

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 14 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590472

研究課題名(和文) ゴルジ・小胞体ストレス応答によりもたらされる癌幹細胞自己複製機構の解明

研究課題名(英文) Golgi-ER-stress response and self-renewal of cancer stem cells - its molecular mechanism

研究代表者

大森 泰文 (OMORI, YASUFUMI)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90323138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：コネキシンと呼ばれるタンパク質は、通常、細胞膜に局在しているが、がん細胞においては、しばしばゴルジ体に貯留している。この量が増加するとゴルジ体におけるATF6タンパクの活性化が促進される。活性化したATF6は核内に移動し、転写因子として機能することで、特定のmRNA合成を行う。これらのmRNAには小胞体ストレスの回避に寄与するGRP78のmRNAがあり、これにより、癌幹細胞はストレスに対する耐性を得て、腫瘍の進展が促進されるのである。この分子機構を阻害することは、がんの制圧に寄与するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：While connexin protein is localized in the plasma membrane in normal cells, it often translocates into and excessively accumulates in Golgi apparatuses in cancer cells. A large amount of connexin protein in Golgi apparatuses enhances activation of ATF6 protein, followed by translocation of the active ATF6 into the nucleus. Eventually, the active ATF6 functions as a transcription factor for the mRNA of GRP78 protein, which helps cancer stem cells to overcome pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress. These sequential molecular events contribute to cancer progression and may thus become a new target for cancer control.

研究分野：実験病理学

キーワード：コネキシン 癌幹細胞 小胞体ストレス ゴルジ体ストレス ATF6 がん進展

1. 研究開始当初の背景

(1) 肝細胞癌(HCC)においてはギャップ結合が消失し、ギャップ結合タンパク コネキシン 32 (Cx32) が細胞質内にその発現の場を移す。さらに、HCC が進展し悪性度が増すにつれ、Cx32 の細胞質内での発現量が増加する傾向が認められる[1]。HuH7 細胞や Li-7 細胞などの複数のヒト HCC 由来細胞株に Cx32 を過剰発現させたところ、Cx32 は細胞膜に局在することはなく、ゴルジ体への貯留を示した。おそらく HCC においては、何らかの原因で Cx32 の膜輸送が破綻し、輸送ルートの途上であるゴルジ体に留まっているものと考えられる[2, 3]。またこの際に、これら 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* で解析したところ、ゴルジ体に貯留する Cx32 の量が増すにつれ、細胞運動能が高まり、さらに SCID マウスの肝臓下に異種同所移植した際には肝内および腹膜転移巣が形成されたのである[3]。これらの結果より、ゴルジ体に局在する Cx32 が、ギャップ結合を介することなく HCC 由来細胞株に転移能を誘導できることが明らかとなった。

(2) ゴルジ体に貯留する Cx32 の意義を詳細に検討するために、HuH7 細胞を用いて、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 の過剰発現時に癌幹細胞(CSC)の画分にどのような変化が生じるかを解析した。Cx32 の過剰発現を誘導した際に、CSC 画分が約 10 倍に増加することが確かめられた[2]。さらに、CSC を分離し非接着無血清培地内で CSC の純粋培養を行ったところ、Cx32 の過剰発現を誘導した際には、より大型で多数の CSC sphere が形成された[2]。これは、ゴルジ体に貯留する Cx32 が CSC の自己複製を亢進することを示している。

(3) Tet-off Cx32 細胞に Cx32 の過剰発現を誘導した際に、小胞体ストレス応答タンパクで分子シャペロンとして知られる GRP78 (BiP と呼ばれる)の発現が有意に高まることを見出した。そこで、siRNA で GRP78 の発現を抑えた状態で Cx32 の過剰発現を誘導したところ、Cx32 による CSC 画分の増加が有意に抑制された。したがって、ゴルジ体に Cx32 が過剰に蓄積することにより、小胞体ストレス応答が惹起され、これが CSC の自己複製の亢進に必須の役割を果たしているものと思われる。

(4) 正常組織の幹細胞と同様に、CSC も癌組織内の niche に局在しているものと考えられている。niche は一般に低酸素下にあり、低酸素によるタンパクの misfolding が CSC に小胞体ストレスをもたらしている。GRP78 は小胞体ストレスに呼応して発現し、ストレ

スを回避して細胞の生存維持に寄与するので、小胞体ストレス応答は CSC にとって合目的的であり、実際、薬剤抵抗性の悪性腫瘍では GRP78 の発現が高まることが報告されている[4]。

(5) Cx32 はゴルジ体に貯留しているにも拘らず、小胞体ストレス応答が誘導されるという結果より、小胞体ストレス応答経路のうちゴルジ体を介するルートが Cx32 の作用点と思われる。そこで我々は、ATF6 がそのメディエーターであろうと予想するに至った。活性化型 ATF6 は小胞体ストレスの「transducer」と言われ、核内転写因子として機能し、そのターゲットには HSPA5 (GRP78 遺伝子)も含まれる。しかし、不活性化型 ATF6 は小胞体膜に局在し、ゴルジ体に移動後、2 種のプロテアーゼ(S1P と S2P)により断片化されることで活性化する。ゴルジ体に過剰に貯留する Cx32 が何らかの機構で ATF6 を活性化し、小胞体ストレス応答 (GRP78 の発現) を誘導することで、CSC の維持、即ち対称分裂の選択(自己複製亢進)に寄与しているものと考えている。

2. 研究の目的

ゴルジ体に貯留する Cx32 により ATF6 の活性化が誘導されることを確認し、この活性化が小胞体ストレス応答を誘導し、最終的に CSC の自己複製を亢進することを示す。また、ゴルジ体における Cx32 と ATF6 の相互作用を確認し、これが ATF6 の活性化に必須であることを示す。さらに、活性化型 ATF6 を過剰に発現し CSC 画分が増加した細胞が、SCID マウスにおいて高い造腫瘍能を有することを示すことで、Cx32 依存性ゴルジ 小胞体ストレス応答経路が HCC における CSC の制御に重要であることを証明する。

3. 研究の方法

(1) ヒト 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) を使用する[3]。また、対照として Tet-off mock 細胞を使用する。HuH7 も Li-7 もコネキシン 26 を発現せず、内因性の Cx32 のみを発現しているが、HCC 由来であるために Cx32 が細胞膜でギャップ結合を形成することはなく、ゴルジ体に局在している。*in vitro* 実験の際には、4 µg/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 5 倍まで過剰発現させることができる。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 mg/ml Dox を添加することで外来性 Cx32 の発現を完全に抑えることができ、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こ

とができる[3]。

(2) 本研究においては、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をもって、CSC とみなすこととする。HuH7 細胞や Li-7 細胞の SP が CSC としての条件を満たしていることは、すでに確認している[2]。細胞回収後に生細胞を Hoechst 33342 で染色し、セルソーター(FACS)で SP の割合を測定する。通常の単層培養条件では、CSC の大多数が non-CSC に成熟してしまい、CSC の自己複製能を評価できない。そこで、CSC の性質を維持した状態で培養するために、SP を FACS で分取し非接着性無血清培地内で培養する。この条件で CSC は sphere を形成するので、この sphere の数とサイズを計測することで、CSC の自己複製能を評価する。

(3) ATF6 は不活性化状態で小胞体に局在するが、ゴルジ体に移行すると、ゴルジ体にある2種のプロテアーゼ(S1PとS2P)により断片化される。プロセッシングを受ける前の不活性化型 ATF6 は約 90 kd であるが、プロセッシングを経た活性化型 ATF6 は約 50 kd の断片となる。したがって、ウェスタンブロットで 90 kd と 50 kd のバンドを比較することにより、ATF6 の活性化を評価する。Cx32 過剰発現に伴う CSC 自己複製亢進の分子機構に ATF6 が関与するかどうかを調べるために、ATF6 に対する siRNA を導入してノックダウンし、その影響を解析する。また、ATF6 を活性化するプロセッシング酵素 S1P を siRNA によりノックダウンし、ATF6 の活性化抑制の影響を調べる。

(4) 不活性化型 ATF6 は小胞体に局在し、ゴルジ体を経て核内に移行する。そこで、Cx32 の過剰発現を誘導した際の ATF6 の局在の変化を調べるために、細胞を経時的に免疫蛍光染色して蛍光顕微鏡で観察、Cx32 の過剰発現に伴う局在の変化を解析する。

(5) 活性化型 ATF6 は核内転写因子として、GRP78 などの小胞体ストレス応答タンパクの遺伝子を制御する。そこで、ATF6 活性の変化に伴う下流遺伝子の発現量の変化を定量的 RT-PCR で詳細に調べる。

(6) Cx32 と ATF6 がゴルジ体で複合体を形成していることを確認するために、Cx32 の過剰発現時に抗 Cx32 抗体を用いて免疫沈降を行い、ATF6 の共沈を検討する。

(7) HuH7 細胞や Li-7 細胞に、活性化型 ATF6 の cDNA をレトロウイルスベクターを用いて導入し、活性化型 ATF6 過剰発現株を作製する。これらの細胞における CSC の増減を、FACS で SP 画分を解析することで評価するとともに、SCID マウス皮下への異種移植により造腫瘍能を検討することで、ATF6 の CSC 制御への関与を明らかにする。

4. 研究成果

(1) Cx32 のゴルジ体内過剰貯留によるストレス応答の惹起：培養液から Dox を除くこ

とで外来性の Cx32 を過剰発現させることのできる HuH7 Tet-off Cx32 細胞を用いて、Cx32 のゴルジ体内過剰貯留を誘導したところ、小胞体ストレス応答タンパクの内、ストレス適応タンパクである GRP78 の発現が著増することを発見した。

(2) Cx32 のゴルジ体内過剰貯留がもたらす ATF6 活性化の発見：小胞体ストレス応答のシグナル伝達に關与する ATF6 は、不活性化状態で小胞体に局在するが、ゴルジ体に移行すると2種のプロテアーゼ(S1PとS2P)により断片化される。そこで、HuH7 Tet-off Cx32 細胞に Cx32 のゴルジ体内貯留を誘導したところ、ATF6 の活性化が亢進することが明らかとなった。

(3) Cx32 依存性癌幹細胞(CSC)自己複製における ATF6 活性化の関与：ATF6 の発現量もしくは活性化の抑制が、Cx32 依存性 CSC 自己複製にどのような影響をもたらされるかを調べるために、ATF6 や S1P プロテアーゼに対する siRNA を導入したところ、Cx32 依存性 CSC 自己複製亢進がみられなくなった。したがって、Cx32 のゴルジ体内貯留による ATF6 の活性化が CSC 自己複製に必要であることが明らかとなった。

(4) Cx32 のゴルジ体内貯留による ATF6 活性化に伴う下流遺伝子の発現解析：Cx32 のゴルジ体内貯留を誘導し ATF6 を活性化させた際に、転写因子 ATF6 により転写される下流遺伝子の発現量の変化を定量的 RT-PCR で調べた。GRP78 や Calnexin といった小胞体ストレスを解除する適応応答関連タンパクの mRNA が著明に増加したのに対し、GADD153 などの小胞体ストレス時にアポトーシスを誘導する破壊的応答関連タンパクの mRNA は変化がなかった。また、これらの mRNA の発現変化は ATF6 に対する siRNA を導入すると認められなくなったことから、ATF6 の活性化は適応応答を惹起することが明らかとなった。

(5) Cx32 と ATF6 との複合体形成の検討：Cx32 と ATF6 がゴルジ体で複合体を形成していることを確認するために、Cx32 の過剰発現時に抗 Cx32 抗体を用いて免疫沈降を行い、ATF6 の共沈を検討したが、Cx32 と ATF6 の直接的な複合体形成は確認できなかった。

(6) 活性化型 ATF6 過剰発現細胞の作製と CSC 数の変化および造腫瘍能の検討：HuH7 細胞に、活性化型 ATF6 の cDNA をレトロウイルスベクターを用いて導入し、活性化型 ATF6 過剰発現株を作製した。これらの細胞株の SP 画分を FACS で解析し CSC の増減を調べたところ、ATF6 過剰発現株では SP が増加していた。したがって、ATF6 は CSC の自己複製を亢進することが分かった。また、SCID マウス皮下への異種移植により造腫瘍能を検討したところ、ATF6 過剰発現株はより高い造腫瘍能を示した。

<引用文献>

[1] Omori Y, et al. J. Membr. Biol.

218:73-77, 2007.

[2] Kawasaki Y, Omori Y, *et al.* Int. J. Cancer 128:51-62, 2011.

[3] Li Q, Omori Y, *et al.* Int. J. Cancer 121:536-546, 2007.

[4] Tanimoto R, *et al.* Int. J. Cancer 126:1562-1569, 2010.

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18件)

Iikawa N, Yamamoto Y, Kawasaki Y, Yoshioka T, Nishijima A, Enomoto K, Ishikawa K, Omori Y, (2015) Intra-Golgi connexin26 behaves in a pro-oncogenic manner in head and neck cancer cells. Akita J. Med. 査読有(印刷中)

飯川延子, 大森泰文, 本田耕平, 榎本克彦, 石川和夫, (2015) 舌癌細胞の悪性度を規定する Connexin26 の細胞内局在. 耳鼻咽喉科ニューロサイエンス. 29 巻 査読無(印刷中)

Togashi K, Kumagai J, Sato E, Shirasawa H, Shimoda Y, Makino K, Sato W, Kumazawa Y, Omori Y, Terada, Y. (2015) Dysfunction in gap junction intercellular communication induces aberrant behavior of the inner cell mass and frequent collapses of expanded blastocysts in mouse embryos. J. Assist. Reprod. Genet. vol.32 査読有(印刷中)

DOI:10.1007/s10815-015-0479-1

大森泰文, (2014) ギャップ結合の破綻と癌幹細胞の自己複製亢進 その病理学的意義. 秋田医学 41:63-69. 査読無

Jonson L, Christiansen J, Hansen TV, Vikesa J, Yamamoto Y, Nielsen FC. (2014) IMP3 RNP safe houses prevent miRNA-directed HMGA2 mRNA decay in cancer and development. Cell Rep. 7:539-551. 査読有

DOI:10.1016/j.celrep.2014.03.015

Chen M, Zhang Y, Yu VC, Chong YS, Yoshioka T, Ge R. (2014) Isthmin targets Cell-surface GRP78 and triggers apoptosis via induction of mitochondrial dysfunction. Cell Death Differ. 21:797-810. 査読有

DOI:10.1038/cdd.2014.3

Yoshioka T, Otero J, Chen Y, Kim YM, Koutcher JA, Satagopan J, Reuter V, Carver B, de Stanchina E, Enomoto K, Greenberg NM, Scardino PT, Scher HI, Sawyers CL, Giaccotti FG. (2013) 4

integrin signaling induces expansion of prostate tumor progenitors. J. Clin. Invest. 123:682-699. 査読有
DOI:10.1172/JCI.160720

Nishikawa Y, Sone M, Nagahama Y, Kumagai E, Doi Y, Omori Y, Yoshioka T, Tokairin T, Yoshida M, Yamamoto Y, Ito A, Sugiyama T, Enomoto K. (2013) Tumor necrosis factor- promotes bile ductular transdifferentiation of mature rat hepatocytes *in vitro*. J. Cell. Biochem. 114:831-843. 査読有
DOI:10.1002/jcb.24424

榎本克彦, 山本洋平, 鈴木麻弥, 吉岡年明, 大森泰文, 曾根正行, 西川祐司, (2013) 肝前駆細胞由来胆管上皮と肝外胆管前駆細胞由来胆管上皮の胆道系での接点. 肝胆膵 66:613-621. 査読無

Fykerud TA, Kjenseth A, Schink KO, Sirnes S, Bruun J, Omori Y, Brech A, Rivedal E, Leithe E. (2012) Smad ubiquitination regulatory factor-2 controls gap junction intercellular communication by modulating endocytosis and degradation of connexin43. J. Cell Sci. 125:3966-3976. 査読有

DOI:10.1242/jcs.093500

Kjenseth A, Fykerud TA, Sirnes S, Bruun J, Yohannes Z, Kolberg M, Omori Y, Rivedal E, Leithe E. (2012) The gap junction channel protein connexin 43 is covalently modified and regulated by SUMOylation. J. Biol. Chem. 287:15851-15861. 査読有

DOI:10.1074/jbc.M111.281832

Sone M, Nishikawa Y, Nagahama Y, Kumagai E, Doi Y, Omori Y, Yoshioka T, Tokairin T, Yoshida M, Sugiyama T, Enomoto K. (2012) Recovery of mature hepatocytic phenotype following bile ductular transdifferentiation of rat hepatocytes *in vitro*. Am. J. Pathol. 181:2094-2104. 査読有

DOI:10.1016/j.ajpath.2012.08.034

榎本克彦, 山本洋平, 吉岡年明, 大森泰文, 西川祐司, (2012) 肝再生と類洞内皮細胞. 生化学 84:642-648. 査読無

[学会発表](計28件)

Yoshioka T, Yamamoto Y, Nanjo H, Omori Y. B4 integrin promotes tumorigenesis of human prostate cancer by amplifying ErbB2 and c-Met signaling, 第73回日本癌学会学術総会, 2014年9月26日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
Aboshanif M, Kawasaki Y, Ishikawa K, Omori Y. Prognostic role of Reg 1, 第73回日本癌学会学術総会, 2014年9月27日, パシフィコ横浜(神奈川県・

横浜市)

飯川延子、大森泰文、他．舌癌細胞の悪性度を規定する Connexin26 の細胞内局在，第 32 回耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会，2014 年 8 月 29 日，ホテルグランヴィア大阪（大阪府・大阪市）

大森泰文．ストレス応答がもたらす癌幹細胞の自己複製亢進，秋田県泌尿器科集談会，2013 年 12 月 14 日，秋田キャッスルホテル（秋田県・秋田市）

Yoshioka T, Yamamoto Y, Nanjo H, Goto A, Enomoto K, Omori Y. A role of Integrin B4 in the prostate cancer progenitors, 第 72 回日本癌学会学術総会，2013 年 10 月 3 日，パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

Omori Y, Yoshioka T, Yamamoto Y, 他．Intra-Golgi Cx32-induced expansion of cancer stem cells - Involvement of the adaptive response pathway to ER stress, International Gap Junction Conference 2013, 2013 年 7 月 16 日，Charleston(米国)

吉岡年明，山本洋平，大森泰文，榎本克彦．インテグリン 4 シグナリングは前立腺癌幹細胞の拡大を促進する，第 22 回日本がん転移学会学術集会・総会，2013 年 7 月 11 日，ホテルブエナビスタ（長野県・松本市）

大森泰文，吉岡年明，山本洋平，榎本克彦．ゴルジ体に局在するコネキシン 32 により活性化する小胞体ストレス防護的応答の癌幹細胞における役割，第 102 回日本病理学会総会，2013 年 6 月 8 日，ロイトン札幌（北海道・札幌市）

吉岡年明，山本洋平，大森泰文，南條博，後藤明輝，榎本克彦．インテグリン 4 による ErbB2 や c-Met シグナリングの増幅は、前立腺癌細胞の腫瘍発生を促進する，第 102 回日本病理学会総会 2013 年 6 月 8 日，ロイトン札幌（北海道・札幌市）

山本洋平，榎本克彦，大森泰文，吉岡年明．ヒト胆嚢癌株化細胞が分泌する exosome に含まれる microRNA の解析，第 102 回日本病理学会総会，2013 年 6 月 8 日，ロイトン札幌（北海道・札幌市）

飯川延子，大森泰文，本田耕平，榎本克彦，石川和夫．頭頸部癌細胞における connexin26 の局在の変化の影響，第 114 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会，2013 年 5 月 16 日，ロイトン札幌（北海道・札幌市）

Yamamoto Y, Omori Y, Yoshioka T, Enomoto K. Characterization of microRNAs in exosomes derived from human gallbladder carcinoma cell lines, 第 71 回日本癌学会総会，2012 年 9 月 21 日，ロイトン札幌（北海道・札幌市）

Yoshioka T, Nishikawa Y, Yamamoto Y, Omori Y, Nanjo H, Enomoto K. Study of expression of heregulin in the human liver metastasis, 第 71 回日本癌学会総会，2012 年 9 月 21 日，ロイトン札幌（北海道・札幌市）

Omori Y. Recto-verso of connexin in cancer development and progression, 第 71 回日本癌学会総会，2012 年 9 月 19 日，ロイトン札幌（北海道・札幌市）

吉岡年明，西川祐司，山本洋平，大森泰文，南條博，榎本克彦．ラット傷害肝および部分肝切除における肝細胞での heregulin 発現の検討，第 101 回日本病理学会総会，2012 年 4 月 27 日，京王プラザホテル（東京都）

大森泰文，吉岡年明，山本洋平，榎本克彦．コネキシン 32 のゴルジ体内貯留による癌幹細胞自己複製亢進はゴルジ-小胞体ストレス応答経路を介する，第 101 回日本病理学会総会，2012 年 4 月 27 日，京王プラザホテル（東京都）

〔図書〕(計 2 件)

榎本克彦，山本洋平．中外医学社，図説分子病態学 改訂第 5 版，2014，408 ページ(147-151)

Omori Y, Kawasaki Y, Li Q, Yoshioka T, Yamamoto Y, Enomoto K. InTech, Hepatocellular Carcinoma - Basic Research, 2012, 402 ページ(235-252)

〔その他〕

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

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・教授

研究者番号：90323138

(2) 研究分担者

吉岡 年明 (YOSHIOKA, Toshiaki)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号：80302264

山本 洋平 (YAMAMOTO, Yohei)

秋田大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70400512