

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21590427

研究課題名 コネキシン32により誘導される癌幹細胞の増加とそれに伴う転移能亢進の証明

研究課題名 Novel roles of connexin32 in expansion of cancer stem cell population and enhancement of metastasis

研究代表者

大森 泰文（YASUHUMI OMORI）

秋田大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90323138

研究成果の概要（和文）：本来細胞膜に局在し発癌抑制的に機能するコネキシンは、癌細胞においてしばしば細胞質に貯留する。本研究を通じて私たちは、細胞質に貯留したコネキシンが「癌組織の元締め」である癌幹細胞の自己複製を亢進することを発見するとともに、その癌幹細胞の増加が転移の頻度を高めることを証明した。これはコネキシンの局在操作が癌の転移頻度を制御する方策となり得ることを示唆しており、この研究成果はそのような方策を開発する上で基礎となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：While connexin protein is localised in plasma membrane and functions tumour-suppressively, it often translocates into cytoplasm of cancer cells. In this study, discovering that cytoplasmic accumulation of connexin enhanced self-renewal of cancer stem cells, we successfully proved that an increased number of cancer stem cells elevated the incidence of cancer metastasis. It is strongly expected that cancer metastasis could be controlled by manipulating subcellular localisation of connexin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、実験病理学

キーワード：腫瘍

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ギャップ結合(GJ)による細胞間コミュニケーションは細胞の様々な営みに深く関与しており、例えば発癌プロモーションの抑制などもGJの重要な役割とされている。コネキシン(Cx)ファミリーはGJの唯一の構成タンパクであるが、GJを形成せずに細胞質内に局在するCxも様々な機能を有しているこ

とが明らかとなっている。正常の肝細胞ではCx32とCx26が発現し共にGJを形成しているが、肝細胞癌(HCC)においてはCx26が消失しGJも形成されなくなる。ところがCx32は細胞膜からは消失するものの、細胞質内に発現し続けており、HCCの分化度が低くなるにつれ発現量が増加する傾向が認められる。即ち、GJはHCCの発生に抑制的に機能する一方、細

胞質内に過剰に発現した Cx32 は、ひとたび発症した HCC の悪性度をむしろ高める可能性が示唆されるのである。

(2) 私たちは HuH7 細胞や Li-7 細胞などの複数のヒト HCC 由来非転移性細胞株を用いて、培地から doxycycline(Dox)を除去することで Cx32 の過剰発現を誘導することができる Tet-off Cx32 細胞を作製し、Cx32 の発現量を操作した際に HCC 細胞株の浸潤能や転移能にどのような変化がもたらされるのか、*in vitro* および *in vivo* で解析した。Dox を除去することで HuH7 Tet-off Cx32 細胞の Cx32 発現量は約 5 倍になるが、Cx32 は常に”ER-Golgi-intermediate compartment”もしくはゴルジ体に局在し、Cx32 が細胞で GJ を形成することはなかった。それにも拘わらず、HuH7 Tet-off Cx32 細胞を SCID マウスの肝漿膜下に異種同所移植すると、Cx32 を過剰発現する条件下においてのみ転移巣が形成されたのである。これらの結果より、細胞質内に局在する Cx32 が、GJ 非依存的なメカニズムで HCC 由来非転移性細胞株に転移を誘導できることが明らかとなった。

(3) 悪性腫瘍の転移は多段階的な事象であり、様々な因子が関与していることは周知であるが、近年ほぼ確立された癌幹細胞 (CSC) の概念に従えば、各所に播種した CSC のみが転移巣を形成でき、CSC 以外の腫瘍細胞は仮に播種したとしても転移巣を形成するには至らないと解釈することができる。つまり、「CSC であること」が転移能の 1 つと考えることができるのである。CSC は元来 heterogeneity を有する腫瘍組織から見出されたものであるが、私たちが用いた一見均一で単クローン性細胞よりなる HuH7 細胞の中にも CSC と non-CSC が確認されている。

(4) 細胞質内の Cx32 が転移の頻度を高めるという前述の結果から考察すると、細胞質に局在する Cx32 には HCC 細胞株中の CSC の数を増やす機能があるのではないかという予想が立てられる。またごく最近、マウスの正常造血幹細胞画分に、Cx32 が発現していることも報告されている。以上より私たちは、細胞質内の Cx32 が HCC の CSC 画分のサイズを制御および決定する因子なのではないかという仮説をもつに至った。正常細胞の分化は、組織幹細胞から最終分化まで、極めて厳格な階層性 (hierarchy) に従い非可逆的な分化過程をとるのに対し、腫瘍組織内の CSC と non-CSC との間は、「shallow hierarchy」とよばれるような比較的緩い階層性を有するに過ぎないといわれる。したがって、条件を変化させることによって CSC と non-CSC を相互に転換することが可能かも知れない。この点からも細胞質内の Cx32 が HCC の non-CSC から CSC への転換を誘導、もしくは CSC から non-CSC への「分化」を抑制することで CSC を

増加させ、その結果、転移の確率を高める可能性が示唆されるのである。

## 2. 研究の目的

細胞質内の Cx32 によりヒト HCC 由来細胞株における CSC の割合が増加することを示すとともに、この増加が non-CSC から CSC への転換によるものか、あるいは CSC の自己複製の促進によるものかを検討し、CSC の数を制御する Cx32 の役割を明らかにする。また、CSC と non-CSC を分離し、それぞれの細胞集団の転移能を SCID マウスへの異種移植によって検討し、Cx32 が細胞質内で GJ 非依的に機能することで CSC の割合を増加させ、結果として転移の頻度を高めることを確認する。さらにそのメカニズムを探索するため、細胞質に局在する Cx32 によりもたらされる遺伝子発現パターンの変化を網羅的に捉え、Cx32 の下流で CSC の割合を規定する因子の候補を見出す。

## 3. 研究の方法

(1) HCC 由来の細胞株 HuH7 および Li-7 に対して、Dox の有無で Cx32 の発現を制御できるシステム (HuH7 Tet-off Cx32 および Li-7 Tet-off Cx32) を作製する。また、対照として Tet-off mock 細胞も準備する。*in vitro* 実験の際には、4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Dox を培地に添加することで外来性 Cx32 の発現を抑え内因性 Cx32 のみの発現を維持するが、Dox を含まない通常の培地に変えることにより Cx32 をほぼ 4 倍まで過剰発現させる。これらの細胞をマウスに異種移植する *in vivo* 実験の際には、飲料水に 2  $\text{mg}/\text{ml}$  Dox を添加することで外来性 Cx32 の発現を完全に抑え、通常の飲料水を与えることで、Cx32 の発現量を大幅に上昇させる。

(2) CSC の表現型の 1 つとして、side population (SP) と呼ばれる、Hoechst 33342 蛍光色素の排出が亢進しこの色素に染まらない細胞集団の形成が知られている。また、HuH7 細胞にも SP が 0.25% 含まれていることが報告されている。そこで、HuH7 Tet-off Cx32 細胞と Li-7 Tet-off Cx32 細胞を Dox の存在下もしくは非存在下で培養、細胞回収後に生細胞を Hoechst 33342 で染色し、MoFlo セルソーターで SP の割合を測定する。Dox 非添加群すなわち Cx32 の過剰発現を誘導した際に、SP がどのように変化するか確認する。

(3) 現在のところ、絶対的な CSC のマーカーは存在しない。細胞によっては SP 以外の指標の方がより良く CSC 画分を反映することもある。そこで、HCC の CSC の指標となり得る CD90、CD133、CD166 などの表面抗原を単独もしくは組み合わせながら、それぞれ対応する抗体で免疫蛍光染色し、Dox の有無による CSC 集団の変化を MoFlo セルソーターで解析

する。

(4) SP もしくは表面抗原で検出した細胞集団が CSC を含んでいることを検証するため、Tet-off Cx32 細胞を Dox 存在下もしくは非存在下で培養後、CSC 指標の陽性画分と陰性画分を MoFlo セルソーターで分取して、それぞれの画分を SCID マウスの肝臓膜下に同所異種移植する。Dox 添加群の細胞を移植されたマウスには Dox を (2) で記載したように投与する。12 週間後に解剖し、各画分の造腫瘍能と転移能を評価する。

(5) ① 一般に正常幹細胞は非対称分裂の結果、幹細胞の自己複製と同時に分化の進んだ progenitor を生み出すが、progenitor から幹細胞への逆行性の分化はないものと考えられている。一方、腫瘍組織内の細胞分化の階層は正常組織のそれより緩いことが予想されており、ある一定の条件下で CSC と non-CSC が相互に転換可能であることが期待される。Cx32 の過剰発現による CSC 画分の増加が、CSC の self-renewal の亢進に依存するだけでなく、non-CSC から CSC への転換によっている可能性もある。そこで、non-CSC に Cx32 の過剰発現を誘導した際に CSC が出現するかどうかを検討し、HuH7 や Li-7 細胞が緩い階層 (shallow hierarchy) を有し、CSC と non-CSC の制御が比較的容易であることを検証する。Tet-off Cx32 細胞を Dox 存在下で培養後、セルソーターで CSC 指標の陰性画分 (non-CSC) を分取し、Dox 存在下もしくは非存在下で培養を継続する。十分な期間培養後、Dox 非添加群の中に CSC 指標が陽性の細胞が出現するかどうかを MoFlo セルソーターで解析する。

② 上記の実験を *in vivo* で検証する。Tet-off Cx32 細胞を Dox 存在下で培養後、セルソーターで CSC 指標の陰性画分 (non-CSC) を分取し、SCID マウスの肝臓膜下に同所異種移植する。マウスには Dox を投与せず、移植細胞内に Cx32 の過剰発現を誘導する。Cx32 の過剰発現により non-CSC に CSC への転換が生じた場合は、腫瘤形成と共に転移が観察される。

#### 4. 研究成果

(1) ① HuH7 Tet-off Cx32 細胞とその陰性対照である HuH7 Tet-off Mock 細胞を、それぞれ Dox 存在下もしくは非存在下で 48 時間培養したところ、図 1 に示すように、Dox 非存在下において、Cx32 の発現が 4 倍以上に増加することがクローンが見出された。

② このクローン 15-1 を Dox 非存在下で培養した際の Cx32 の局在を間接免疫蛍光染色で確認したところ、図 2 に示すように、Cx32 は本来局在すべき細胞膜の細胞間接着領域にはシグナルが確認できず、細胞質への局在が認められた。これは HCC にみられる一般的な特徴であり、HuH7 Tet-off Cx32 細胞もこの

性質を維持しているものと考えられる。さらにゴルジ体マーカーとの二重染色において、Cx32 のシグナルはほぼ完全にゴルジ体のそれと重なったことから、Cx32 は主にゴルジ体に局在していることが明らかとなった。

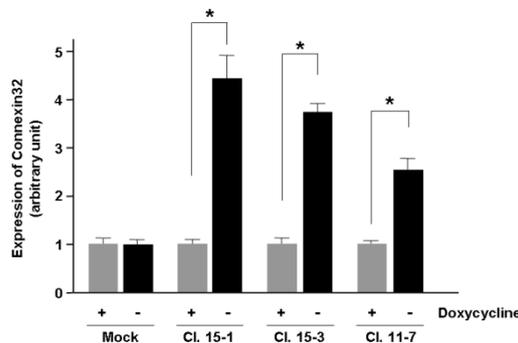


図 1

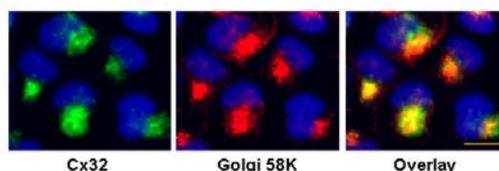


図 2

(2) ① HuH7 Tet-off Cx32 細胞と HuH7 Tet-off Mock 細胞を、それぞれ Dox 存在下もしくは非存在下で 10 日間培養したところ、図 3 に示すように、Dox 非存在下の方が存在下に比べて、SP 画分が 20 倍以上に増加していた。

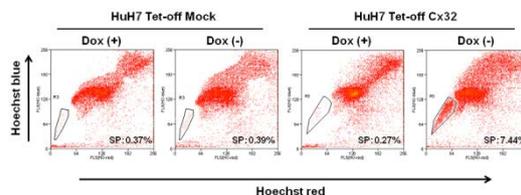


図 3

② Cx32 による SP 画分の増加が CSC 自己複製の亢進によるものか、CSC から non-CSC への分化抑制なのかを検討するために、SP をセルソーターにて分取し、Dox 存在下もしくは非存在下で 1 週間培養したところ、図 4 に示すように、SP から main population (MP) への分化は Cx32 により阻害されることはなく、Cx32 を過剰発現することによって、SP の割合が高く維持されることが分かった。

(3) さらに細胞質に貯留する Cx32 によって CSC の自己複製が亢進することを確認するために、CSC spheroid assay を行った。SP と MP をセルソーターで分取し、それぞれを無血清非接着半流動培地内で Dox 存在下もしくは非存在下で 20 日間培養したところ、SP は多数の CSC spheroid を形成したのに対し、MP

はほとんど spheroid 形成能を示さなかった (図 5a)。

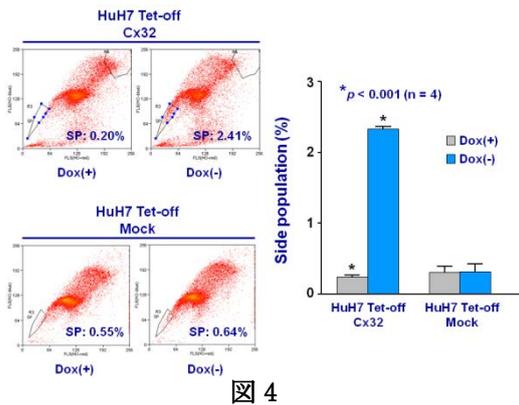


図 4

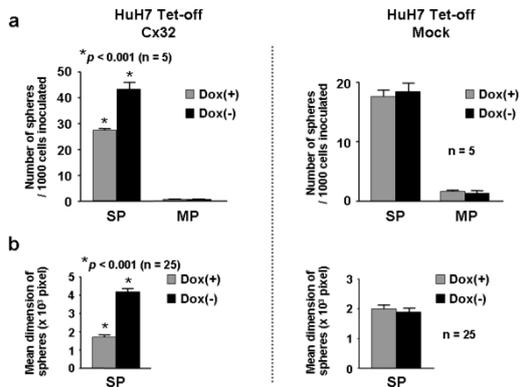


図 5

さらに、SP から形成された spheroid は、Dox 非存在下で Cx32 が過剰に発現する環境においてより多く形成され、それらのサイズもより大型であった (図 5a, 5b)。以上より、細胞質内の Cx32 は、CSC の自己複製を亢進させることが証明された。

(4) 細胞質に過剰発現する Cx32 によって CSC が増加する現象を、CD133 を指標として確認したところ、図 6 のように、Cx32 の過剰発現によって CD133 陽性細胞が増加することが確認された。

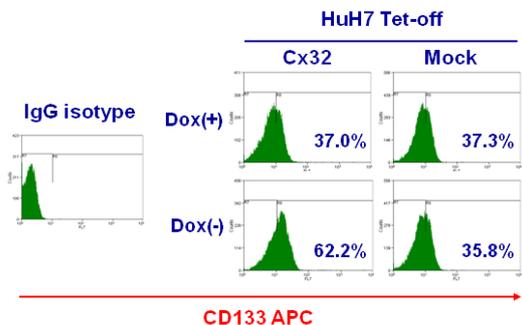


図 6

(5) SP と MP をセルソーターで分取し、それぞれ SCID マウスの皮下に移植したところ、

SP のみが腫瘍を形成し、MP は全く腫瘍を形成しなかった。したがって、HuH7 Tet-off Cx32 細胞の CSC は SP 画分にも濃縮されることが確認された。

(6) CSC から non-CSC への分化だけでなく、non-CSC から CSC への逆向性の転換が生じるかどうかを検討するために、MP のみをセルソーターで分取し、Dox の存在下もしくは非存在下で 10 日間培養した。図 7 に示すように、MP を培養したにも拘わらず、SP が出現していることがわかる。癌由来の培養細胞は階層性が緩いため non-CSC から CSC への逆向性の転換が生じたものと思われる。またこのような転換には、Cx32 の過剰発現の有無は影響を与えないこともわかった。

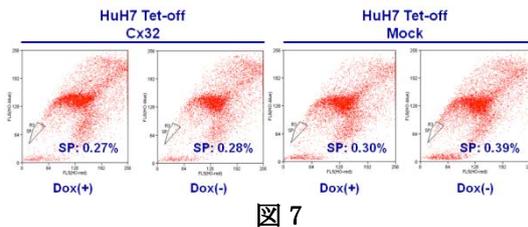


図 7

(7) 上記の研究成果は、コネクシンのギャップ結合以外の機能を明らかにしている点で、非常に新しく、コネクシン研究に一石を投じている。また、CSC の数の増減を制御する因子を同定した数少ない研究であり、さらにその因子が、幹細胞制御因子として従来より知られているものとは全く異なるコネクシンであることは注目に値する。正常の組織幹細胞と CSC は異なるメカニズムで数の制御が行われていることが考えられる。細胞質に貯留する Cx32 が CSC の自己複製を亢進するという事は、Cx32 を本来の局在、すなわち細胞膜へ正しく輸送できるようにすることにより、CSC の数を抑制し、癌の進展を抑えることができるということを示唆しており、癌進展のコントロールにおいて、Cx32 の細胞内局在は新たなターゲットになるものと期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Kawasaki Y, Omori Y, Li Q, Nishikawa Y, Yoshioka T, Yoshida M, Ishikawa K, Enomoto K, (2011) Cytoplasmic accumulation of connexin32 expands cancer stem cell population in human HuH7 hepatoma cells by enhancing its self-renewal. Int. J. Cancer 128: 51-62. 査読有
- ② Satoh JI, Tabunoki H, Ishida T, Yagishita S, Jinnai K, Futamura N,

- Kobayashi M, Toyoshima I, Yoshioka T, Enomoto K, Arai N, Arima K, (2011) Immunohistochemical characterization of microglia in Nasu-Hakola disease brains. *Neuropathology* 31: 363-375. 査読有
- ③ Yoshioka T, Nishikawa Y, Ito R, Kawamata M, Doi Y, Yamamoto Y, Yoshida M, Omori Y, Kotanagi H, Masuko T, Enomoto K, (2010) Significance of integrin  $\alpha\beta 5$  and erbB3 in enhanced cell migration and liver metastasis of colon carcinomas stimulated by hepatocyte-derived heregulin. *Cancer Sci.* 101: 2011-2018. 査読有
- ④ Borup R, Rossing M, Henao R, Yamamoto Y, Krogdahi A, Godballe C, Winther O, Kiss K, Christensen L, Høgdall R, Bennedbaek F, Nielsen FC, (2010) Molecular signatures of thyroid follicular neoplasia. *Endocr. Relat. Cancer* 17: 691-708. 査読有
- ⑤ Nishikawa Y, Ohi N, Yagisawa A, Doi Y, Yamamoto Y, Yoshida M, Tokairin T, Yoshioka T, Omori Y, Enomoto K, (2009) Suppressive effect of orthovanadate on hepatic stellate cell activation and liver fibrosis in rats. *Am. J. Pathol.* 174: 881-890. 査読有
- ⑥ Yoshida M, Nishikawa Y, Yamamoto Y, Doi Y, Tokairin T, Yoshioka T, Omori Y, Watanabe A, Takahashi N, Yoshioka T, Miura I, Sawada K, Enomoto K, (2009) Mast cell leukemia with rapidly progressing portal hypertension. *Pathol. Int.* 59: 817-822. 査読有
- [学会発表] (計 18 件)
- ① 大森泰文、他. Involvement of endoplasmic reticulum-stress response pathway in cytoplasmic connexin32-mediated self-renewal of cancer stem cells in HuH7 hepatoma cells, 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 14 日, パシフィコ横浜(横浜市)
- ② 大森泰文、他. Involvement of ATF6 in cytoplasmic connexin32-mediated self-renewal of cancer stem cells in HuH7 hepatoma cells, 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011 年 10 月 4 日, 名古屋国際会議場(名古屋市)
- ③ Omori Y, *et al.* Cytoplasmic Cx32 protein expands cancer stem cell population in hepatoma cells by reinforcing ER-stress responses, International Gap Junction Conference 2011, 2011 年 8 月 10 日, Het Pand(ゲント市)
- ④ 大森泰文、他. 細胞質内コネキシン 32 は小胞体ストレス応答を賦活することで肝細胞癌の幹細胞自己複製を促進する, 第 18 回肝細胞研究会, 2011 年 6 月 24 日, 東京ガーデンパレス(東京)
- ⑤ 大森泰文、他. 細胞質 connexin32 は ER stress transducer ATF6 を介して HuH7 肝癌細胞自己複製を促進する, 第 100 回日本病理学会総会, 2011 年 4 月 28 日, パシフィコ横浜(横浜市)
- ⑥ 大森泰文、他. Cytoplasmic connexin32 enhances self-renewal of cancer stem cell population in HuH7 hepatoma cells by activating ER-stress responses, 第 3 回日米癌学会合同会議, 2011 年 3 月 2 日, 東京ベイ舞浜ホテルクラブリゾート(浦安市)
- ⑦ 大森泰文、他. 肝細胞癌の幹細胞自己複製を促進する細胞質内コネキシン 32 の役割, 第 14 回日本肝臓医生物学研究会, 2011 年 2 月 19 日, 東京医科歯科大学(東京)
- ⑧ Kawasaki Y, Omori Y, *et al.* Cytoplasmic connexin32 induces an ER-stress response and expands cancer stem cell population in HuH7 hepatoma cells, Excellence in oncology, 2011 年 10 月 18 日, アテネヒルトンホテル(アテネ市)
- ⑨ 大森泰文、他. Cytoplasmic accumulation of connexin32 expands cancer stem cell population by increasing GRP78 in HuH7 hepatoma cells, 第 69 回日本癌学会学術総会, 2010 年 9 月 24 日, 大阪国際会議場(大阪市)
- ⑩ 大森泰文、他. HuH7 肝癌細胞において、コネキシン 32 により誘導される癌幹細胞の自己複製亢進は ER ストレス応答を介している, 第 99 回日本病理学会総会, 2010 年 4 月 28 日, 京王プラザホテル(東京)
- ⑪ 川寄洋平、大森泰文、他. Cytoplasmic connexin32 induces a metastatic ability in non-metastatic HuH7 hepatoma cells by expanding cancer stem cell population, 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009 年 12 月 11 日, パシフィコ横浜(横浜市)
- ⑫ 川寄洋平、大森泰文、他. 細胞質に局在する connexin32 による小胞体ストレス応答の誘導と HuH7 肝癌細胞の癌幹細胞画分の増加, 第 8 回コネキシン研究会, 2009 年 11 月 27 日, 休暇村志賀島(福岡市)
- ⑬ 川寄洋平、大森泰文、他. Cytoplasmic connexin32 induces an ER-stress

response and expands cancer stem cell population in HuH7 hepatoma cells, 第68回日本癌学会学術総会, 2009年10月2日, パシフィコ横浜(横浜市)

- ⑭ 川寄洋平、大森泰文、他. コネキシン32による癌幹細胞自己複製能亢進と転移促進, 第27回頭頸部自律神経研究会, 2009年8月29日, ホテルグランヴィア大阪(大阪市)
- ⑮ 川寄洋平、石川和夫、大森泰文、他. Connexin32による癌幹細胞画分の拡張と転移促進作用:HuH7を用いた解析, 第52回日本耳鼻咽喉科学会東北地方部会連合学術講演会, 2009年7月25日, 山形テルサ(山形市)
- ⑯ 川寄洋平、大森泰文、他. HuH7細胞質に局在するConnexin32による癌幹細胞画分の拡張とそれに伴う転移促進作用, 第19回日本サイトメトリー学会学術集会, 2009年6月21日, 松江テルサ(松江市)
- ⑰ 川寄洋平、大森泰文、他. 細胞質に局在するconnexin32はHuH7肝癌細胞において癌幹細胞の自己複製を促進する, 第98回日本病理学会総会, 2009年5月2日, 国立京都国際会館(京都)
- ⑱ Kawasaki Y, Omori, Y, *et al.* Cytoplasmic connexin32 induces a metastatic ability in non-metastatic HuH7 hepatoma cells by expanding cancer stem cell population, 米国癌学会年会, 2009年4月22日, デンバーコンベンションセンター(デンバー市)

[図書] (計3件)

- ① Omori Y, Kawasaki Y, Li Q, Yoshioka T, Yamamoto Y, Enomoto K, Cytoplasmic connexin32 and self-renewal of cancer stem cells: Implication in metastasis, In: Lau W.-Y. (ed.) Hepatocellular Carcinoma - Book 1 (2012) pp235-252, InTech, Rijeka (Croatia), ISBN 979-953-51-0023-2, 査読有
- ② 榎本克彦, 吉岡年明, 大森泰文. (2010) 肝・胆道系症候群(第2版) —その他の肝・胆道系疾患を含めて—II. 肝臓編(下) 肝肉芽腫. 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.14, pp. 310-314. 査読無
- ③ 吉岡年明, 榎本克彦. (2010) 肝・胆道系症候群(第2版) —その他の肝・胆道系疾患を含めて—II. 肝臓編(下) 肝粘表皮癌. 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.14, pp. 319-322. 査読無

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.akita-u.ac.jp/~byouri1/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大森 泰文 (OMORI YASUFUMI)  
秋田大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号: 90323138

### (2) 研究分担者

吉岡 年明 (TOSHIAKI YOSHIOKA)  
秋田大学・医学部・助教  
研究者番号: 80302264

榎本 克彦 (KATSUHIKO ENOMOTO)  
秋田大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 20151988

西川 祐司 (YUJI NISHIKAWA)  
旭川医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 90208166

(H21: 研究分担者)

山本 洋平 (YOHEI YAMAMOTO)  
秋田大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 70400512

(H22→H23: 研究分担者)