

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590496

研究課題名(和文)腫瘍スフェア化による幹細胞関連分子CD133の発現誘導と治療抵抗性獲得の分子機構

研究課題名(英文)Molecular mechanisms behind the acquisition of multi-drug resistance in sphere-formed colon cancer cells.

研究代表者

下里 修(Shimozato, Osamu)

千葉県がんセンター(研究所)・研究所・発がん研究グループ・上席研究員

研究者番号：30344063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年の研究から、様々な臓器に由来する悪性腫瘍において「癌幹細胞」と呼ばれる細胞亜集団が存在し、発がんや治療抵抗性への関与が強く示唆されている。本研究では、癌性幹細胞のモデルである浮遊性細胞塊(スフェア)を大腸がん由来細胞から誘導し、当該細胞が抗がん剤耐性を獲得する分子機構の解明を試みた。ヒト大腸がん由来スフェア細胞は、イリノテカンや5-フルオロウラシルなどの薬剤に対して耐性を示した。この機構として、ABCB1の発現誘導が主要な要因であることが判明した。この発現誘導にはエピジェネティック的な制御機構が寄与しており、その一部としてヒストン脱メチル化酵素JHDM1Bの関与が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Multi-drug resistance (MDR) has been considered to be one of the major courses of cancer recurrence after treatment. Recent studies demonstrated that a small population of cancer cells, termed cancer stem cells (CSCs), is involved in tumorigenesis and MDR. We therefore sought to examine the molecular mechanism(s) behind the acquisition of drug resistant property of colon cancer-derived sphere cells where CSCs accumulate. Under our experimental conditions, sphere-formed cells clearly exhibited MDR mediated by a drug efflux protein ABCB1. Intriguingly, ABCB1 expression was epigenetically repressed by a histone demethylase, JHDM1B, which was down-regulated in sphere-formed cells. Furthermore, a lower expression level of JHDM1B as well as a higher expression level of ABCB1 was closely associated with poor prognosis of colon cancer patients treated with adjuvant chemotherapy. Together, our observations strongly suggest that JHDM1B plays a central role in the regulation of MDR in colon CSCs.

研究分野：分子生物学・細胞生物学・腫瘍生物学

キーワード：大腸がん 癌性幹細胞 スフェア形成 治療抵抗性 CD133

1. 研究開始当初の背景

がんの発生およびその難治性を説明する仮説として「癌性幹細胞」の存在が提唱されて以来、当該細胞に関する基礎研究が重点的に実施されている。この中で、神経幹細胞などに見られる浮遊性の細胞塊（スフェア）形成は、癌性幹細胞の特徴の一つとして挙げられるが、スフェア形成およびそれによる治療抵抗性の獲得に関わる分子機構の詳細はほとんど明らかにされていない。

多くの腫瘍で、CD133 は癌性幹細胞マーカーの有力な候補として考えられているが、腫瘍におけるその機能は不明な点が多く残されている。申請者らは、大腸がんにおいて CD133 が腫瘍形成促進能を有することを報告した (Shimozato *et al.*, *Oncogene* 2015)。さらに申請者らは、神経芽腫細胞において、がん細胞のスフェア化は CD133 発現を誘導し、一方でレチノイン酸による神経芽腫細胞の分化誘導に伴って CD133 発現レベルが低下することを報告した (Takenobu *et al.*, *Oncogene* 2011)。

ところで、様々な腫瘍細胞において、CD133 遺伝子のプロモーター領域は DNA メチル化によって抑制されることが知られている。このことから、腫瘍細胞のスフェア化は遺伝子のエピジェネティックな発現制御に影響し、その結果、CD133 遺伝子の発現誘導が惹起された可能性が示唆された。

2. 研究の目的

ヒト大腸がん由来の初代培養細胞および培養細胞株を用いて、腫瘍細胞のスフェア形成に伴う CD133 遺伝子のエピジェネティックな発現制御機構、およびスフェア化した腫瘍細胞の治療抵抗性獲得の分子機構における癌性幹細胞マーカー CD133 の役割を検討する。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

培養細胞株

ヒト大腸がん由来細胞株 (SW480、LoVo、HT-29、HCT-116、Caco-2、COLO320) はダルベッコ改良イーグル培養液 (DMEM) に添加物 (10% 仔牛血清ならびに抗生物質) を加えた培養液中で培養した (以後、接着細胞と呼ぶ)。一方、スフェア細胞は、DMEM/Ham's F-12 培養液に添加物 (B-27 サプリメント、上皮細胞成長因子、ならびに線維芽細胞成長因子 2) を添加したスフェア培養液 (SFM) で培養した。

初代培養

千葉県がんセンター病院消化器外科において、インフォームドコンセントの得られた患者から手術によって切除された大腸がん組織を得た。これをコラゲナーゼなどによって消化し初代細胞を単離した。これを SFM 中で

培養した。なお、臨床検体の使用については千葉県がんセンター内に設置された倫理審査委員会で審議を受け、その実施が承認されている。

(2) 抗がん剤感受性試験

接着細胞およびスフェア細胞を 96 穴培養プレートに播いた後、抗がん剤 (5-FU、イリノテカン、) を添加した。細胞の生存率は比色分析 (Cell Counting kit-8, Dojindo) によって評価した。

(3) 遺伝子発現解析

各細胞から mRNA を抽出し、逆転写産物を作製した (Superscript III, Invitrogen) 定法にしたがって、半定量 RT-PCR 法およびリアルタイム RT-PCR 法によって、当該遺伝子の発現量を定量した。マイクロアレイデータの解析については R2 プラットホーム (<http://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi?&species=hs>) を利用した。

(4) クロマチン免疫沈降

発現している遺伝子のクロマチン修飾を検討するために、クロマチン免疫沈降実験を実施した。具体的には、ヒストンタンパク質が結合しているゲノム DNA を腫瘍細胞から抽出し、抗ヒストンタンパク質抗体によって免疫沈降した。得られたクロマチン複合体中に含まれる当該遺伝子の上流部分を PCR 法で増幅し、アガロースゲル電気泳動で可視化、あるいはリアルタイム RT-PCR (qRT-PCR) 法で定量した。

(5) タンパク質解析

各細胞を Lysis Buffer で溶解した。得られたサンプルを SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて分子量に応じて展開し、PVDF 膜に転写した。定法にしたがって、各種抗体によって当該タンパク質を検出した。

(6) セルソーティング

大腸がん組織から得られた細胞の、EpCAM、CD44、ならびに ABCB1 の発現レベルをフローサイトメーターで解析した。その後 EpCAM と CD44 を高発現する細胞分画から、ABCB1 発現レベルの高い集団と低い集団をそれぞれ分離精製した。両者から RNA を抽出し、前述の qRT-PCR 法で遺伝子の発現量を解析した。

4. 研究成果

(1) 大腸がん細胞由来スフェアは、エピジェネティックな制御による ABCB1 遺伝子の発現誘導によって薬剤耐性を獲得する

大腸がん細胞のスフェア化は薬剤耐性を賦与する

多くの腫瘍細胞株で報告されているスフェア化を確認するために、ヒト大腸がん由来培養細胞株 (SW480、LoVo、HT-29、HCT-116、

Caco-2、COL0320) を SFM で培養した。その結果、SW480、LoVo、HT-29 および HCT-116 細胞でスフェア化が観察された。次に、スフェア細胞が抗がん剤に対する抵抗性を高めるか否かを検討した。SW480、LoVo、HT-29 および HCT-116 細胞から誘導したスフェア細胞と接着細胞を様々な濃度の抗がん剤[5-フルオロウラシル(5-FU)、イリノテカン(CPT-11)、ビンクリスチン(VCR)]に暴露し、48時間後の細胞生存率を検討した。その結果、すべての細胞株について、接着細胞では濃度依存的な抗がん剤による殺細胞効果が認められたのに対し、スフェア細胞ではその感受性が低下することが検出された。したがって、スフェア細胞は抗がん剤耐性を獲得したことが示唆された。

多くの抗がん剤は増殖期の細胞に対して高い殺細胞効果を発揮することが知られている。そこで、これらのスフェア細胞の増殖能を調べた。その結果、HT-29 および HCT-116 細胞由来のスフェア細胞では、CDKインヒビター(p21^{CIP1/WAF1} および p27^{KIP1})の発現誘導によって細胞周期が G1 期で停止することで、増殖速度が低下していた。したがって、その結果として抗がん剤に対する抵抗性が増強した可能性が示唆された。一方、SW480 および LoVo 細胞由来のスフェア細胞は接着細胞と同様に増殖した。すなわち、細胞増殖に依存しない薬剤耐性を獲得した可能性が考えられた。

今回検討した抗がん剤の中で、CPT-11 と VCR は ABC トランスポーターによって細胞外に排出されることが報告されている。そこで、SW480 と LoVo 細胞由来のスフェア細胞において、がん細胞の薬剤耐性に深く関与することが知られている ABC トランスポーター(ABC B1、ABC G2、ABC C1)の発現量を検討した。まず、ABC B1 遺伝子は、SW480 および LoVo 細胞の接着細胞においても発現が検出されたが、スフェア化によって発現増強が認められた。続いて、ABC G2 遺伝子は LoVo 細胞で発現上昇が見られた。なお、SW480 細胞は元々 ABC G2 遺伝子を発現していなかった。最後に、ABC C1 遺伝子は、SW480 および LoVo 細胞の接着細胞においても発現が検出されたが、両者をスフェア化しても発現増強が認められなかった。

次に、SW480 および LoVo 細胞由来のスフェア細胞を用いて、ABC B1 阻害剤であるペラパミルの存在下での薬剤抵抗性を検討した。その結果、ペラパミルの添加によって、スフェア細胞の薬剤感受性は接着細胞のそれと同程度にまで増強された。したがって、SW480 および LoVo 細胞では、ABC B1 遺伝子の発現増強が薬剤抵抗性の主要因であることが示された。そこで、次のがん細胞のスフェア化による ABC B1 遺伝子の発現増強の分子機構を解析した。

ABC B1 遺伝子のエピゲノムの発現制御

最近、ヒストン修飾によるエピゲノムの制御が注目されている。その中で、ヒストン H3 の 4 番目のリジンについては、3 重メチル化修飾(H3K4me3)のレベルが転写活性化とリンクすることが知られている。トライソラックグループの MLL は、当該プロモーター領域周辺のクロマチンの H3K4me3 レベルを引き上げることによって、ABC B1 遺伝子の発現増強を引き起こすことが報告されている。そこで、H3K4me3 修飾に関するヒストンメチル化酵素、およびヒストン脱メチル化酵素の発現量を接着細胞とスフェア細胞の間で比較検討した。その結果、ヒストン脱メチル化酵素である JHDM1B と JARID1A の転写レベルでの発現低下が認められた。

そこで、両者が ABC B1 プロモーター領域に結合しているか否かを検討した。その結果、両者は当該ゲノム領域に結合することが示されたが、結合する度合いは JARID1A よりも JHDM1B が高かった。この結果を裏付けるように、siRNA による JHDM1B 遺伝子のノックダウンは ABC B1 遺伝子の発現量を上昇させたが、対照的に JARID1A 遺伝子のノックダウンは ABC B1 遺伝子の発現レベルに影響を与えなかった。

次に、JHDM1B が実際に ABC B1 遺伝子プロモーター周辺のクロマチンの H3K4me3 修飾レベルを制御しているか否かを検討した。siRNA による JHDM1B 遺伝子のノックダウンは、予想されたように当該領域の H3K4me3 修飾レベルを上昇させた。さらに、JHDM1B の過剰発現細胞株はスフェア化に伴う ABC B1 の発現誘導を抑制した。これに伴って、JHDM1B 過剰発現細胞由来のスフェアでは、CPT-11 によって促進される細胞死への感受性が上昇した。以上の結果から、大腸がん細胞由来スフェアでは、JHDM1B の発現低下を介したエピゲノム的な発現制御によって、ABC B1 依存的な薬剤耐性を獲得することが明らかになった。

大腸がん初代細胞由来のスフェア細胞は ABC B1 発現量を上昇させる
培養細胞株を用いて検討してきたスフェア細胞における ABC B1 の発現上昇が、ヒト大腸がん初代細胞でも検出されるかを検討した。大腸がん組織から得られた初代細胞を SFM で培養したところ、スフェアが形成された。そこで、採取直後の大腸がん組織と、3 日間 SFM で培養したスフェア細胞の全 RNA を抽出し、ABC B1 遺伝子の発現量を比較検討した。その結果、大腸がん初代細胞由来のスフェア細胞においても、ABC B1 遺伝子の発現量は統計学的有意差をもって増強した。興味深いことに、JHDM1B 遺伝子の発現量はスフェア形成に伴って減少した。さらに、セルソーティングによって ABC B1 の発現レベルを指標にして大腸がん組織由来初代細胞を 2 群に分割して、両者の JHDM1B 遺伝子の発現量を比較した。その結果、ABC B1 発現量の高い腫瘍細胞群では JHDM1B 遺伝子の発現量が低く、ABC B1 遺伝子

の発現量が低い細胞集団では、反対に *JHDM1B* 遺伝子の発現量が高いことが判明した。さらに、既に公表されている大腸がん組織における遺伝子発現のマイクロアレイによる網羅的解析の結果 (GSE4107) によって、*JHDM1B* 遺伝子の発現量と *ABCB1* 遺伝子の発現量には負の相関が存在することを見いだした。

最後に、*JHDM1B* 遺伝子の発現が大腸がん患者の予後に与える影響を、既に公表されている大腸がん患者検体のマイクロアレイのデータ (GSE39582) を活用して検討した。さらに、アジュバント療法を受けた大腸がん患者の中で、*JHDM1B* 遺伝子の発現量が低い患者群の無再発生存期間は、*JHDM1B* 遺伝子の高発現群と比較して有意に短かった。反対に、*ABCB1* 遺伝子の発現量が高い患者群の無再発生存期間は、*ABCB1* 遺伝子低発現群と比較して、有意に短かった。

まとめ

以上の研究成果から、ヒト大腸がん細胞のスフェア形成に伴う抗がん剤耐性に関与する遺伝子群のエピジェネティックな発現制御機構の一部が明らかにされた。この成果については現在投稿論文を作成しており、速やかに投稿し、発表していきたい。

(2) 腫瘍細胞のスフェア形成に伴う *CD133* 遺伝子のエピジェネティックな発現制御機構の解析

CD133 遺伝子はそのプロモーター領域の DNA メチル化によって、当該遺伝子発現が制御されることが知られている。そこで、5aza-deoxycytosine の存在下で DNA メチル化を抑制すると、元来 *CD133* を発現していないヒト大腸がん由来 SW480 細胞においても *CD133* 発現誘導が検出された。そこで、SW480 細胞を SFM で 6 日間培養したところ、スフェア形成に伴って、*CD133* 遺伝子の発現が促進されることを見いだした。したがって、スフェア化は大腸がん細胞内における DNA メチル化制御に影響を及ぼすことが示唆された。その分子機構については現在も検討を続けている。

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 4 件)

下里 修 (11 人中 2 番目)、Expression of a murine homolog of apoptosis-inducing human IL-24/MDA-7 in murine tumors fails to induce apoptosis or produce anti-tumor effects. *Cell Immunol.* 査読有、Vol. 275, 2012, 90-97. DOI: 10.1016/j.cellimm.2012.02.010.

上條岳彦 (6 人中 5 番目)、NLRR1

enhances EGF-mediated MYCN induction in neuroblastoma and accelerates tumor growth in vivo. *Cancer Res.* 査読有、Vol. 72, 2012, 4587-4596. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0943.

上條岳彦 (2 人中 1 番目)、Molecular and genetic bases of neuroblastoma. *Int J Clin Oncol.* 査読有、Vol. 17, 2012, 190-195. DOI: 10.1007/s10147-012-0415-7.

早田浩明 (12 人中 9 番目)、Totally laparoscopic pancreas-sparing duodenectomy. *Surg Today.* 査読有、Vol. 42, 2012, 1032-1035. DOI: 10.1007/s00595-012-0285-7.

[学会発表](計 6 件)

下里 修 (5 人中 2 番目)、早田浩明 (5 人中 3 番目)、ヒストン脱メチル化酵素 *JHDM1B* は大腸がんスフェア細胞の多剤耐性獲得を阻害する、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日~27 日、「パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)」

下里 修 (7 人中 2 番目)、早田浩明 (7 人中 3 番目)、上條岳彦 (7 人中 5 番目)、ヒストン脱メチル化酵素 *JHDM1B* は大腸がんスフェア細胞の *ABCB1* 依存的な薬剤耐性獲得を阻害する、第 73 回日本癌学会学術集会、2014 年 9 月 25 日~27 日、「パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)」

下里 修 (7 人中 2 番目)、早田浩明 (7 人中 4 番目)、上條岳彦 (7 人中 7 番目)、大腸がん由来 spheroid 細胞はエピゲノムの制御による *ABCB1* 遺伝子の発現上昇によって多剤耐性を獲得する、第 72 回日本癌学会学術集会、2013 年 10 月 3 日~5 日、「パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)」

下里 修 (7 人中 2 番目)、早田浩明 (7 人中 3 番目)、上條岳彦 (7 人中 7 番目)、膜結合型チロシン脱リン酸化酵素 PTPRK による脱リン酸化はがん幹細胞マーカー *CD133* の AKT/b-catenin 経路を介した発がん機構を負に制御する、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日~6 日、「神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)」

下里 修 (6 人中 3 番目)、上條岳彦 (6 人中 6 番目)、Functional p53 inactivation in neuroblastoma: novel 1p suppressor DMAP1 regulates MYCN/ATM/p53 pathway.、第 6 回国際 p63/p73 国際シンポジウム、2013 年 9 月 15 日~18 日、「かずさアカデミアパーク (千葉県・木更津市)」

下里 修 (6 人中 1 番目)、上條岳彦 (6 人中 6 番目)、Sphere formation produces

multi-drug resistance in human colon cancer cells via histone modification of ABCB1 promoter. 第 71 回日本癌学会学術集会、2012 年 9 月 18 日～21 日、「ロイトン札幌、札幌芸文館、札幌市教育文化会館（北海道・札幌市）」

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下里 修 (Shimozato Osamu)
千葉県がんセンター(研究所)・発がん研究グループ・上席研究員
研究者番号：30344063

(2) 研究分担者

上條 岳彦 (Kamijo Takehiko)
埼玉県立がんセンター(臨床腫瘍研究所)・臨床腫瘍研究所・所長
研究者番号：90262708

早田 浩明 (Souda Hiroaki)
千葉県がんセンター(研究所)・医療局・消化器外科・主任医長
研究者番号：90261940

(3) 連携研究者

なし

()

研究者番号：