK regulates cancer-stemness in murine breast cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Elife	6. 最初と最後の頁 e66155
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.66155	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 Tsuruta A, Shiiba Y, Matsunaga N, Fujimoto M, Yoshida Y, Koyanagi S, Ohdo S.	4. 巻 ---
2. 論文標題 Diurnal expression of PD-1 on tumor-associated macrophages underlies the dosing time-dependent anti-tumor effects of the PD-1/PD-L1 inhibitor BMS-1 in B16/BL6 melanoma-bearing mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mol Cancer Res	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） 10.1158/1541-7786.MCR-21-0786	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 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
---------------------------	-----------------------	----

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