

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：35302

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16434

研究課題名（和文）大腸がん幹細胞で発現上昇するPP6の制御を介した抗がん戦略の構築

研究課題名（英文）Antitumor Strategies via Regulation of PP6 Elevated in Colorectal Cancer Stem Cells

研究代表者

藤原 信行 (Fujiwara, Nobuyuki)

岡山理科大学・獣医学部・講師

研究者番号：30805875

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、大腸がんのがん幹細胞でのPP6の役割を明らかにし、PP6を標的とする抗がん戦略の構築することを目的とした。その結果、大腸がん組織において、PP6発現が上昇していることが認められた。また、大腸がん細胞のPP6発現を抑制したところ、コロニー形成能やin vivoでの腫瘍増殖が抑制されることが認められた。そのメカニズムとして、PP6の発現抑制により、がん幹細胞マーカーの発現が低下することが認められた。以上の結果より、PP6ががん幹細胞の維持に重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果より、PP6が、がん幹細胞の維持に重要な働きをしていることが明らかになった。また、3種類存在するPP6の調節サブユニットの中でPP6R3ががん幹細胞の維持に重要であることが明らかとなった。今後は、PP6とPP6R3の結合の維持機構を明らかにすることで、がん幹細胞を標的とする抗がん戦略の構築が期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to clarify the role of PP6 in cancer stem cells of colorectal cancer and to develop anti-cancer strategies targeting PP6. The results showed that PP6 expression was upregulated in colorectal cancer tissues. In addition, when PP6 expression was suppressed in colon cancer cells, colony-forming ability and tumor growth in vivo were inhibited. As a mechanism, it was observed that suppression of PP6 expression decreased the expression of cancer stem cell markers. These results suggest that PP6 is important for the maintenance of cancer stem cells.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：大腸がん がん幹細胞 protein phosphatase 6

### 1. 研究開始当初の背景

がん組織は、未分化な細胞から高度に分化した細胞まで、様々ながん細胞が混在し、組織化されている。この腫瘍組織中には正常組織と同様な幹細胞であるがん幹細胞が存在し、がん幹細胞が様々な性質のがん細胞の供給元となることで階層性を有した腫瘍組織を構成している。加えて、がん幹細胞は抗がん剤や放射線に対する強い抵抗性を示し、がんの再発・転移の大きな原因となっている(図1)。そのため、がん幹細胞を標的とした創薬が求められている。

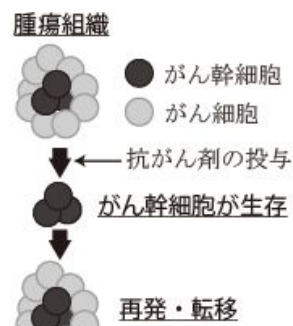


図1 がん幹細胞は治療抵抗性や再発・転移に關与する

### 2. 研究の目的

申請者は、大腸がん細胞株からがん幹細胞を誘導したところ、誘導したがん幹細胞において PP6 の発現量が顕著に増加することを見出していた(図2)。PP6 は、酵母からヒトまで進化的に保存されているタンパク質脱リン酸化酵素であり、細胞分裂の制御や、DNA の修復、炎症反応の制御など幅広い機能を有する (Fujiwara N, et al. *Cancer science*, 2020 他)。そこで、本研究はがん幹細胞での PP6 の役割を明らかにし、PP6 を標的とする抗がん戦略の構築することを目的とした。さらに、大腸がん細胞から誘導したがん幹細胞で PP6 の発現が上昇することが認められたことから、大腸がんでの PP6 の発現や役割についても明らかにすることを目的とした。

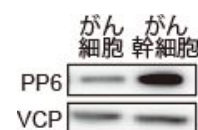


図2 がん幹細胞で PP6 発現が上昇する  
大腸がん細胞を用いがん幹細胞を誘導し、誘導していない細胞(がん細胞)と PP6 発現量を検討した。VCP はローディングコントロール。

### 3. 研究の方法

大腸がん細胞株からの幹細胞誘導には、神経幹細胞に誘導培地を元に我々が独自開発した培地を用いた。また、がん幹細胞での PP6 の機能解析には siRNA や shRNA を用い、生化学的・分子生物学的手法を用いて、解析を行った。

### 4. 研究成果

初めに、大腸がん患者から抽出したがん組織を用いて、PP6 の発現を解析したところ、大腸がん部において PP6 の発現が上昇していることが認められた。そこで、shRNA を用いて、PP6 の発現を抑制し、コロニー形成試験やゼノグラフトモデルを用いて in vivo での腫瘍形成試験を行った。その結果、PP6 の発現抑制により、コロニー形成能や in vivo での腫瘍増殖能が低下することが認められた(図3)。

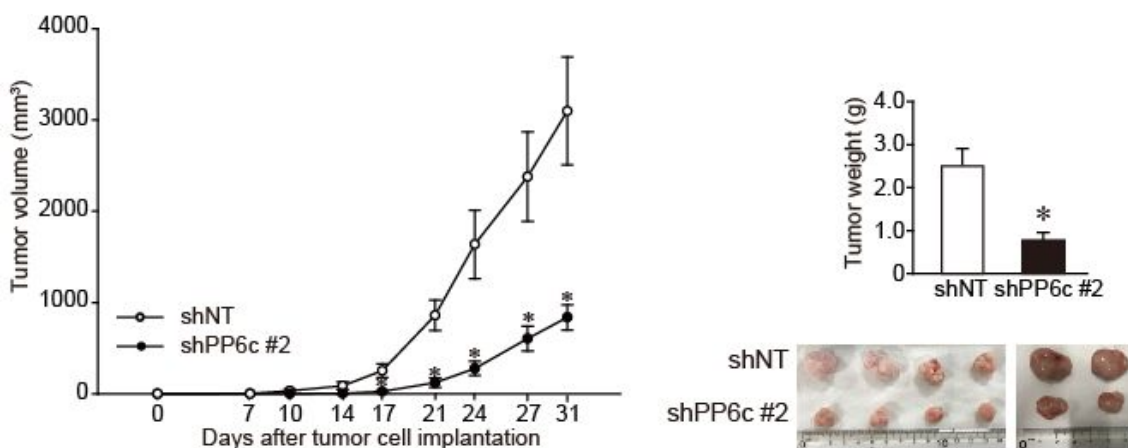


図3 PP6 の発現抑制により in vivo での腫瘍形成能が低下する

shRNA を用い、PP6 の発現を抑制した大腸がん細胞を作製し、免疫不全マウスの皮下に移植した。その後、30 日間腫瘍の大きさを測定し、30 日後に腫瘍の摘出を行った。

次に、がん幹細胞で PP6 の発現が上昇することが認められていたことから、PP6 発現を抑制した時のがん幹細胞マーカーの発現を解析したところ、PP6 の発現抑制により、がん幹細胞マーカーである ALDH1A1 や CD133 の発現が減少することが認められた(図4)。

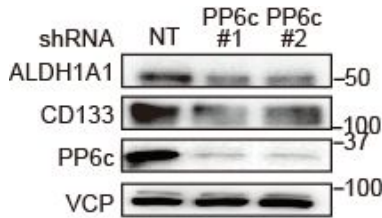


図4 PP6の発現抑制により、がん幹細胞マーカーの発現が減少する。  
大腸がん細胞株のPP6発現をshRNAを用い、抑制したところ、PP6の発現抑制により、がん幹細胞マーカーであるALDH1A1とCD133の発現が減少することが認められた。VCPはローディングコントロール。

PP6の基質へのリクルートには、3種類存在する調節サブユニット（PP6Rs）との結合が必要である（図3）。そこで、がん幹細胞マーカーの発現に重要なPP6Rsの検討をsiRNAを用いて行った。その結果、PP6R3の発現抑制により、がん幹細胞マーカーの発現が減少することが認められた。以上の結果より、PP6-PP6R3複合体が、がん幹細胞の維持に重要であることが示唆された。

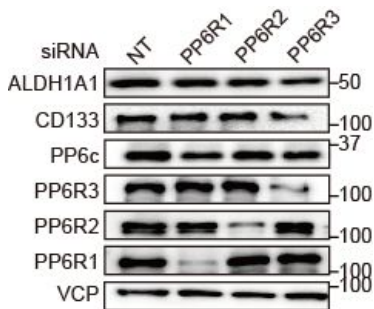
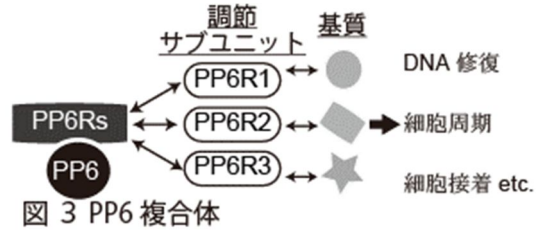


図5 PP6R3の発現抑制により、がん幹細胞マーカーの発現が減少する。  
大腸がん細胞株のPP6Rsの発現をsiRNAを用い、抑制したところ、PP6R3の発現抑制により、がん幹細胞マーカーであるALDH1A1とCD133の発現が減少することが認められた。VCPはローディングコントロール。

最後に、PP6の発現抑制がsphere形成に与える影響を検討した。その結果、PP6の発現抑制により、sphere形成能が低下することが認められた（図6）。

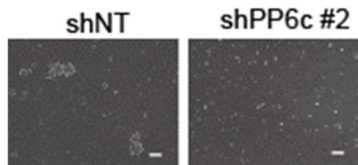


図6 PP6の発現抑制により、sphere形成能が低下する。  
大腸がん細胞株のPP6の発現をsiRNAを用い、抑制し、がん幹細胞誘導培地を用い、sphere形成を行ったところ、PP6の発現抑制により、sphere形成能が低下することが認められた。

一連の研究成果は「Protein phosphatase 6 promotes stemness of colorectal cancer cells.」として、Cancer Scienceにアクセプトされた（in press）。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Tsunedomi Ryouichi, Yoshimura Kiyoshi, Kimura Yuta, Nishiyama Mitsuo, Fujiwara Nobuyuki, Matsukuma Satoshi, Kanekiyo Shinsuke, Matsui Hiroto, Shindo Yoshitaro, Watanabe Yusaku, Tokumitsu Yukio, Yoshida Shin, Iida Michihisa, Suzuki Nobuaki, Takeda Shigeru, Ioka Tatsuya, Hazama Shoichi, Nagano Hiroaki	4. 巻 22
2. 論文標題 Elevated expression of RAB3B plays important roles in chemoresistance and metastatic potential of hepatoma cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Cancer	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) 10.1186/s12885-022-09370-1	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 Tsunedomi Ryouichi, Yoshimura Kiyoshi, Kimura Yuta, Nishiyama Mitsuo, Fujiwara Nobuyuki, Matsukuma Satoshi, Kanekiyo Shinsuke, Matsui Hiroto, Shindo Yoshitaro, Watanabe Yusaku, Tokumitsu Yukio, Yoshida Shin, Iida Michihisa, Suzuki Nobuaki, Takeda Shigeru, Ioka Tatsuya, Hazama Shoichi, Nagano Hiroaki	4. 巻 22
2. 論文標題 Elevated expression of RAB3B plays important roles in chemoresistance and metastatic potential of hepatoma cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Cancer	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) 10.1186/s12885-022-09370-1	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 -

1. 著者名 Kohyanagi Naoki, Kitamura Nao, Tanaka Keiko, Mizuno Takuya, Fujiwara Nobuyuki, Ohama Takashi, Sato Koichi	4. 巻 171
2. 論文標題 The protein level of the tumour-promoting factor SET is regulated by cell density	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 295 ~ 303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab125	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 Kitamura Nao, Fujiwara Nobuyuki, Hayakawa Koji, Ohama Takashi, Sato Koichi	4. 巻 170
2. 論文標題 Protein phosphatase 6 promotes neurite outgrowth by promoting mTORC2 activity in N2a cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 131 ~ 138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab028	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 YAMAMOTO Miu, FUJIWARA Nobuyuki	4. 巻 85
2. 論文標題 Protein phosphatase 6 regulates trametinib sensitivity, a mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) inhibitor, by regulating MEK1/2-ERK1/2 signaling in canine melanoma cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 977 ~ 984
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.23-0274	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 Nobuyuki Fujiwara, Ryouichi Tsunedomi, Yuta Kimura, Masao Nakajima, Shinobu Tomochika, Shuhei Enjoji, Takashi Ohama, Koichi Sato, Hiroaki Nagano	4. 巻 -
2. 論文標題 Protein phosphatase 6 promotes stemness of colorectal cancer cells.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cancer Science	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) なし	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
---------	---------