

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460955

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞依存性腫瘍増殖機構の解明

研究課題名(英文) Unraveling of mechanisms of mesenchymal stem cell-dependent tumor progression

研究代表者

苗代 康可 (Naishiro, Yasuka)

札幌医科大学・医療人育成センター・講師

研究者番号：80347161

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：MSC依存性腫瘍増殖機構は、CXCL12を介する血管新生とその他の機構に大別される。CXCL12発現は、多くの大腸癌細胞においてエピジェネティックに不活化されているが、MSC依存性血管新生が認められたCOLO 320細胞株では、CXCL12のプロモータが例外的に脱メチル化されていたにもかかわらず、AIDやTETはDNA脱メチル化酵素として作用しなかった。また、VEGFおよびCXCL12は単独ではMSCに対する依存性を説明し得なかった。一方、MSCは、ニッチシグナルを介してHT-29に間葉上皮転換を誘発し、その増殖を抑制した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify mechanisms of MSC-dependent tumor progression. Tumor growth progressed in two manners, either independent of or dependent on MSCs. COLO 320 xenograft angiogenesis was CXCL12 dependent but vascular endothelial growth factor (VEGF) less dependent, whereas HT-29 angiogenesis was not CXCL12 but VEGF dependent. MSCs differentiated into pericytes that enhanced angiogenesis as a perivascular niche, which was designated MSC-dependent angiogenesis. CXCL12 was epigenetically inactivated in most colorectal cancer cells except for COLO 320 cells, in which the promoter region was demethylated, but ten eleven translocation 1-3 (TET1-3)/activation-induced cytidine deaminase (AID) did not work as DNA demethylases. Either VEGF overexpression or CXCL12 knockdown was not sufficient for MSC-independent growth. In contrast, the MSC niche conferred an anti-proliferative property to HT-29 cells, through mesenchymal-epithelial transition.

研究分野：再生医療

キーワード：間葉系幹細胞 大腸癌細胞 ニッチ

1. 研究開始当初の背景

骨髄間葉系幹細胞 (Bone marrow-derived mesenchymal stem cell; 以下 MSC と略記) は多分化能を有し、強力な免疫調整作用を有するのみならず抗原性、毒性が低く、単離培養が容易であるため、iPS 細胞や ES 細胞と並び再生医療や遺伝子治療において、現在、最も魅力的な研究対象である MSC 移植は、細胞のソースとして血管、神経、心筋などを中心とした細胞移植治療に利用されるのみならず、その強力な免疫調整作用を利用した移植片対宿主病や自己免疫疾患への治療応用も試みられている。しかし、MSC は、再生医療や遺伝子治療の細胞源として期待される一方で、発がんに対するその作用は明らかではなく、Khakoo ら (J Exp Med 2006) や Karnoub ら (Nature 2007) による相反する報告さえある。大腸癌に対する作用として、MSC が癌関連線維芽細胞の前駆細胞である可能性が報告された (Henriksson, Am J Pathol 2011, Shinagawa, Int J Cancer 2010)。また、MSC が IL-6 を分泌して腫瘍イニシエーションを促進したり、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor; 以下 VEGF と略記) (Liu, JBC 2011) やプロスタグランジン E2 (Li, 2012 Cancer Discovery) を分泌したり、transmembrane neuregulin 1 (tNRG1) を分泌して腫瘍生存シグナルを活性化する (Tsai, 2011 Gastroenterol) ことなど、さまざまな報告がなされている。また、乳癌では、MSC が上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition; 以下 EMT と略記) (Martin et al, Breast Cancer Res Treat 2010) を介して転移を促進させることが報告されている。以上のように MSC の大腸癌増殖機序は未だ明らかではない。

そこで本研究は、MSC 依存性腫瘍増殖機構を詳細に解明することを行動目標とし、MSC 治療の臨床応用に備えることを一般目標とした。最近、申請者は、ある種のヒト大腸癌細胞株にラット MSC を混合し、マウス皮下に形成させた異種移植腫瘍において、VEGF 非依存性かつ MSC 依存性の血管新生 (いわば MSC-dependent angiogenesis; 以下 MSC-DA と略記) 機構の存在とその機序を一部明らかにした。すなわち、移植腫瘍の生着・増殖に MSC 依存性があること。MSC 依存性腫瘍において、MSC は血管周囲性ニッチへ生着し周皮細胞へ分化して、マウス血管内皮細胞の分化を誘導すること (MSC-DA)。その際、MSC-DA は、腫瘍 VEGF の発現と逆相関し、間質細胞由来因子 (CXCL12) 発現と正相関すること。DNA マイクロアレイによる移植腫瘍の発現遺伝子における網羅的解析から、MSC は、移植腫瘍の CXCL12 産生を強く促すこと。MSC-大腸癌細胞株共培養実験により、MSC は細胞接触を介して腫瘍の生存シグナル分子 Akt や p38 を活性化しアポトーシスを抑制

すること。CXCL12 発現は、多くの大腸癌細胞においてエピジェネティックに不活性化されているが、MSC-DA が認められた COLO320 細胞株では、DNMT1、DNMT3A、3B の発現は亢進しているにもかかわらず、CXCL12 のプロモータが例外的に脱メチル化されており、何らかの機序でエピジェネティックな不活性化を回避していること。COLO320 細胞は、DNA 脱メチル化酵素として有力な activation-induced cytidine deaminase (AID) や ten eleven translocation 1-3 (TET1-3) (Nat Rev Mol Cell Biol 2010) を選択的に発現することをそれぞれ明らかにした。CXCL12 を抑制しても腫瘍内の MSC 生着や腫瘍増殖を完全に抑制することは不可能であった。以上を要約すると、MSC は、移植初期には腫瘍の生存シグナルを活性化してその生着を助け、移植後期には、MSC-DA を介して腫瘍の増殖を促進した。しかし、移植腫瘍における AID 突然変異原性などをはじめとした、MSC-DA 以外の MSC 依存性腫瘍増殖機構の存在が示唆された。

2. 研究の目的

本研究は、MSC 依存性腫瘍増殖機構を広く詳細に解明することを行動目標としている。具体的な目標は、以下の 3 点である。

まず、MSC-DA 機構において活性化している CXCL12 における DNA 脱メチル化酵素の同定とそれらの in vivo 異種移植腫瘍形成における意義を検討する。そのために TET1-3/AID 遺伝子のノックダウン (knock down; 以下 KD と略記) 大腸癌細胞株を用いた CXCL12 プロモータの CpG アイランドのメチル化状態の定量解析とこれらの KD 株を用いた in vivo 異種移植腫瘍形成実験を予定している。次に、MSC-DA 機構以外の MSC 依存性の腫瘍増殖機構の一つと考えられる、異種移植腫瘍における AID 突然変異原性試験を予定している。最後に、全身および腫瘍局所の CXCL12 抑制下においてなお腫瘍内に生着する MSC 由来細胞の役割の詳細 (化学走性、分化・細胞運命の決定) とそれを標的とした in vivo 治療実験を行うことにより、MSC-DA 機構以外の MSC 依存性の腫瘍増殖機構を詳細に解明する予定である。

3. 研究の方法

DNA 脱メチル化酵素としての TET1-3/AID。

TET1-3/AID 遺伝子の KD 大腸癌細胞株を用いた CXCL12 プロモータ CpG アイランドのメチル化状態の定量解析を行う。予備的検討として、AID 強制発現系および KD 系の安定株をそれぞれ樹立した。bisulfite pyrosequencing 法によりメチル化レベルを定量した。AID 強制発現 8 株のうち 2 株にメチル化レベルの低下を認め、AID KD 18 株のうち 1 株のみに異常メチル化の亢進が認められた。AID の発現レベルと CXCL12 メチル

化レベル間に恒常的な逆相関が証明されず，CXCL12 プロモータにおいて AID 単独では DNA 脱メチル化酵素としての働きは否定的であった．したがって本研究では，TET 遺伝子と AID ダブルノックダウン (DKD) が脱メチル化に参与する可能性が高く，CXCL12 以外の遺伝子が標的となっている可能性やゲノムワイドの DNA 脱メチル化などについて詳細に検討する．

1) TET1-3 KD/TET&AID DKD COLO 320 株の樹立

TET1-3 に関しては，まず，おのおの単独の合成 siRNA による一過性の KD を試み，その効果を 48-72 時間後に確認する．次に単独あるいは組み合わせによる DKD・トリプル KD (TKD) に挑戦し，メチル化レベルの定量的解析を行い，TET1-3 が CXCL12 プロモータにおける DNA 脱メチル化酵素として作用するか否かを確認する．また，そのうち最も有効であった組み合わせを用いて TET KD 安定株を樹立する．それを AID KD と組み合わせた DKD 株を樹立する．CXCL12 以外の脱メチル化の標的遺伝子に関しては，必要であれば Infinium Methylation Array (Illumina) などにより，網羅的に検索する．また，LINE-1，Alu，satellite- α などの繰り返しゲノム配列を用いたゲノムワイドの脱メチル化状態についても検討し，この系の発癌におけるその役割を検討する．

異種移植腫瘍における AID の突然変異原性

申請者はこれまでに予備的検討として，AID を高発現する COLO 320 株の異種移植腫瘍で AID 発現が約 3 倍亢進し，MSC 共移植腫瘍では，約 20 倍に亢進すること，さらに，AID の標的遺伝子候補として (Matsumoto, Nat Med 2007) AID, Myc, TP53, APC, CTNNB1, K-ras, CCND1, CCNE1, INK4A/p16, X-IAP および C-IAP の核酸シーケンスを COLO 320 野生株においてすでに施行した．本研究では，これらの結果をもとに，MSC 共移植腫瘍における遺伝子変異を比較検討して，AID の異種移植腫瘍における変異原性と腫瘍増殖の関連を検討し，AID がこのモデルにおいて，DNA 脱メチル化酵素としてのみならず mutator として作用するか否か明らかにする．さらに，AID の治療標的として可能性に関しても，すでに作成済みである AID KD 株を用いた in vivo 治療実験を行い詳細に評価する．

MSC-DA 以外の MSC 依存性腫瘍増殖機構の解明とそれを標的とした in vivo 治療実験

本研究では，腫瘍 CXCL12/CXCR4 axis を選択的に抑制した CXCL12 KD COLO 320 細胞株による異種腫瘍モデルを作成して，腫瘍の増殖や共移植された MSC の動態 (化学走性，分化・細胞運命の決定) を評価し，CXCL12/CXCR4 axis 以外の機序に基づく

MSC 依存性腫瘍増殖機構の重要性を検討する予定である．これまで申請者らは，CXCL12/CXCR4 axis および MSC-DA に焦点を絞り検討してきた．その結果，CXCL12 中和抗体による全身性の CXCL12 抑制では，明らかな抗腫瘍効果が得られず，腫瘍局所の CXCL12 を KD した異種移植腫瘍においてもその増殖抑制に有意差は認められなかった．実際の in vivo における MSC の動態を考慮すると，MSC が腫瘍内に保持されるその他の機構や一部の MSC が pericyte への分化以外の細胞運命を辿るのは，明らかであり，この研究を通して，MSC-DA 以外の MSC 依存性腫瘍増殖機構についても詳細な検討を加える．形成された腫瘍に存在する MSC の局在，各種分化マーカー (CD31, α SMA, NG2, desmin, vimentin, マクロファージマーカーなど) による 2 重染色を併用し，MSC の分化，細胞運命を経時的に観察する．それによって MSC の細胞運命が明らかになった場合には，MSC が腫瘍内に留まる機序を，共培養実験や化学走性アッセイなどにより推定する．さらにはそれを抗体や小分子により抑制した in vivo 治療実験を行い，治療標的としての意義を明らかにする．

4. 研究成果

DNA 脱メチル化酵素としての TET1-3/AID

1) TET1-3 KD / TET&AID DKD COLO 320 株の樹立

TET1-3 おのおの単独に合成 siRNA による一過性の KD 株を樹立した．次に TET 単独あるいは AID (KD 安定株) との組み合わせによるダブル KD (DKD)，トリプル KD (TKD) およびクアドラ KD (QKD) をそれぞれ樹立した．その後 CXCL12 プロモータにおける DNA メチル化レベルを pyrosequencer により定量的に解析したが，TET/AID がこの系において DNA 脱メチル化酵素として作用しなかった．

LINE-1, Alu, satellite- α などの繰り返しゲノム配列を用いたゲノムワイドの脱メチル化状態についても検討したが，これらの KD 細胞株には，ゲノムワイドのメチル化状態にも変化が認められなかった．

異種移植腫瘍における AID の突然変異原性

AID 高発現株 COLO320 を用いて，細胞株，xenograft における癌関連遺伝子の点突然変異をシーケンスにて解析した．対象遺伝子は TP53, BIRC2, XIAP, CCND1, CCNE1, CTNNB1, MYC, CDKN2A, KRAS, APC であり，これらの C to T 変異の頻度を明らかにし，AID の mutator としての働きおよびその標的遺伝子を探索した．その結果，これらの癌関連遺伝子 C to T 変異の頻度は，10,000 塩基対あたり，TP53 13.4, BIRC2 8.8, CCNE1 6.8 の順で高く，しかも同時に複数のローカスに変異を認めた．

MSC-DA 以外の MSC 依存性腫瘍増殖機

構の解明とそれを標的とした in vivo 治療実験

TET/AID が CXCL12 プロモータにおいて DNA 脱メチル化酵素として作用しないことが判明したため、当初の計画を変更し、MSC-DA 以外の MSC 依存性腫瘍増殖機構の解明のテーマをそれぞれ前期および中後期に重点的に研究した。申請者は、これまでに MSC がある種のヒト大腸癌の異種移植腫瘍の生着・増殖を促進することを示した。

まず、MSC 依存性大腸癌細胞株 COLO320 および非依存性株 HT-29 と MSC 共培養により発現が亢進する分子を MSC ニッチシグナルと捉え検討したところ、Vcam1, Cxcl12, Cdh1, Jag1 および Ccl5 が同定された。これらのニッチシグナルのうち、E-cadherin のみが細胞増殖を抑制し、その他はすべて細胞増殖を促進した。さらに、MSC は、HT-29 に間葉上皮転換 (mesenchymal-epithelial transition; 以下 MET と略記) を誘発し、細胞増殖を抑制した。一方、MSC 依存性 COLO320 では、ニッチシグナルを介して、その細胞増殖を促進した。したがって MSC は context に応じて正反対のニッチシグナルにより癌細胞の増殖を調節する興味深い結果が得られた。

次に、MSC 依存性の機序を検討するために、COLO320 においてレンチウイルスを用いた VEGF 過剰発現株および CXCL12KD 株を樹立し xenograft を作成した。すなわち、COLO320 を MSC 非依存性へ、あるいは反対に HT-29 を MSC 依存性腫瘍へ転換し、VEGF を強制発現、あるいは、CXCL12 をノックダウンした COLO320 のどちらが MSC 非依存性を獲得するか検討したが、これらの因子単独では MSC 依存性を説明し得なかった。この点は、今後の研究課題である。

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9件)

1. 川上賢太郎, 永石歆和, 有村佳昭, 間葉系幹細胞を用いた消化管再生医療. Medical Science Digest, 査読無, 2, 2016, 65-68.

2. Shimizu H, Arimura Y, Onodera K, Takahashi H, Okahara S, Kodaira J, Oohashi H, Isshiki H, Kawakami K, Yamashita K, Shinomura Y, Hosokawa M, Malignant potential of gastrointestinal cancers assessed by structural equation modeling, PLoS ONE, 査読有, 11, 2016, e0149327.

1. Onodera K, Arimura Y, Isshiki H, Kawakami K, Nagaishi K, Yamashita K, Yamamoto E, Niinuma T, Naishiro Y, Suzuki H, Imai K, Shinomura Y, Low-frequency IL23R coding variant associated with Crohn's disease susceptibility in Japanese subjects

identified by personal genomics analysis, PLoS ONE, 査読有, 10, 2015, e 0137801.

3. Nagaishi K, Arimura Y, Fujimiya M, Stem cell therapy for inflammatory bowel disease, J Gastroenterol, 査読有, 50, 2015, 280-286.

4. Nagaishi K, Ataka K, Echizen E, Arimura Y, Fujimiya M, Mesenchymal stem cell therapy ameliorates diabetic hepatocyte damage in mice by inhibiting infiltration of bone marrow-derived cells, Hepatology, 査読有, 59, 2014, 1816-1829.

5. Nasuno M, Arimura Y, Nagaishi K, Isshiki H, Onodera K, Nakagaki S, Watanabe S, Idogawa M, Yamashita K, Naishiro Y, Adachi Y, Suzuki H, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y, Mesenchymal stem cells cancel azoxymethane-induced tumor initiation, STEM CELLS, 査読有, 32, 2014, 913-925.

6. Watanabe S, Arimura Y, Nagaishi K, Isshiki H, Onodera K, Nasuno M, Yamashita K, Idogawa M, Naishiro Y, Murata M, Adachi Y, Fujimiya M, Imai K, Conditioned mesenchymal stem cells produce pleiotropic gut trophic factors, J Gastroenterol, 査読有, 49, 2013, 270-282.

7. Yamazaki K, Umeno J, Takahashi A, Hirano A, Johnson TA, Kumasaka N, Morizono T, Hosono N, Kawaguchi T, Takazoe M, Yamada T, Suzuki Y, Tanaka H, Motoya S, Hosokawa M, Arimura Y, Shinomura Y, Matsui T, Matsumoto T, Iida M, Tsunoda T, Nakamura Y, Kamatani N, Kubo M, A Genome-Wide Association Study Identifies 2 Susceptibility Loci for Crohn's Disease in a Japanese Population, Gastroenterology, 査読有, 144, 2013, 781-788.

8. Arimura Y, Isshiki H, Onodera K, Nagaishi K, Yamashita K, Sonoda T, Matsumoto T, Takahashi A, Takazoe M, Yamazaki K, Kubo M, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y, Characteristics of Japanese inflammatory bowel disease susceptibility loci, J Gastroenterol, 査読有, 49, 2014, 1217-1230.

9. 有村佳昭, 小野寺 馨, 一色裕之, 川上賢太郎. 間葉系幹細胞による消化管再生医療. G.I. Research, 査読無, 22, 2014, 435-442.

[学会発表](計3件)

1. 有村佳昭. 日本人の IBD 感受性遺伝子. 第 154 回日本消化器内視鏡学会東北支部例会 (ランチオンセミナー), 2015 年 2 月 6 日, 仙台国際センター (宮城県仙台市).

2. 一色裕之, 有村佳昭, 永石歆和, 苗代康可, 篠村恭久, 今井浩三. 骨髄間葉系幹細胞依存性の大腸癌細胞増殖の機序.

JDDW2013, 2013年10月10日, 品川
プリンスホテル(東京都港区).

3. 一色裕之, **有村佳昭**, 小野寺馨, 永石歓
和, **苗代康可**, 篠村恭久, 今井浩三. 骨
髄間葉系幹細胞依存性大腸癌細胞増殖の
機序. 第50回日本消化器免疫学会総会,
2013年8月2日, ホテルグランドヒル市
谷(東京都新宿区).

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

苗代 康可 (Yasuyoshi Naishiro)
札幌医科大学・医療人育成センター・講師
研究者番号: 80347161

(2) 研究分担者

有村 佳昭 (Yoshiaki Arimura)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号: 80305218