

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659149

研究課題名(和文) ストレス応答に基づく癌細胞の多能性獲得と破綻の分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of cancer cell pluripotency responding to stress

研究代表者

金田 安史 (Kaneda, Yasufumi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10177537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においては、様々なストレスに暴露されることにより、癌細胞の一部が一過性に未分化状態になって多能性を獲得し、その中から各治療法に抵抗するための特有の遺伝子発現を誘導するのではないか、という仮説の実証を行った。抗癌剤Docetaxelを前立腺癌細胞株に作用させ、Docetaxel抵抗性株を分離し、スフェア形成能、soft agar上でのコロニー形成能に必要なシグナルを解析した。前立腺癌抗がん剤耐性株では、CXCR4/ERK1/2/c-mycのシグナルループが形成されることが明らかになった。Docetaxel抵抗性の臨床検体でも、CXCR4、p-ERK1/2、c-mycの高発現が確認された。

研究成果の概要(英文)：Despite an increasing prevalence of patients with docetaxel refractory prostate cancer, little is known about its tumour biology. In this study, we demonstrated that the tumourigenic potential was increased in the docetaxel-resistant residual prostate cancer cells compared with the parental prostate cancer cells. An enhanced tumourigenic potential was controlled by the CXCR4, ERK1/2 and c-Myc signalling loop activation. Furthermore, the constitutive CXCR4, ERK1/2 and c-Myc signalling activation was demonstrated in clinical cancerous tissue samples from human patients with docetaxel-resistant prostate cancer. These signalling pathways may become treatment targets for inhibiting aggressive residual tumour cells after chemotherapy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：癌幹細胞 抗がん剤耐性 前立腺がん 多能性維持因子 ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

癌治療における最大の課題は、再発の制御である。再発は、様々な治療に抵抗性の癌細胞集団が存在するからであり、そのような細胞が癌幹細胞と考えられるに至った。それらを同定するための表面抗原の探索が行われてきたが、何故、異なる治療法を与えても耐性細胞が出現するのか、という疑問が癌研究の大きな課題の1つである。

2. 研究の目的 癌細胞が抗癌剤耐性になるためのシグナル経路を解明する。

3. 研究の方法 抗癌剤の Docetaxel を前立腺癌細胞 DU145, PC3 に作用させ、Docetaxel 抵抗性の安定形質転換株 DRD, 1G7, PC3DR を分離した。これらの細胞株の細胞増殖能 (MTS assay) 免疫不全マウス(NOD/SCID) の皮内腫瘍の形成能を比較した。またスフェア形成能については、1000 個の細胞を low-attachment dish に巻き込み、血清なしの特殊培地 (上皮細胞用基礎培地に insulin, B27, EGF, basic FGF を添加) を用いて 14 日間培養し、コロニー数をカウントした。Docetaxel 感受性の DU145, PC3 に Docetaxel を投与し 24 時間後の遺伝子発現を microarray で網羅的に解析し、抗癌剤抵抗性の安定形質転換株の遺伝子発現と比較した。また抗癌剤抵抗性の細胞株の発現遺伝子を microarray で網羅的に解析し、感受性株と比較した。その中からストレスに暴露されたときに特異的に発現増強する遺伝子を探索し、その発現のシグナル経路を、シグナル経路の阻害剤や候補遺伝子の siRNA を用いて解析した。遺伝子発現は定量 PCR, Western blot によった。また CXCR4 の細胞表面の発現については FACSVerse を用いて解析した。癌組織の臨床検体の使用にあたっては、事前に大阪大学医学部附属病院の臨床研究倫理審査委員会での承認を受けている。

4. 研究成果 Docetaxel 抵抗性の癌細胞株 DRD, PC3DR は癌幹細胞の指標の1つであるスフェア形成能が高かった。抗癌剤耐性の DRD の細胞増殖能は親株の DU145 と同じであったが、免疫不全マウスに移植すると、DRD100 個を移植したときの腫瘍形成能は、DU145 細胞 1000 個を移植したときの腫瘍形成能と同等であり、マウスでの腫瘍形成能は約 10 倍高いことが分かった (図 1)。抗癌剤抵抗性の安定形質転換株 DRD に Docetaxel をかけたときの遺伝子発現を microarray で比較したところ、ES 細胞の多能性維持に必要な遺伝子の発現 Nanog, Sox2, Oct4 といった遺伝子が Docetaxel 投与により急速に増加し、その後次第に低下し、安定形質転換株の発現レベルまで減衰することがわかった。おそらく多能性維持因子が抗がん剤耐性になるエフェクター分子を発現させていて、そのエフェクター遺伝子が何かを明らかにすれば、そ

れが有効な治療標的になると考えられる。DRD, 1G7, PC3DR では ERK1/2 のリン酸化が亢進していることがわかった (図 2) ので、その阻害剤の PD98059 を作用させて、スフェア形成能を調べると、PD98059 の用量依存性に低下することが分かった。考えられる他のシグナル経路を調べた結果、p38 も活性化されることを見出した。P38 の阻害剤をかけたときの癌細胞のスフェア形成能は PD98059 で ERK を阻害した時よりも弱く、ERK1/2 がより強い関与を示すことが分かったので、以後、ERK の活性化を中心に調べることにした。ERK1/2 は c-myc をリン酸化して安定化させることが知られているので、DRD, 1G7, PC3DR の c-Myc 遺伝子発現を Western blot で調べると、それぞれの親株の DU145, PC3 よりも有意に増強していることが明らかになった。この c-Myc の発現は、PD98059 により減少した (図 3) ので、ERK の活性化によるものと推察された。しかし c-Myc の転写物を RT-PCR で調べると、抗癌剤抵抗性株とその親株との間では有意な差がなかったので、c-Myc 蛋白質の安定性の増強によると考えられた。抗癌剤抵抗性株において c-Myc を siRNA でノックダウンすると、スフェア形成能は著しく低下した (図 4) microarray のデータをもとに ERK の上流のシグナルを探索し、CXCR4 が抗癌剤抵抗性株で著明に発現増強していることを見出し、RT-PCR, Western blot, FACS 解析で確認した。DRD, 1D7, PC3DR のいずれにおいても発現増強が認められた。CXCR4 の siRNA を導入した DRD では ERK のリン酸化、c-Myc の発現が抑制された (図 5) スフェア形成能は有意に低下した。CXCR4 のリガンドの SDF-1 を作用させると、抗癌剤抵抗性株において ERK のリン酸化が亢進し、c-Myc の発現も増加したが、AMD3100 を作用させると抑制された (図 6) 抗癌剤抵抗性細胞 DRD, 1G7 の親株である DU145 細胞に Docetaxel をかけると用量依存性に CXCR4 発現が増強することが Western blot, RT-PCR で確認され、c-Myc の siRNA により Docetaxel で誘導される CXCR4 の転写が抑制されたが、ERK のリン酸化は影響を受けなかった (図 7) 以上のことから、抗癌剤を作用させた癌細胞では、CXCR4/ERK1/2/c-myc のシグナルループが形成されていることが明らかになった。抗癌剤耐性株では、腫瘍形成能力を表すスフェア形成能が亢進しており、それは CXCR4/ERK1/2/c-myc のシグナルループが形成されていることが普遍性の高い事実であると考えられる。

Docetaxel 抵抗性の臨床検体を用いて、CXCR4, p-ERK1/2, c-myc の発現を immunohistochemistry の手法で調べると、いずれも高発現していることが明らかになり (図 8) 臨床においても抗がん剤により、CXCR4/ERK1/2/c-myc のループができていることが推測された。

図 1 : NOD-SCID マウスの皮内に前立腺癌細胞 DU145, その Docetaxel 耐性株 DRD を 100 個、1000 個、10000 個それぞれ移植し腫瘍径を計測し、腫瘍容積を算出した。

図 2 : 抗癌剤耐性株とその親株での ERK のリン酸化

図 3 : DRD での ERKK リン酸化、c-Myc 発現に対する阻害剤 PD98059 の効果

図 4 : 抗癌剤耐性前立腺癌細胞株 DRD, 1G7, PC3DR に c-Myc siRNA を導入し、スフェア系性能を評価した。

図 5 : CXCR4 siRNA による ERK リン酸化、c-Myc 発現抑制

図 6 : ERK リン酸化、c-Myc 発現に及ぼす SDF-1, AND3100 の効果。

図 7 : Docetaxel による DU145 での c-Myc の発現、ERK リン酸化と c-MycsiRNA の効果。

図 8 : 抗癌剤抵抗性前立腺がんの臨床検体での CXCR4, 活性化 ERK, c-Myc の発現を免疫組織学的に検出した。

図 1

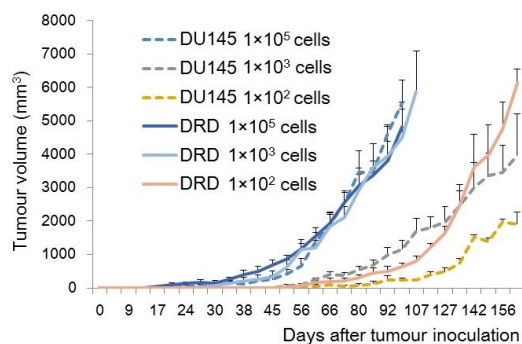


図 2

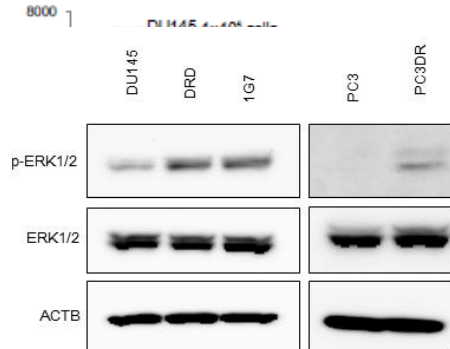


図 3

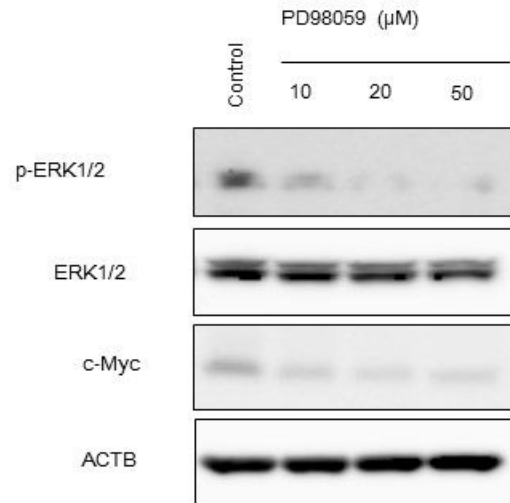


図 4

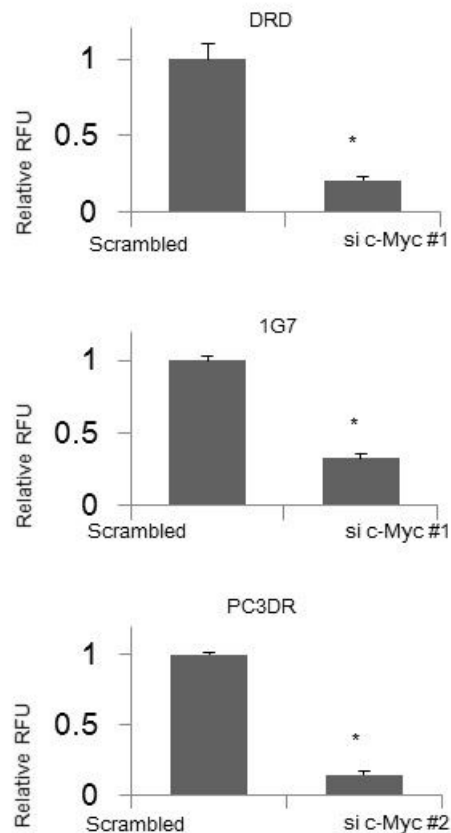


図 5

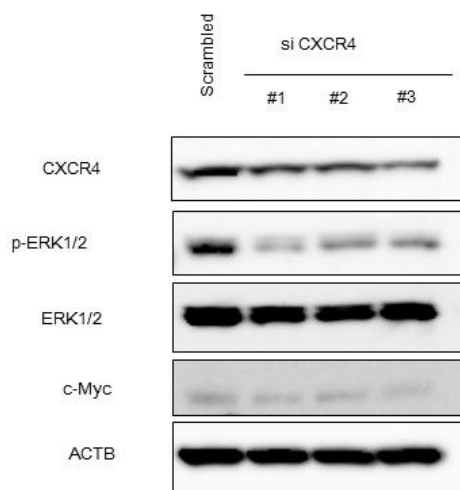


図 6

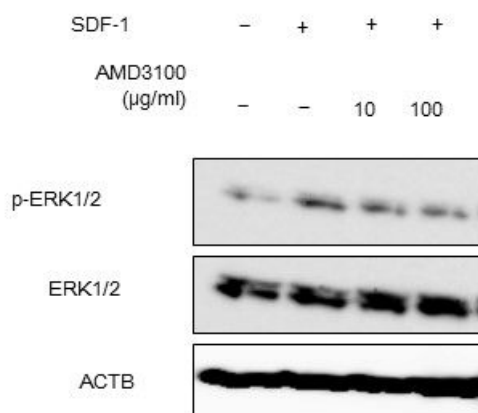


図 7

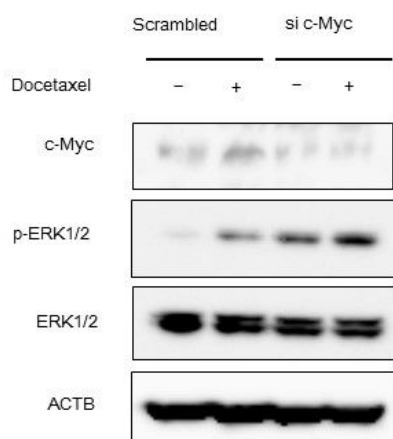
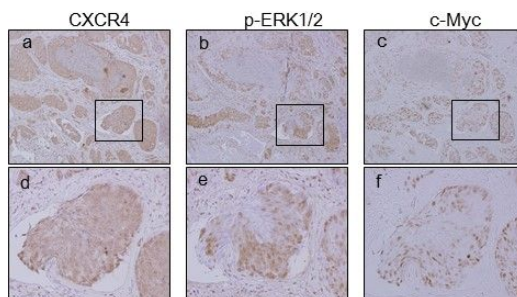


図 8



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)

- 1) Hatano, K., Yamaguchi, S., Nimura, K., Murakami, K., Nagahara, A., Fujita, K., Uemura, M., Nakai, Y., Tsuchiya, M., Nakayama, M., Nonomura, N., and Kaneda, Y. Residual prostate cancer cells after docetaxel therapy increase the tumorigenic potential via constitutive CXCR4, ERK1/2 and c-Myc signalling loop activation. *Mol. Cancer Res.*, 11:1088-100.2013.

Doi:10.1158/1541-7786.MCR-13-0029-T.

〔学会発表〕(計 2 件)

金田安史 Future direction of gene therapy. 第 18 回日本遺伝子治療学会 理事長講演 2012 年 6 月 28 日 (熊本)

金田安史 What will be needed for gene therapy in Japan? 第 19 回日本遺伝子治療学会 理事長講演 2013 年 7 月 4 日 (岡山)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学ホームページ:

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gts/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金田 安史 (Kaneda Yasufumi)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 10177537

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし