

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16456

研究課題名（和文）細胞容積調整機構に注目した細胞生理学的アプローチによる大腸癌幹細胞機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of colorectal cancer stem cells by cellular physiological approach focused on cellular volume regulation

研究代表者

工藤 道弘（Kudou, Michihiro）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・特任助教

研究者番号：20804264

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）：大腸癌幹細胞で、細胞容積調整に関与するイオン輸送体CLCN5, LRRC8a, AQP1が通常癌細胞に比して高発現していた。これらは低浸透圧刺激を与えた際の容積変化に強く関与するため、低浸透圧刺激を与えた際の細胞容積変化を検証したところ、癌幹細胞では細胞の容積増大が生じにくく、通常癌細胞が破裂し死滅する様な環境でも生存し得ることがわかった。さらにLRRC8aの遺伝子発現を低下させると癌幹細胞の低浸透耐性は弱体化し、AQPの阻害剤を用いると低浸透による容積変化が抑制されることがわかり、癌幹細胞の低浸透耐性は、LRRC8a, AQPが高発現していることで獲得されている可能性があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌幹細胞標的治療は開発が望まれており、再発や治療抵抗性を打破する強力な治療となる可能性がある。今回発見された細胞容積調整に関与する癌幹細胞に高発現する分子(LRRC8a, AQP1, CLCN5)は、癌のアポトーシスにも関与していることが広く報告されている。それゆえに、これら分子を標的とした薬剤や、低浸透圧刺激を利用した治療を開発することができれば、癌治療の発展に大きく寄与する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：CLCN5, LRRC8a, and AQP1, which are ion transporters related to the regulation of cell volume under hypotonicity, overexpressed in colon cancer stem cells (CSCs), suggesting that CSCs have the resistance to hypotonic shock. The measurement of cell volume in the CSCs and normal cancer cells (NSCs) under hypotonicity revealed that NSCs could not survive under severe hypotonicity; on the other hands, CSCs could survive and avoid cell rupture. LRRC8a gene knockdown or AQP inhibition using drugs suppressed the resistance of hypotonicity. The results showed that LRRC8a or AQP1 are associated with specific cell volume regulation in CSCs. The molecules may be the candidate genes for developing the targeted therapies to CSCs.

研究分野：大腸癌

キーワード：大腸癌 癌幹細胞 イオン輸送体 アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

癌幹細胞は癌細胞の中でごく一部含まれる細胞集団とされ、高い自己複製能、自己再現性を有し、加えてアポトーシスに対する耐性を持ち、多くの癌治療の抵抗性に関与しているとされる。また遠隔期の再発にも関与するとされ、これらを標的とした治療を開発するため、世界的にも盛んに研究が行われている。

我々の研究室においても、これまで癌幹細胞のイオン輸送体発現、その役割や、細胞生理学的アプローチによる癌標的治療などの研究を行ってきた。その先行研究により、大腸癌、胃癌、膵癌のヒト由来細胞株からの癌幹細胞抽出に成功し、これらに対して網羅的遺伝子解析を行うことで癌幹細胞に特異的に発現するイオン輸送体が存在することを発見、特に細胞の容積調整に関与するイオン輸送体が癌幹細胞で高発現していることが判明した。細胞の容積調整は、水の受動的移動に関与する水チャネル(アクアポリンチャネル)、イオン勾配を調整することで浸透圧による水の流出流入を調整するクロライドイオン( $\text{Cl}^-$ )、カリウムイオン( $\text{K}^+$ )に関わるイオン輸送体が重要とされる。実際に、低浸透圧溶液に細胞を曝露すると浸透圧により水が流入し細胞の容積は増大するが、破裂を回避するため、 $\text{Cl}^-$ チャネルなどが活性化され $\text{Cl}^-$ が細胞外に流出するとともにイオン勾配に従い水も細胞外へ流出し、細胞容積を維持しようとする Regulatory Volume Decrease(RVD)が生じるがことが知られている。一方で、このような水チャネル、 $\text{Cl}^-$ チャネルによる水の流出によって細胞容積の縮小を促す容積調整機能は、細胞のアポトーシス時に生じる細胞の縮小(Apoptotic Volume Decrease: AVD)に大きく関与するとされ、さらには癌細胞における細胞の遊走の際に必要な細胞の形態変化にも関連していると報告されている。

我々は、この背景と癌幹細胞において細胞容積調整に関連するイオン輸送体が高発現しているという事実から、癌幹細胞におけるアポトーシスへの耐性や、癌幹細胞における高い遊走浸潤能への機序にイオン輸送体が強く関わっていると考えた。本研究は、癌細胞におけるアポトーシス耐性や浸潤・遊走能に細胞容積に関連するイオン輸送体に関与しているという仮説を検証するものである。

## 2. 研究の目的

大腸癌幹細胞の治療抵抗性や悪性度のメカニズムの解明をこれまでに世界的にも注目されていない細胞容積調整機構という視点から検証することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト大腸癌細胞株、手術切除組織からの癌幹細胞の分離と細胞株樹立

大腸癌細胞株や、手術切除組織を用いて、癌幹細胞マーカー陽性細胞を cell sorter を用いて分離、血清非含有培養液で培養する。ヒト大腸癌切除組織からも Cancer tissue-originated Spheroid(CTOS) の技術を用いて、癌幹細胞の性質をもつ細胞の抽出を試みる。

### (2) 大腸癌幹細胞のイオン輸送体遺伝子発現の確認

網羅的遺伝子解析で高発現が確認された CLCN5, LRRC8a, AQP1 の癌幹細胞における発現を、RT-PCR 法でも確認を行う。

### (3) 癌幹細胞、通常癌細胞に対する低浸透圧刺激時の容積変化の比較

樹立癌幹細胞、起源の通常癌細胞に対して低浸透圧刺激を加えた際の細胞容積変化を比較する。容積の変化は電気抵抗より細胞容積を測定するフローサイトメトリを用いる。

### (4) 低浸透圧刺激を与えた際の癌幹細胞、通常癌細胞の細胞生存性の評価

低浸透圧に短時間や長時間曝露した際の細胞の生存性を評価する。短時間曝露後に再培養した後、もしくは低浸透圧培養液で培養した後に、生存した細胞を MTT assay で評価するといった2種の実験手法で評価を行う。

### (5) 標的遺伝子を siRNA knockdown した際の癌幹細胞の低浸透圧耐性の評価

標的遺伝子 LRRC8a を knockdown した際の低浸透圧刺激に対する殺細胞効果の差異を(4)と同様の手法で調査する。

### (6) 各種イオン輸送体阻害剤を用いた際の細胞容積変化の評価

水チャネル阻害剤(水銀)、 $\text{Cl}^-$ チャネル阻害剤(NPPB)、 $\text{K}^+$ チャネル阻害剤(Quinine)を用いた際の通常癌細胞と、癌幹細胞における低浸透圧刺激に対する容積調整機能に対する影響を(3)と同様の容積測定法にて評価する。

## 4. 研究成果

### (1) ヒト大腸癌細胞株、手術切除組織からの癌幹細胞の分離と細胞株樹立

元より細胞株 HT-29 由来の癌幹細胞は樹立に成功しており、これに加えて癌細胞株 T-84 から癌幹細胞マーカーである ALDH1a1 が高発現している細胞を cell sorter を用いて特殊培養し、樹立することに成功した(図1)。以前より手術切除組織からの癌幹細胞の分離を Cancer tissue-originated Spheroid(CTOS) の手法を用いて、試みているが研究期間に成功に至らず、断念した。

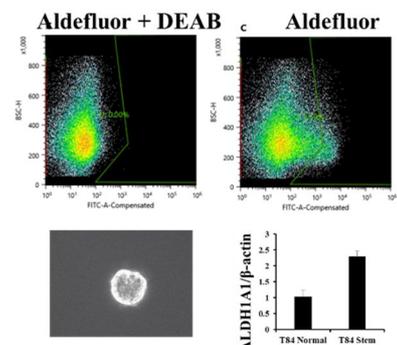


図1 T84からの癌幹細胞の樹立

## (2) 大腸癌幹細胞のイオン輸送体遺伝子発現の確認

網羅的遺伝子解析の結果として抽出された、CLCN5, LRRC8a, AQP1 について、癌幹細胞(Stem cells)と起源の癌細胞株(Normal cells)から cDNA を抽出し RT-PCR で再評価し、網羅的遺伝子解析同様の発現変化があることを確認した(図2)

## (3) 癌幹細胞、通常癌細胞に対する低浸透圧刺激時の容積変化の比較

1/2 低張液から 1/16 低張液まで比較を行ったところ、1/16 低張液といった極限の低浸透圧状態においても癌幹細胞は容積を一定期間保持し破裂を回避している様であった。一方で 1/2 程度の mild な低浸透圧刺激では、通常細胞株では RVD が生じ破裂を回避するのに対して、癌幹細胞では RVD は認められなかったが、容積が通常細胞ほど増大せず一定の容積を保持する特徴が見られた(図3)

## (4) 低浸透圧刺激を与えた際の癌幹細胞、通常癌細胞の細胞生存性の評価

1/2 低浸透圧、1/16 低浸透圧両者に一定時間曝露後 48 時間培養した後の細胞数を測定する assay を行ったところ、癌幹細胞では通常の細胞株に比して低浸透圧刺激に対してより多く細胞が生存していることが示された。これは、低浸透圧培地(1/2 または 1/4)で培養する assay でも同様の傾向がみられ、癌幹細胞は低浸透圧刺激に対して耐性を示すことがわかった(図4)。

## (5) 標的遺伝子を siRNA knockdown した際の低浸透圧耐性の評価

LRRC8A は RVD に強く関わる Cl<sup>-</sup>チャンネルであり、これを標的遺伝子として knockdown することとした。siRNA を用いて knockdown を行い、RT-PCR で knockdown 効率を確認した後、(4)同様の 2 つの方法で培養後の viability を評価したところ、どちらの手法においても knockdown した細胞で培養後の細胞数が低下しており、LRRC8a が低浸透圧刺激に対する癌幹細胞の耐性に関与していることが推定された。

## (6) 各種イオン輸送体阻害剤を用いた際の細胞容積変化の評価

癌幹細胞の低浸透圧刺激による容積調整にどのようなイオン輸送体が強く関わっているかを評価するため、K<sup>+</sup>チャンネル阻害剤(Quinine), Cl<sup>-</sup>チャンネル阻害剤(NPPB)、水チャンネル阻害剤(水銀)を用いた上で、低浸透圧刺激を与えた際の容積変化への影響を評価した。通常癌細胞では、NPPB は著明に RVD を抑制し、Quinine, Hg(水銀)は、RVD も抑制しつつ、容積の増大も抑制されていた。癌幹細胞でも Quinine と水銀は同様の傾向がみられたが、水銀は特に水の流入を著しく抑制していた。NPPB ではコントロールと比較して容積が増大傾向であった。結果として、Cl<sup>-</sup>チャンネル阻害は癌幹細胞の低浸透圧刺激に対する容積増大の抑制効果を解除できる可能性があり、加えて癌幹細胞では水チャンネルの発現上昇によって水が通常癌細胞よりも容易に移動できる性質がある可能性が示唆された。

## (7) 今後の研究課題について

今後は以下について、さらに研究を継続予定である。

- 癌幹細胞に対して AQP1, LRRC8a を knockdown した際のアポトーシスの評価
- 同様に knockdown した際の遊走、浸潤能の評価

網羅的遺伝子解析結果(HT-29由来癌幹細胞/HT-29)

Symbol	Gene Name	Fold Change
CLCN5	chloride voltage-gated channel 5	2.43
LRRC8A	leucine rich repeat containing 8 VRAC subunit A	2.69
AQP1	aquaporin 1 (Colton blood group)	14.59

RT-PCR法による網羅的遺伝子解析結果の検証

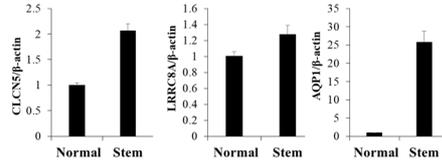


図2 癌幹細胞の遺伝子解析

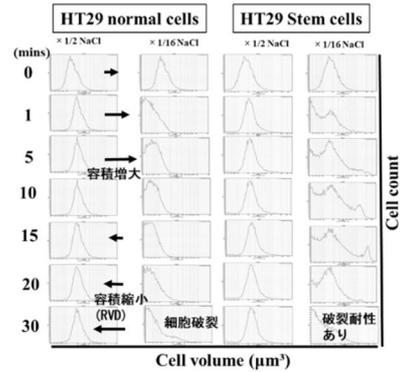


図3 低浸透圧刺激時の容積変化

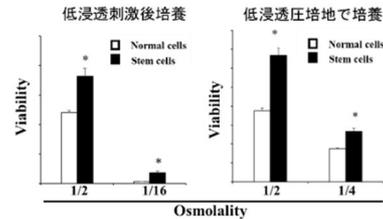


図4 低浸透圧刺激後のviability

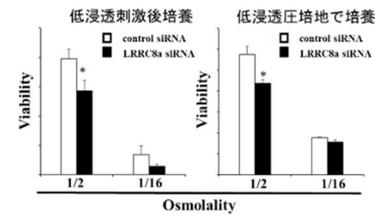


図5 LRRC8a knockdown後、癌幹細胞の浸透圧耐性の変化

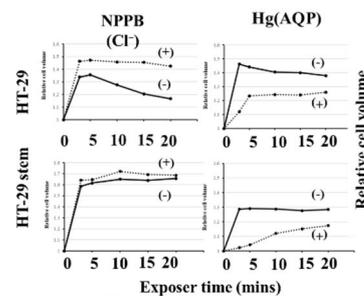


図6 イオン輸送体阻害時の低浸透圧刺激に対する容積変化

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0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 Inoue H, Shiozaki A, Kosuga T, Shimizu H, Kudou M, Ohashi T, Arita T, Konishi H, Komatsu S, Kubota T, Fujiwara H, Okamoto K, Kishimoto M, Konishi E, Otsuji E.	4. 巻 29(13)
2. 論文標題 Anoctamin 5 regulates the cell cycle and affects prognosis in gastric cancer.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of surgical oncology	6. 最初と最後の頁 4649-4647
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3748/wjg.v28.i32.4649.	査読の有無 無
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 Kurashima Kento, Shiozaki Atsushi, Kudou Michihiro, Shimizu Hiroki, Arita Tomohiro, Kosuga Toshiyuki, Konishi Hirotaka, Komatsu Shuhei, Kubota Takeshi, Fujiwara Hitoshi, Okamoto Kazuma, Kishimoto Mitsuo, Konishi Eiichi, Otsuji Eigo	4. 巻 24
2. 論文標題 LRRc8A influences the growth of gastric cancer cells via the p53 signaling pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gastric Cancer	6. 最初と最後の頁 1063 ~ 1075
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10120-021-01187-4	査読の有無 無
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 Mitsuda Masato, Shiozaki Atsushi, Kudou Michihiro, Shimizu Hiroki, Arita Tomohiro, Kosuga Toshiyuki, Konishi Hirotaka, Komatsu Shuhei, Kubota Takeshi, Fujiwara Hitoshi, Okamoto Kazuma, Kishimoto Mitsuo, Konishi Eiichi, Otsuji Eigo	4. 巻 28
2. 論文標題 Functional Analysis and Clinical Significance of Chloride Channel 2 Expression in Esophageal Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 5384 ~ 5397
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-021-09659-8	査読の有無 無
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2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shunji Kato
2. 発表標題 Colorectal cancer stem cells have resistance to hypotonic shock
3. 学会等名 第80回日本癌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塩崎 敦、工藤道弘
2. 発表標題 肺癌幹細胞における電位依存性カリウムチャネルの発現機能解析
3. 学会等名 日本癌治療学会総会
4. 発表年 2022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