

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501282

研究課題名(和文) 新しい初代癌細胞3次元培養法を用いた低酸素によるDormancy誘導機構の解明

研究課題名(英文) Hypoxia-induced dormancy identified by a novel 3D culture method of primary cancer

研究代表者

奥山 裕照 (Okuyama, Hiroaki)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター(研究所)・研究所・総括研究員

研究者番号：50432373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍内低酸素領域の癌細胞は治療抵抗性となり、その機序の解明が待たれる。以前、大腸癌細胞株を用いて、低酸素領域では癌細胞ががん遺伝子c-Mycの蛋白量を低下させ代謝を止め冬眠状態になり、細胞死を回避することを報告した。本研究では、ヒトの実際の腫瘍を3次元培養し、低酸素で同じようにc-Mycの蛋白量が低下することを明らかにした。また、c-Mycが低下する機序に小胞体ストレスが関与する可能性も見出した。

研究成果の概要(英文)：Cancer cells are refractory in the hypoxic region of solid tumors. The mechanism of refractory hypoxic cancer cells should be clarified. We previously reported that deprivation of oxygen and glucose reduced c-Myc protein to make cancer cells dormant and inhibit cell death. In this study, we cultured primary colorectal cancer cells three dimensionally and found that hypoxic treatment reduced c-Myc protein in primary cancer cells. In addition, we found that ER stress might contribute to reduction of c-Myc protein in primary cancer cells.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：がん細胞の特性 低酸素

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 腫瘍の内部環境は、治療効果や癌の悪性化と密接に関係することが明らかにされ新たな治療標的として注目されている。中でも低酸素領域は腫瘍の悪性化に密接に関与しているだけでなく、治療抵抗性の要因である。低酸素領域の悪性化にはさまざまな機序がある。一つには低酸素誘導因子1を介した血管新生、代謝、ミトコンドリア機能の制御による低酸素への適応である。また、我々が報告した低酸素領域での休眠状態もその機序となる。休眠状態は幹細胞本来の特性であることから、低酸素領域で代謝が抑制された不活性な癌細胞が癌幹細胞化する可能性がある。正常の幹細胞とくに造血幹細胞ではヒエラルキーが証明され、また induced pluripotent stem cell (iPS 細胞)の発見により先祖がえりの分子機構が解明された。低酸素が iPS 誘導を促進することも明らかとなった。一方、癌幹細胞仮説は白血病、乳癌、脳腫瘍では癌幹細胞を頂点とするヒエラルキーが成立しているが、ほかの固形癌ではいまだ議論が続き、最近では多数の癌細胞が癌幹細胞に変化し腫瘍形成能をもつとする仮説が提唱されている。その機序としては、間質細胞が放出する液性因子が Wnt を介して先祖がえりを誘導し癌幹細胞化を起こす、あるいは低酸素で誘導される H3K4 demethylase JARID1B の発現を介して癌幹細胞化を起こすなどの報告がある。

(2) 腫瘍内の低酸素領域の癌細胞の特性を解明するために、我々は大腸癌細胞株 HCT116 由来異種移植腫瘍を用いて、免疫組織染色を行った。血管周囲に BrdU 陽性(増殖期のマーカー)、リン酸化 S6 陽性(代謝のマーカー)の活発に代謝する増殖性の癌細胞を認めた。一方、血管から離れた部位にはピモニダゾール陽性(低酸素のマーカー)、低酸素誘導因子1陽性、BrdU 陰性、リン酸化 S6 陰性の

非増殖性かつ代謝活動が抑制された低酸素領域の癌細胞の存在を確認した。さらに、腫瘍内の低酸素領域の癌細胞の特性を網羅的遺伝子発現解析アレイで調べた。腫瘍切片から血管周囲と血管から離れた部位をレーザーマイクロダイセクション(顕微鏡下に組織の一部を切り出す装置)にて切り出し、そこから RNA を抽出し、網羅的遺伝子発現解析アレイで比較検討した。低酸素下で培養された株化癌細胞では低酸素誘導因子1の下流のいわゆる低酸素応答遺伝子が誘導されたが、驚くべきことに大腸癌細胞株 HCT116 由来異種移植腫瘍の腫瘍内低酸素領域の癌細胞では解糖系酵素の遺伝子がまったく誘導されていないことを発見した。以上のことから、腫瘍内低酸素領域の癌細胞は代謝活動が低下していることが示唆された。低酸素領域の癌細胞の代謝抑制の分子機構として、低酸素・低栄養培養下で c-Myc の発現が強力に抑制されていることを発見した。癌細胞の活性状態と休眠状態の転換スイッチとしての c-Myc 制御機構が示唆された。加えて、c-Myc をロックダウンした細胞株では低酸素・低栄養下での細胞死が抑制されることから、低酸素・低栄養下での c-Myc 抑制が、癌細胞の代謝活動を止め、その厳しい環境に適応する生存戦略であることが示唆された。

(3) 癌細胞株と実際のヒト腫瘍はその性質がかなり異なることが知られており、臨床での個別化医療を目指すためにも、癌細胞株ではなく実際のヒト腫瘍の初代培養癌細胞を用いることは重要である。しかし、これまで癌組織の初代培養は満足いく結果は得られていない。従来の培養法では酵素処理後、単細胞を接着培養皿の上まき血清入り培地で培養するものの、生存率が低く癌細胞の純度も悪い。そこで我々は、酵素処理後の単細胞を利用せず細胞塊を特殊な条件で培養することにより、効率よく、高い生存率、高純

度な球状の3次元細胞塊を臨床検体から培養できる方法を発見し、そこから得られる球状の3次元細胞塊を cancer tissue originated spheroid (CTOS) と名付けた。CTOS は原発腫瘍と組織学的に原発腫瘍と同じ性状を示し、間質細胞の混入も見られない。

## 2. 研究の目的

腫瘍内低酸素領域の癌細胞は治療抵抗性となり、その機序の解明が待たれる。これまで我々は、大腸癌細胞株を用いて、低酸素領域では癌細胞が c-Myc の抑制を介して代謝を止め冬眠状態になり、細胞死を回避することを明らかにした。しかし、実際のヒト腫瘍ではいまだ低酸素領域での代謝および休眠状態について不明である。そこで、我々が近年開発した臨床検体からの新たな3次元初代培養法を用いて、ヒト大腸癌の低酸素領域での代謝および休眠状態について解析することを目的とする。また、その分子機構は c-Myc を中心に解析することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 大腸癌細胞株で示した「低酸素・低栄養環境によって癌細胞が c-Myc の抑制を介して代謝を止め、冬眠状態になる」という現象が臨床検体のヒト大腸癌でも見られるかを検証した。具体的には、我々が開発したヒト癌組織由来の3次元初代培養法 (CTOS 法) を利用し、低酸素・低栄養環境による休眠状態誘導機構を増殖・代謝活性および c-Myc を中心とした分子機構を解析した。

(2) 低酸素・低栄養で c-Myc 蛋白量が低下する機序を解明するために、まず、小胞体ストレスの関与をみるために、小胞体ストレスのマーカーの発現を CHOP, eIF-2 で解析した。つぎに、c-Myc の変異蛋白を作成し、それらが低酸素・低栄養で低下するか否かを蛋白レベルで解析した。

## 4. 研究成果

(1) cancer tissue-originated spheroid (CTOS) における c-Myc の発現解析を行った。CTOS と癌細胞株との遺伝子発現を比較した。ヒト大腸癌の CTOS と2次元培養したがん細胞株との遺伝子発現を網羅的遺伝子発現解析アレイで比較検討した。解糖系酵素発現に差が見られた。低酸素培養下での CTOS における低酸素誘導因子と c-Myc の発現を検討した。CTOS を低酸素下で培養すると、低酸素誘導因子の発現が見られるものの、c-Myc の発現は無くなった。この現象は、がん細胞株で見られた知見と異なる。がん細胞株では、低酸素・低栄養で初めて c-Myc の蛋白量の低下が認められた。一方、ヒトのがんから調製した CTOS では低酸素のみで c-Myc 蛋白量が低下することを発見した。これらの結果から、ヒトのがん細胞では、がん細胞株に比べて、低酸素ストレスに対する応答性が過敏であることが示唆され、ヒトのがんは環境ストレスにいち早く応答し、c-Myc を介した代謝調節を行い、細胞死を防ぐ反応を起こしていることが考えられた。

(2) 低酸素・低栄養下での c-Myc 低下のメカニズムについて検討した。低酸素誘導因子 1 および低酸素誘導因子 2 は低酸素で誘導される転写因子であり、低酸素における細胞の特性の多くを制御する重要な因子である。低酸素誘導因子 1 と c-Myc が相補的に発現し、がん細胞株における細胞特性を制御するとする報告もあることから、われわれは低酸素・低栄養における c-Myc の蛋白量の低下に低酸素誘導因子 1 および低酸素誘導因子 2 が関与するか否かを検討した。低酸素誘導因子 1 および低酸素誘導因子 2 の関与を検討するために、HCT116 細胞株を用いて低酸素誘導因子 1 および低酸素誘導因子 2 のノックダウン細胞株を樹立し、c-Myc の発現の変化を検討した。結果は、低酸素誘導因子 1 および低酸素誘導因子 2 いずれのノックダウン

細胞株も低酸素・低栄養における c-Myc の蛋白量の低下に影響を及ぼさなかった。さらに、低酸素・低栄養のストレス条件は細胞の飢餓状態を生み出し、細胞内小器官の融解を伴う小胞体ストレスを起こすことが報告されていることから、小胞体ストレスの関与を検討した。小胞体ストレスのマーカーとして、CHOP と eIF-2 が知られており、それらのマーカーを蛋白・遺伝子レベルで解析した。結果は、CHOP も eIF-2 もともに低酸素・低グルコース環境下で著明に上昇していた。これらの結果から、低酸素・低栄養において小胞体ストレスが著明に起こっていることは明らかであり、低酸素・低栄養における c-Myc の蛋白量の低下も小胞体ストレスを介して分解されている可能性が示唆された。

(3) 低酸素・低栄養条件下での c-Myc の分解の機序をさらに追求した。C-Myc は常に生産と分解を繰り返している蛋白である。この c-Myc の分解の機序は Fbw7 と skp-2 という 2 種類の蛋白が関与していることが報告されている。Fbw7 は Myc 結合領域 1 のスレオニン 58 とセリン 62 が関与する。そこで、スレオニン 58 とセリン 62 を変異させた変異体の c-Myc を作成し、低酸素・低栄養に暴露したところ、やはり分解された。skp2 は c-Myc の Myc 結合領域 2 という部位に結合し c-Myc 分化に関与する。Myc 結合領域 2 を欠失させた変異体 c-Myc や C 末端を欠失させた変異体や、Myc 結合領域 2 と C 末端を同時に欠失させた変異体 c-Myc、さらに、N 末端を欠失させた変異体 c-Myc を作成し、これらの変異体 c-Myc が低酸素・低栄養で低下するか否かを検討したところ、いずれも低酸素・低グルコース下で分解された。以上の結果から、c-Myc 特異的な分解の機序よりも小胞体ストレスなどによる分解の可能性が示唆されている。

#### 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 1 件)

Hiroaki Okuyama, Takahiro Yoshida, Hiroko Endo, Masashi Nakayama, Norio Nonomura, Kazuo Nishimura and Masahiro Inoue. Involvement of Heregulin/HER3 in the Primary Culture of Human Urothelial Cancer. Journal of Urology. 査読有り、Vol 190, 2013, 302-310.

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

奥山 裕照 (OKUYAMA, Hiroaki)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター(研究所)・研究所・総括研究員

研究者番号: 50432373

##### (2) 研究分担者

井上 正宏 (INOUE, Masahiro)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪

府立成人病センター（研究所）・研究所・  
部長  
研究者番号： 10342990

(3)なし