

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670376

研究課題名(和文)造血幹細胞と共通した大腸がん幹細胞5-FU耐性分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)5-FU resistance mechanism between hematopoietic stem cells and colon cancer stem cells

研究代表者

安永 正浩 (Yasunaga, Masahiro)

独立行政法人国立がん研究センター・その他部局等・ユニット長

研究者番号：80450576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：SLC6A6ノックダウン大腸がん細胞では、抗がん剤の感受性が5-100倍高まることを明らかにした。同細胞では、造血幹細胞に特徴的な遺伝子が数多く減少していた。そこで、造血幹細胞と大腸がん細胞で共通して、抗がん剤耐性に働く分子の探索を行った。1. ATG遺伝子、2. FOX系転写因子、3. インテグリン・SRC、4. 糖代謝調節因子などが選出された。1. に関しては、大腸がん細胞において、(a) Side population細胞の生存維持、(b) 抗がん剤耐性と強く関与していることが判明した。BECN1の関与はなく、MEK/ERKやAKT/mTOR経路とも独立した新規オートファジーシグナル伝達経路であった。

研究成果の概要(英文)：SLC6A6-knock down colon cancer (CC) cells showed increased chemosensitivity 5-100 fold. Moreover, in the cells, many genes specific to hematopoietic stem cell (HSC) were decreased. Comprehensive analysis to find the regulatory molecules of the chemoresistance common between HSCs and CC cells was conducted. 1. ATG-gene, 2. FOX-related transcription factor, 3. Integrin-Src or 4. regulator of glucose metabolism were selected. The functional analysis indicated that ATG-gene was strongly associated with the survival of the side population cells and the chemosensitivity in colon cancer cells. We found that it was novel autophagic signaling pathway.

研究分野：腫瘍学

キーワード：大腸がん SLC6A6 5-FU 抗がん剤耐性 がん幹細胞 造血幹細胞 トランスポーター バイオインフォマティクス

## 1. 研究開始当初の背景

様々な分子標的剤や抗体医薬が臨床応用されて、がんの予後も確実に改善している。しかしながら、Genomic instability に伴う2次遺伝子変異やがん幹細胞の存在などの薬物耐性の問題も急浮上して来ている。本課題では、抗がん剤耐性の新たな分子メカニズムの探索に重点を置いており、特に大腸がんと5-FUに着目した。5-FUを含むフルオロウラシルは大腸がん以外にも、他の消化器系の胃がん、食道がん、頭頸部がんや乳がんなど世界中で多くのがん患者に使用されている。しかしながら、初回耐性例も多く感受性の予測が長年必要とされていた。5-FU薬物代謝系のThymidylate synthetase (TS)、Thymidine phosphorylase (TP)、orotate phosphoribosyltransferase (ORPT)、Uridine phosphorylase (UP)、Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD)が効果予測因子として期待されたが、実際は臨床結果と一致しないケースも多く、独立した制御系の存在が指摘されている。また、医学生物学の研究成果から造血幹細胞が5-FU耐性であることもよく知られている。しかしながら、この造血幹細胞の5-FU耐性メカニズムに関しても、休止期状態や豊富なトランスポーターの存在といった漠然とした概念が存在するのみで、詳細は不明である。5-FUが固型腫瘍に有効で、血液性悪性腫瘍には無効である理由も実際は明確ではない。

## 2. 研究の目的

大腸がんが強発現するSLC6A6をノックダウン(KD)することでCD133陽性細胞とSide Population (SP)分画が消失し、抗がん剤、特に5-FU感受性が増加することを明らかにした。一方、造血幹細胞にはCD133陽性細胞とSP分画が数多く存在しており、5-FUに耐性であることも知られている。しかし、

その分子メカニズムは明らかにされていない。そこで、本研究は、造血幹細胞との共通性を手掛かりにして、大腸がん細胞の5-FU耐性を制御する遺伝子の探索と機能解析を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) タウリントランスポーター SLC6A6 の機能解析

SLC6A6 ノックダウン(KD)大腸がん細胞株を作製した。コントロールとしてGFP ノックダウン(Cont)大腸がん細胞株を作製した。抗がん剤耐性を含む機能解析を行った。

### (2) 大腸がん細胞と造血幹細胞で共通の5-FU耐性に働く候補遺伝子の選出

Cont細胞とSLC6A6-KD細胞に5FUを添加処理して、投与前と24時間後のRNAを抽出した。Affymetrix社のGenechipを用いて、DNAマイクロアレイ解析を行い、遺伝子のプロファイリングを作成した。公共のデータベースであるNCBIのGene Expression Omnibus(GEO)から造血幹細胞に関するDNAマイクロアレイのデータを複数入手して、遺伝子のプロファイリングを作成した。解析ソフト(Gene springやR)で、大腸がん細胞と造血幹細胞で、共通に高発現して、抗がん剤特に5-FU耐性に関与する候補遺伝子のリストを作成した。

### (3) 抗がん剤耐性遺伝子候補の機能解析

リスト中のオートファジー関連のATG遺伝子に着目して、shRNAでノックダウン細胞を作製した。コントロールとして、GFPノックダウン細胞とオートファジーシグナル伝達経路の初期ステップにおける調節因子であるBECN1遺伝子のノックダウン細胞を作製した。機能活性として、細胞生存活性、栄養飢餓活性、抗がん剤感受性、SP細胞の増減に関して評価を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) タウリントランスポーター SLC6A6 の機能解析

SLC6A6 という大腸がんに関与しているタウリントランスポーターの発現を20-30%にノックダウンするだけで、CD133陽性細胞とSP細胞の著明な減少と共に5-FUの感受性が5-100倍増加することを明らかにした。

##### (2) 大腸がん細胞と造血幹細胞で共通の5-FU耐性に働く候補遺伝子の選出

DNAマイクロアレイ解析から作成した遺伝子プロファイリングを基に、Cont大腸がん細胞株とその5-FU無処理細胞株において、SLC6A6-KD大腸がん細胞株とその5-FU処理細胞株と比較して高発現している遺伝子群のリストを作成した。ホメオボックス型転写因子、ポリコム型エピジェネティック制御因子、クロマチンリプログラミング型エピジェネティック制御因子、iPS型リプログラミング制御因子、酸化還元(レドックス)制御因子、アポトーシス細胞処理因子、赤白血病誘導因子、細胞内小器官トランスポーターなど、造血幹細胞特異的遺伝子群が含まれていた。さらに、NCBIのGEOを用いて造血幹細胞の遺伝子プロファイリングと比較することで、候補遺伝子の絞り込みを行った。そして、解析ソフトを用いて、大腸がん細胞と造血幹細胞で、共通に高発現して、抗がん剤特に5-FU耐性に関与する遺伝子の候補リストを完成した。

##### (3) 抗がん剤耐性遺伝子候補の機能解析

(2)のリスト中から、第一にオートファジー関連のATG遺伝子が候補として選出された。そこで、大腸がんノックダウン(KD)細胞を作製して機能解析を行ったところ、造血幹細胞との共通の生物活性である(1)SP細胞の生存維持、(2)抗がん剤耐性

(5-FU含む)と強く関与していることが判明した。また、SLC6A6強制発現による獲得形質をATG-KDでキャンセルできることも確認できた。さらに、従来のオートファジーシグナル伝達経路の初期ステップにおける重要な調節因子であるBECN1の関与はなく、MEK/ERKやAKT/mTOR経路とも独立した新規オートファジーシグナル伝達経路であることが判明した。造血幹細胞でもオートファジー活性は増強していることは知られており、大腸がん幹細胞との共通の伝達経路で抗がん剤耐性に強く影響を与えていることが示されたことになる。第二に、FOX系転写因子の関与も示唆された。FOX系転写因子と造血幹細胞の関係は急速に解析が進んでおり、抗がん剤耐性に関与する有力な制御因子と思われた。さらに、インテグリン・SRC系調節因子や糖代謝制御因子などの干渉作用を受けている可能性も示された。これらの細胞内シグナル経路や代謝系の調節作用による大腸がん細胞と造血幹細胞で共通にみられる生体内反応の変化が、5-FUを含む抗がん剤の感受性に強く影響を与えていることが示唆された。以上について、さらなる検討が必要と思われた。

#### 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. Yasunaga M, Matsumura Y. Role of SLC6A6 in promoting the survival and multidrug resistance of colorectal cancer. Sci. Rep. 査読有, 2014, 4, 4582.

[学会発表](計 1件)

1. 安永正造、松村保広 The prosurvival role of the taurine transporter SLC6A6 in multidrug resistance of colorectal cancer. 第73回日本癌学会学術総会 □

演 2014 年 9 月 25 日

〔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〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安永 正浩 (Yasunaga Masahiro)  
国立がん研究センター、臨床開発セン  
ター、  
新薬開発分野、ユニット長  
研究者番号：80450576

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

松村保広 (Matsumura Yasuhiro)  
国立がん研究センター、臨床開発セン  
ター、  
新薬開発分野、分野長  
研究者番号：90209619