

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 4 月 1 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659233

研究課題名（和文）：Epigenetic 修飾の包括的・統合的解析による新規癌幹細胞制御法の確立

研究課題名（英文）：Comprehensive analysis for epigenetic modulation of the effects of anticancer agents on cancer stem cells.

研究代表者：宇都宮 徹 (UTSUNOMIYA TOHRU)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：30304801

研究成果の概要（和文）：遺伝子発現を制御している epigenetic 修飾に着目し、癌幹細胞の抗癌剤抵抗性の機序解明と治療効果増強作用につき研究した。1. 抗癌剤とヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤の併用効果：複数の癌細胞株で単独治療と比べ併用療法で相乗効果が得られた。2. HDAC 阻害剤による癌幹細胞の分化誘導：癌幹細胞に HDAC 阻害剤を加えることで EpCAM 等の癌幹細胞マーカー発現が減弱した。3. DNA マイクロアレイによる機序解明：抗癌剤単独と HDAC 阻害剤と抗癌剤の併用群での遺伝子発現パターンを比較し 43 個の関連遺伝子を同定した。ネットワーク解析にて候補遺伝子を絞り込んだ。

研究成果の概要（英文）：We investigated the significance of epigenetic modulation of the effects of anticancer agents on cancer stem cells. We found that combination therapy of anticancer agents and histone deacetylase inhibitor (HDACi) markedly reduced cancer cell viability compared to that of each single agent alone. We confirmed that HDACi induced cell differentiation of cancer cell lines in terms of stemness genes and cancer stem cell markers. Finally, we identified the candidate genes, which might be responsible to the synergistic effects of HDACi, using a DNA microarray analysis and a gene network analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	0	1,800,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	330,000	3,230,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：エピジェネティック修飾・がん幹細胞・幹細胞マーカー・

ヒストン脱アセチル化・抗癌剤抵抗性・分化誘導・DNA マイクロアレイ解析

1. 研究開始当初の背景
われわれは消化器癌の癌幹細胞(SP 細胞)を

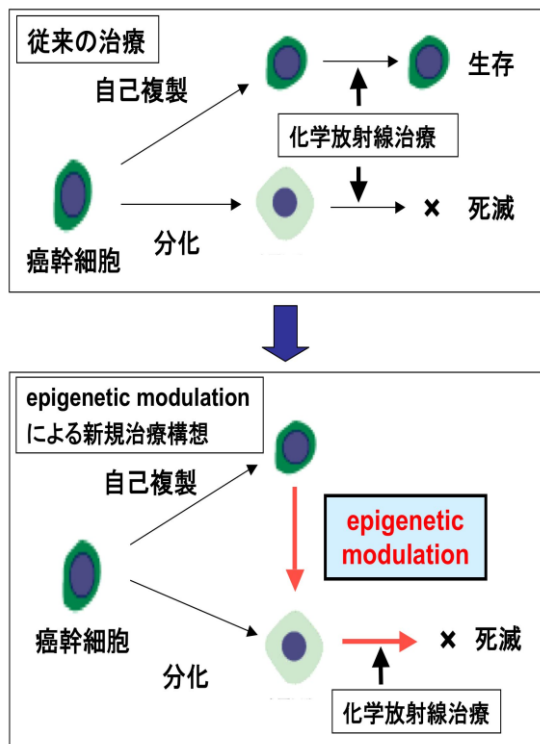
flow cytometry を用いて分離し、遺伝子発現の特徴を non-SP 細胞と比較した (Stem Cells

24:506, 2006)。これら遺伝子発現の相違に関しては不明な点が多いが、少なからず epigenetic 修飾が関与している可能性が考えられる。

epigenetic 修飾と幹細胞に関しては、脂肪組織由来幹細胞を臍島細胞に分化させる際に HDAC 阻害剤を添加することで脂肪幹細胞を内胚葉成分に分化させるといった実験や (Stem cell 27:1941, 2009)、胚細胞癌で HDAC 阻害剤を加えると Oct4 や Nanog といった stemness gene の発現が減少し各胚葉のマーカーが出現するといった報告がある (Cancer Res 69:5716, 2009)。したがって、癌幹細胞においても同様に epigenetic 修飾による stemness の獲得や制御の可能性が考えられるが、これまで癌幹細胞の epigenetic 修飾に焦点を当てた研究は少ない。

2. 研究の目的

一般に、癌幹細胞研究の多くは癌の治療抵抗性を克服することを目的としている。われわれは epigenetic 修飾の癌幹細胞への関与を包括的に解析し、その modulation を行うことで癌幹細胞治療 (治療抵抗性解除) につながるか否かについて検討した。



3. 研究の方法

1) 抗癌剤とヒストン脱アセチル化酵素

(HDAC) 阻害剤の併用効果: ① 胆管癌細胞株 (HuCCT1) を用いて抗癌剤 (Gemcitabine: GEM) と HDAC 阻害剤 (valproic acid: VPA) の併用効果を MTT assay にて評価した。② HuCCT1 と臍癌細胞株 (SUIT-2) を用いて抗癌剤 (5-FU)

と VPA の併用効果について評価した。

2) HDAC 阻害剤による癌幹細胞の分化誘導効果:

① Cancer sphere の作製: ヒト大腸癌細胞株 (HCT-116) を用いて癌幹細胞の特徴を有するとされる Cancer sphere を特殊培養環境下にて作製した。② VPA の stemness gene 発現への影響: 肝癌細胞株 (HepG2, PLC/PRF-5) において、Oct4, Nanog, SOX2, CXCR4 遺伝子発現を RT-PCR 法にて評価した。

3) DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝

子発現解析による機序解明: HuCCT1 を用いて、

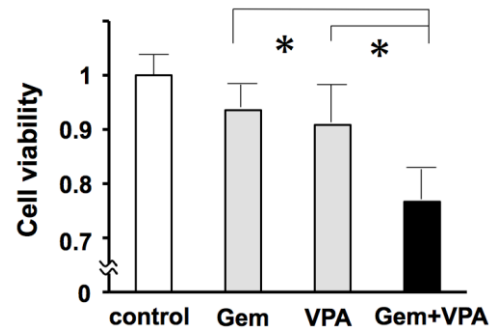
GEM 単独と VPA と GEM の併用群での遺伝子発現パターンを GeneSpring GX11 を用いて比較した。さらに Ingenuity pathway analysis を用いた遺伝子ネットワーク解析を行った。

4. 研究成果

1) 抗癌剤とヒストン脱アセチル化酵素

(HDAC) 阻害剤の併用効果:

① HuCCT1 を用いた検討にて、GEM: 5nM と VPA: 0.5mM は各々単独では効果を認めないがこれらの併用により有意な細胞増殖抑制効果を認めることを確認した。



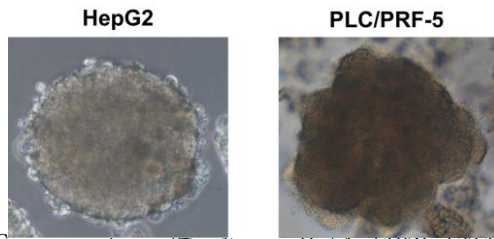
② HuCCT1 と SUIT-2 を用いた検討にて、5-FU: 1.0μM と VPA: 0.5mM は単独では効果を認めないが、これらの併用により有意な細胞増殖抑制効果を認めた。したがって抗癌剤にエピジェネティック修飾を目的とした VPA を併用することで抗癌剤感受性が增强することが考えられた。

2) HDAC 阻害剤による癌幹細胞の分化誘導効果:

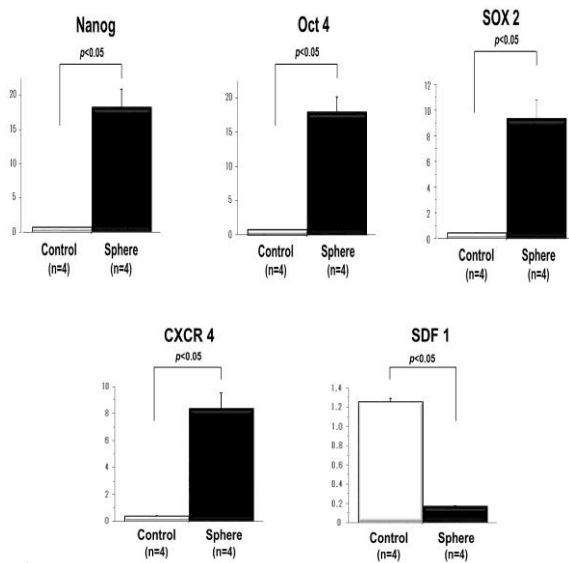
① Cancer sphere の作製: ヒト大腸癌細胞株 (HCT-116) を用いた検討にて、Cancer sphere は、Oct4, Nanog, Bmi-1 などの幹細胞特異的遺伝子 (stemness gene) や CD44, EpCAM などの癌幹細胞マーカーを高発現していることを確認した。また、Cancer sphere の形態は、VPA を培養液中に加えることで濃度依存性に徐々に崩れ、通常培養の細胞集団 (癌幹細胞の特徴を有さない) へと変化した。さらに、Oct4, Nanog, Bmi-1 遺伝子発現を RT-PCR 法にて評価した結果、VPA 投与により有意に発現低下を認め癌幹細胞としての性質を失いつつあると考えられた (平成 22 年度)。

平成 23 年度には、ヒト肝癌細胞株を用いて

Cancer sphere を作成し、以下の結果を得た。

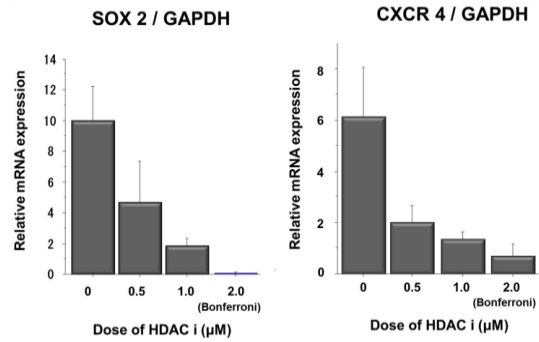
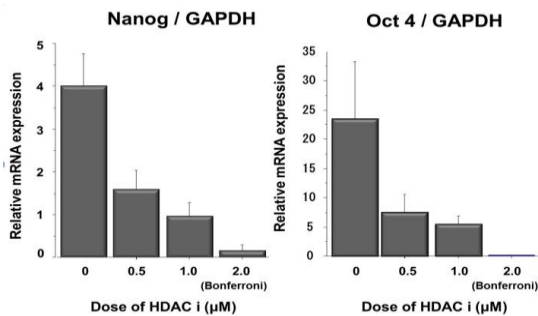


Cancer sphere は、Nanog, Oct4, SOX2, CXCR4, などの stemness gene を高発現していることを確認した。

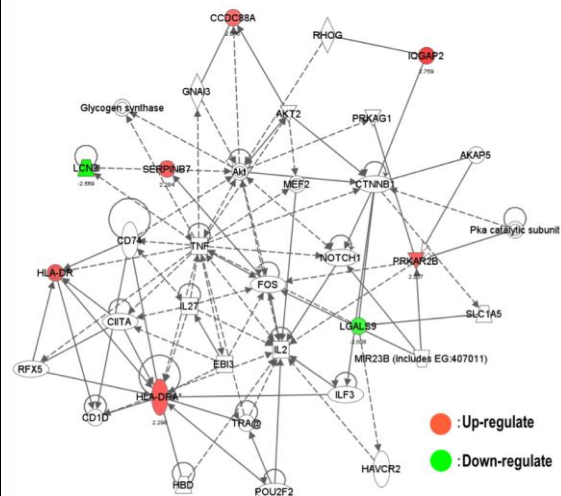


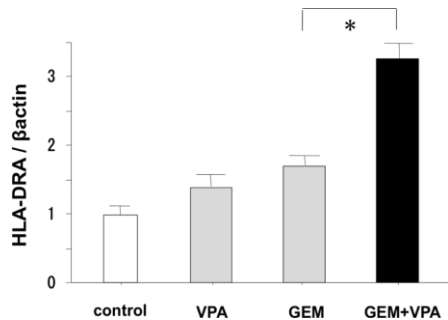
さらに、1w1st, p16, claudin 4 などの epithelial mesenchymal transition (EMT) マーカーや Sirt 1, Sirt 3 などの aging gene などの発現変化も確認し、親株と Cancer sphere との遺伝子発現の違いについてその特徴を明らかにした。

② VPA の stemness gene 発現への影響: Oct4, Nanog, SOX2, CXCR4 遺伝子発現を RT-PCR 法にて評価した結果、VPA (HDACi) を投与することにより容量依存性に有意にそれぞれ発現低下を認め、癌幹細胞としての性質が減弱することを確認した。



3) DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析による機序解明: HuCCT1 を用いて、GEM 単独と VPA と GEM の併用群での遺伝子発現パターンを GeneChip Human Gene 1.0 ST Array (Affimetrix) を用いて比較、すなわち VPA 併用による遺伝子発現への影響を網羅的に解析した。Fold change 2 倍以上、P < 0.05 の条件で関連遺伝子を抽出したところ、37 個の up-regulated 遺伝子 (ANKRD1, ANKRD22, CPM, LRRC49, CALB2, SERPINB7, CCDC88A, IQGAP2, CAMK4, ENPP1, PRKAR2B, SGCE, LRRCC1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB3, HLA-DPB1, SELL, PLCE1, CNTN1, ARHGDI, SILV, PHOSPHO1, PSG4, ATP6V1C2, MBOAT2, CALCRL, SPP1, SEPP1, SSBP2, CTGF, TSPAN13, PEG10, CD274, TSPAN7, FHL1, TMPRSS11E) と 6 個の down-regulated 遺伝子 (HIST2H2BE, DPEP1, LGALS9, ABCA12, LCN2, NMI) の合計 43 個の関連遺伝子を同定できた。さらに GeneSpring GX11.5 (Agilent) を用いて Gene ontology を検索した後に、IPA による遺伝子ネットワーク解析の結果、併用による効果増強に HLA-DRA の発現増強や LGALS9 の発現低下が関与している可能性が確認できた。また、HLA-DRA 遺伝子発現については、RT-PCR 法にて DNA マイクロアレイ解析結果の検証も可能であった。





以上のごとく、抗癌剤とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を併用することで癌幹細胞の分化誘導が可能となり、抗癌剤抵抗性が解除できる可能性が示された。さらに、DNAマイクロアレイ解析にて、その分子機序に関与する遺伝子ネットワークを同定できた。

【今後の展望】

究極の目的は癌の根治であり、臨床的立場からも in vivo での抗腫瘍効果の確認がまず必要である。In vitro での実験結果と同様に抗癌剤の効果をエピジェネティック修飾（ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤など）により効果増強が可能であることを検証する必要がある。しかし、さらなる効果増強のためには分子機序の解明が不可欠である。われわれは、in vivo 実験を進めるとともに、もうひとつのエピジェネティック修飾であるメチル化の関与の解明を進めている。具体的には、癌細胞株の親株と癌幹細胞のメチル化状態を網羅的に評価するために DNA メチレーションアレイ (Infinium HumanMethylation450 BeadChip) 解析を進めている。

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 16 件)

1. Utsunomiya T, et al. (12 人中 4 番目). The Impact of Pegylated-Interferon alpha-2b on Partial and Massive Hepatectomy Model in Rats. *Hepatogastroenterology*. 2011; (in press) 査読あり
DOI, URL ともになし
2. Utsunomiya T, et al. (10 人中 3 番目). Modified liver hanging maneuver focusing on the ligamentum venosum in left hepatic lobectomy. *World J Surg*. 2011; (in press) 査読あり
DOI : 10.1007/s00595-011-0051-2
3. Utsunomiya T, et al. (9 人中 1 番目)

Human adipose-derived stem cells: potential clinical applications in surgery.

Surg Today. 2011;41(1):18-23. 査読あり
DOI:10.1007/s00595-010-4415-9

4. Utsunomiya T, et al. (2 人中 1 番目). Modified hanging method for liver resection and liver mobilization. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2011; 19:19-24. 査読あり
DOI: 10.1007/s00534-011-0442-1
5. Utsunomiya T, et al. (6 人中 3 番目). Effects of Pegylated Interferon α2b on Metastasis of Hepatocellular Carcinoma. *J Surg Res*. 2011; 172:95-101. 査読あり
DOI: 10.1016/j.jss.2010.07.023
6. Utsunomiya T, et al. (10 人中 3 番目). Hypoxia inducible factor expression in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatogastroenterology*. 2011; 58:1439-1444 査読あり
DOI: 10.5754/hge11156
7. Utsunomiya T, et al. (10 人中 3 番目). Histone deacetylase inhibitor augments anti-tumor effect of gemcitabine and pegylated interferon-α on pancreatic cancer cells. *Int J Clin Oncol*. 2011; 16:671-678. 査読あり
DOI: 10.1007/s10147-011-0246-y
8. Utsunomiya T, et al. (9 人中 3 番目). Role of dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase expression in immunohistochemistry of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatol Res*. 2011;41(1):64-70. 査読あり
DOI:10.1111/j.1872-034X.2010.0722.x.
9. Utsunomiya T, et al. (10 人中 3 番目). Effect of histone deacetylase inhibitor in combination with 5-fluorouracil on pancreas cancer and cholangiocarcinoma cell lines. *J Med Invest*. 2011;58:106-9. 査読あり
DOI:10.2152/jmi.58.106
10. Utsunomiya T, et al. (2 人中 1 番目). Molecular characteristics of non-cancerous liver tissue in non-B non-C hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*. 2011; 41(8):711-721. 査読あり
DOI: 10.1111/j.1872-034X.2011.00818x.
11. Utsunomiya T, et al. (7 人中 6 番目). Expression of thrombospondin-1 and Ski are prognostic factors in advanced gastric cancer. *Int J Clin Oncol*. 2011;16:145-52. 査読あり
DOI:10.1007/s10147-010-0147-5
12. Utsunomiya T, et al. (9 人中 1 番目). Histone deacetylase inhibitor enhances the anti-tumor effect of gemcitabine: A special reference to gene-expression microarray analysis. *Oncol Rep*. 2011;26:1057-1062. 査読あり
DOI: 10.3892/or.2011.1407.
13. Utsunomiya T, et al. (7 人中 4 番目). CD133 expression in potential prognostic indicator in intrahepatic

cholangiocarcinoma.

J Gastroenterol. 2010;45:896-902. 査読あり

DOI: 10.1007/s10147-010-0147-5

14. Utsunomiya T, et al. (11人中3番目). Impact of splenectomy in patients with liver cirrhosis: Results from 18 patients in a single center experience.

Hepatol Res. 2010 Sep;40(9):894-900. 査読あり

DOI:

10.1111/j.1872-034X.2010.00688.x

15. Utsunomiya T, et al(6人中1番目). Molecular signatures of noncancerous liver tissue can predict the risk for late recurrence of hepatocellular carcinoma.

J Gastroenterol. 2010 Feb;45(2):146-52. 査読あり

DOI: 10.1007/s00535-009-0164-1

[学会発表] (計 22 件)

1. Utsunomiya T, et al. (12人中1番目). Effects of gemcitabine combined with 5-fluorouracil and cisplatin (GFP) for patients with unresectable biliary carcinoma and its possible usefulness for postoperative adjuvant chemotherapy. 21st World Congress of the International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists. Tokyo, November 9-12, 2011.
2. Utsunomiya T, et al. (12人中1番目). Molecular signatures of noncancerous liver tissue can predict the risk for late recurrence of hepatocellular carcinoma. 21st World Congress of the International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists. Tokyo, November 9-12, 2011.
3. Utsunomiya T, et al. (10人中3番目). CD44 Expression Can Predict Prognosis of Intrahepatic Cholangiocarcinoma. 97th Clinical Congress of American College of Surgeons. San Francisco, October 23-27, 2011.
4. 宇都宮徹 ほか (3人中3番目). C型肝硬変に対するABO不適合肝移植後の低用量Peg-IFN/RBV療法の有用性. JDDW(日本消化器関連学会集会), 福岡国際会議場(福岡市), 10月20-23日, 2011.
5. 宇都宮徹 ほか (3人中3番目). 肝虚血再灌流傷害におけるヒト脂肪由来幹細胞 homing effect の機序解明. JDDW(日本消化器関連学会集会), 福岡国際会議場(福岡市), 10月20-23日, 2011.
6. 宇都宮徹 ほか (3人中3番目). 消化器癌における癌幹細胞マーカー発現の意義とエピジェネティック修飾による制御の可能性. JDDW(日本消化器関連学会集会), 福岡国際会議場(福岡市), 10月20-23日, 2011.
7. Utsunomiya T, et al. (10人中3番目). Role of histone deacetylase expression in IHCC: A possible epigenetic regulation of cancer stem cell. 8th International Symposium on Minimal Residual Cancer. Osaka, September 21-23, 2011.
8. 宇都宮徹 ほか (13人中3番目). 細胆管細胞癌は肝幹細胞由来の原発性肝腫瘍の特徴を有する. 第47回 日本肝癌研

究会, 静岡県コンベンションアーツセンター(静岡市), 7月28-29日, 2011.

9. 宇都宮徹 ほか (12人中3番目). ヒストンアセチル化に基づく消化器癌幹細胞制御の可能性. 第111回 日本外科学会定期学術集会, 震災のため紙面発表, 5月18-26日, 2011.
10. 宇都宮徹 ほか (11人中3番目). 胆管癌細胞においてHDAC阻害剤はGemcitabineの抗腫瘍効力を増強する - Ingenuity Pathways AnalysisによるGene networkに着目して-. 第111回 日本外科学会定期学術集会, 震災のため紙面発表, 5月18-26日, 2011.
11. 宇都宮徹 ほか (12人中3番目). 細胆管細胞癌は肝幹細胞由来の原発性肝腫瘍の特徴を有する一幹細胞マーカーの発現パターンに着目して-. 第111回 日本外科学会定期学術集会, 震災のため紙面発表, 5月18-26日, 2011.
12. Utsunomiya T, et al. (12人中3番目). Role of histone deacetylase expression in intrahepatic cholangiocarcinoma. 102nd American Association for Cancer Research. Orlando, April 2-6, 2011.
13. Utsunomiya T, et al. (12人中3番目). Role of histone deacetylase expression in intrahepatic cholangiocarcinoma. 102nd American Association for Cancer Research. Orlando, April 2-6, 2011.
14. Utsunomiya T, et al. (12人中3番目). Effect of histone deacetylase inhibitor in combination with 5-fluorouracil on pancreas cancer and cholangiocarcinoma cell line. 102nd American Association for Cancer Research. Orlando, April 2-6, 2011.
15. Utsunomiya T, et al. (9人中3番目). Effect of a histone deacetylase inhibitor on antitumor effect of gemcitabine to focus the gene network of ingenuity pathways analysis. Gastrointestinal Cancers Symposium: Science and Multidisciplinary Management of GI Malignancies. San Francisco, January 20-22, 2011.
16. Utsunomiya T, et al. (9人中5番目). Role of histone deacetylase expression on regulating cancer stem cells in intrahepatic cholangiocarcinoma. Gastrointestinal Cancers Symposium: Science and Multidisciplinary Management of GI Malignancies. San Francisco, January 20-22, 2011.
17. 宇都宮徹 ほか (11人中3番目). 肝内胆管癌における癌幹細胞を中心とした分子治療の可能性. 第21回日本消化器癌発生学会総会. 軽井沢プリンスホテル(軽井沢市), 11月18-19日, 2010.
18. 宇都宮徹 ほか (13人中13番目). 癌幹細胞マーカーからみた細胆管細胞癌及び胆管細胞癌の発生. 第21回日本消化器癌発生学会総会. 軽井沢プリンスホテル(軽井沢市), 11月18-19日, 2010.
19. Utsunomiya T, et al. (10人中3番目). Histone deacetylase inhibitor enhances anti-tumor effect of gemcitabine on pancreatic cancer and cholangiocarcinoma cell line. 20th World Congress of the International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists. Egypt,

- October 20-23, 2010.
20. 宇都宮徹 ほか (3人中3番目).胆管癌におけるHDAC阻害剤の有用性の検討. JDDW(日本消化器関連学会集会). パシフィコ横浜 (横浜市), 10月13-16日, 2010.
 21. 宇都宮徹 ほか (3人中3番目).胆管癌におけるHDAC阻害剤の有用性の検討. JDDW(日本消化器関連学会集会). パシフィコ横浜 (横浜市), 10月13-16日, 2010.
 22. Utsunomiya T, et al. (9人中3番目). Saito Y, Shimada M, Utsunomiya T, Morine Y, Imura S, Ikemoto T, Mori H, Hanaoka J, Iwahashi S. The correlation between cancer stem like cells and epigenetic alteration in intrahepatic cholangiocarcinoma. The 9th International Conference of The Asian Clinical Oncology Society.Gihu, August 24-27, 2010.

[図書] (計0件)

該当なし

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

該当なし

○取得状況 (計0件)

該当なし

[その他]

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇都宮 徹 (UTSUNOMIYA TOHRU)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・准教授

研究者番号：30304801

(2) 研究分担者

島田 光生 (SHIMADA MITSUO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授

研究者番号：10216070

杉本 光司 (SUGIMOTO KOJI)

徳島大学・病院・医員

研究者番号：20448327

(H23 研究分担者)

岩橋 衆一 (SHUICHI IWAHASHI)

徳島大学・病院・医員

研究者番号：30531751

(H22 研究分担者)