

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 4 月 26 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26430125

研究課題名(和文) ニッチの均質化によるがん幹細胞脆弱化の基盤研究

研究課題名(英文) Fundamental study of niche modification for reducing cancer stem cell properties

研究代表者

板野 直樹 (ITANO, Naoki)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：40257712

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)：ニッチ構成要素としてのヒアルロン酸が、がん幹細胞性の制御に働く機構の解明を目的に、ヒアルロン酸高産生乳がん細胞における代謝反応について、安定同位体標識と質量分析により解析した。その結果、細胞内ヘキソサミン合成経路の代謝流束が加速していることを明らかにした。また、ヘキソサミン合成経路の律速酵素であるGlutamine fructose amidotransferase 1遺伝子の過剰発現あるいはノックダウン細胞を用いた解析から、ヘキソサミン合成経路が抗がん剤耐性などのがん幹細胞性の制御に重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：CSCs are thought to be responsible for tumor recurrence, due to their resistance to chemo- and radiotherapy. CSCs reside in a special microenvironmental niche that provides a favorable microenvironment for their self-renewal and maintenance. We have previously demonstrated that overproduction of hyaluronan (HA), a primary component of stem cell niche, promotes acquisition of CSC signatures. Here, we investigated the metabolic reprogramming in HA-overproducing cells by stable isotope-assisted tracing and mass spectrometry profiling. These integrated approaches disclosed an acceleration of metabolic flux in the hexosamine biosynthetic pathway (HBP). Overexpression or gene silencing of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase 1, an HBP rate-limiting enzyme, suggests that HA production regulates drug resistance-related properties of CSCs via HBP.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：がん幹細胞 ニッチ ストレス耐性 ヒアルロン酸

### 1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞は、従来の化学療法や放射線治療に耐性を示すことから、転移や再発を引き起こす最大の要因と考えられ、根治的治療のための標的として重視されている。

がん幹細胞は、ニッチと呼ばれる特殊な微小環境との緊密な連携のもと幹細胞性を維持し、様々なストレスに耐性を発揮して、がんの発生や進展に中心的な役割を果たすと考えられている。但し、がん幹細胞は一様ではなく、また、幹細胞性を維持する機構も多様であると考えられる。我々はこれまでに、がん微小環境におけるヒアルロン酸の増加が、がん幹細胞の増幅とストレス耐性の質的变化をもたらすことを見出してきた。そこで本研究では、がん幹細胞ニッチにおける変化が、異なったストレス耐性スペクトルを示す不均一ながん幹細胞の出現を促して、がん細胞集団に頑健性を賦与するという仮説を立て、その検証に取り組んだ。

### 2. 研究の目的

本研究では、がん幹細胞ニッチの多様性を生み出す責任分子として、がん微小環境の構築に重要なヒアルロン酸に着目し、ヒアルロン酸を起点に形成されるニッチの質的变化が、不均一ながん幹細胞の出現を促す機構の解明と、その理解を通じて、がん幹細胞を脆弱化するための学術的・技術的基盤の形成を目指した。

### 3. 研究の方法

#### 初代乳癌細胞の樹立

ヒアルロン酸合成酵素 2 遺伝子のコンディショナルトランスジェニックマウス (Has2 cTg) と MMTV (mouse mammary tumor virus) プロモーター制御下に neu がん遺伝子を発現する MMTV-neu トランスジェニックマウスを交配し、Has2<sup>Neo</sup> マウスを作出した。Has2<sup>Neo</sup> マウスにさらに MMTV-Cre トランスジェニックマウスを交配し、MMTV プロモーター制御下に Cre 組換え酵素を乳癌特異的に発現して、ヒアルロン酸を過剰産生する Has2<sup>Neo</sup> マウスを作出した。

MMTV-neu、Has2<sup>Neo</sup>、そして Has2<sup>Neo</sup> 各マウスの乳腺に発生した乳がん組織を摘出し、コラゲナーゼ処理により細胞塊を分散後、細胞懸濁液を培養皿に播種し、トリプシンの段階処理により初代乳がん細胞を樹立した。初代乳がん細胞は、10%牛胎児血清 (FCS) とペニシリン・ストレプトマイシン (和光純薬工業) を含む DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)-High Glucose (ナカライテスク) から成る通常培地で 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。Has2<sup>Neo</sup> 乳がん細胞では、ネオマイシン耐性遺伝子のカセットが挿入されているため、下流にある Has2 遺伝子は発現しない。しかし、Has2<sup>Neo</sup> 細胞では、乳がん細胞で Cre 組換え酵素が発現し、IoxP で挟まれたネオマイシン耐性遺伝子のカセットが除去され、Has2

遺伝子が発現する。

#### Has2 高発現乳癌細胞の樹立

MMTV-neu 乳がん細胞に Murine Has2 cDNA を配した pEX-Neo 発現ベクターを遺伝子導入して Has2 遺伝子の安定発現株 Has2 #4 細胞を樹立した。対照として発現ベクターのみを導入した Mock 細胞を樹立した。

#### GFAT1 ノックダウン細胞の樹立

Has2<sup>Neo</sup> 乳がん細胞に Glutamine fructose amidotransferase 1 (GFAT1) 遺伝子のノックダウンコンストラクト (#A と #B の 2 種類) を配したレンチウイルスを感染導入し、ピューロマイシン薬剤選択により遺伝子導入細胞を選別した。

#### ヒアルロン酸測定

初代乳癌細胞の培養上清中に分泌されるヒアルロン酸の濃度測定は、以前の報告に記載された方法に従って実施した (Koyama, H., et. al. Am J Pathol 170, 1086-1099, 2007)。

#### リアルタイム定量 RT-PCR

Murine Has2 遺伝子発現の定量 RT-PCR は、以前の報告に記載された方法に従って実施した (Koyama, H., et. al. Am J Pathol 170, 1086-1099, 2007)。Murine GFAT1 遺伝子発現の定量 RT-PCR は、ABI gene expression analyses (Mm01183874\_m1) を用いて、94 °C, 30 秒間の 1 サイクルと 94 °C, 3 秒間と 60 °C, 25 秒間の 40 サイクルで行った。

#### ウェスタンブロット法

乳がん細胞 (2 × 10<sup>5</sup> 細胞) を 35mm dish に播種し、72 時間培養後、RIPA lysis buffer (ナカライテスク) により細胞を可溶化した。可溶性画分中のタンパク質 (2 μg) は 10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、PVDF 膜 (Millipore) に転写した。一次抗体には、anti-HIF-1 抗体 (1:1000 希釈 Novus Biologicals, LLC)、二次抗体には HRP 結合抗体 (1:2000 希釈; Anti-Mouse IgG, HRP-linked antibody, Cell Signaling Technology) をそれぞれ用いた。対照として、anti-actin 抗体 (1:2000 希釈; Wako Pure Chemical Industries) を使用した。抗体反応後、ウェスタンブロット検出試薬 (Wako Pure Chemical Industries) で PVDF 膜を処理し、化学発光シグナルを ImageQuant LAS4000 Mini Luminescent image analyzer (GE Healthcare) で検出した。

#### フローサイトメトリー解析

樹立した初代乳癌細胞を PE/Cy5-標識抗 CD24 および PE-標識抗 CD44 抗体と反応させ、洗浄後、冷 1% FBS 含有リン酸緩衝液 (PBS) に懸濁して、FACS Calibur (BD Biosciences) で解析した。

#### 抗がん剤・阻害剤処理

乳がん細胞を 6 穴培養皿の各ウェルに 1 × 10<sup>5</sup> 細胞の細胞数で播種し、24 時間培養した。培養後、細胞を培地のみ、20 μM 6-Diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) を含む培地、25 μM シスプラチンを含む培地、あるいは、20 μM DON と 25 μM シスプラチンを

含む培地で 24 時間培養し、アポトーシス細胞の割合をフローサイトメトリー解析により測定した。

#### アポトーシス細胞の測定

シスプラチンあるいは DON 処理した細胞は、PBS で 2 回洗浄し、トリプシン処理後、細胞懸濁液として回収した。回収した細胞と PBS 洗浄液中に回収された死細胞をまとめて 1200 rpm、室温で 5 分間遠心し、上清を除去した。細胞を MEBCYTO apoptosis kit (MBL ライフサイエンス社) を用いて、暗所で 15 分間、室温にて反応して染色した。アポトーシス細胞は、FACS Calibur を用いて測定し、Cell Quest (BD Biosciences) により解析した。

#### 統計解析

二群間の比較は、t 検定を用いて行い、危険率 5% 未満 ( $*p < 0.05$ ) を統計学的有意差ありと判定した。

#### 4. 研究成果

ニッチ構成要素としてのヒアルロン酸について、その産生増加ががん幹細胞性の制御に働くことを明らかにするため、ヒアルロン酸高産生乳がん細胞と対照乳がん細胞を用いて、代謝反応について安定同位体標識と質量分析により解析した。その結果、ヒアルロン酸高産生乳がん細胞では、対照細胞に比較して細胞内におけるヘキソサミン合成経路の代謝流束が加速していることが明らかとなった (図 1)。

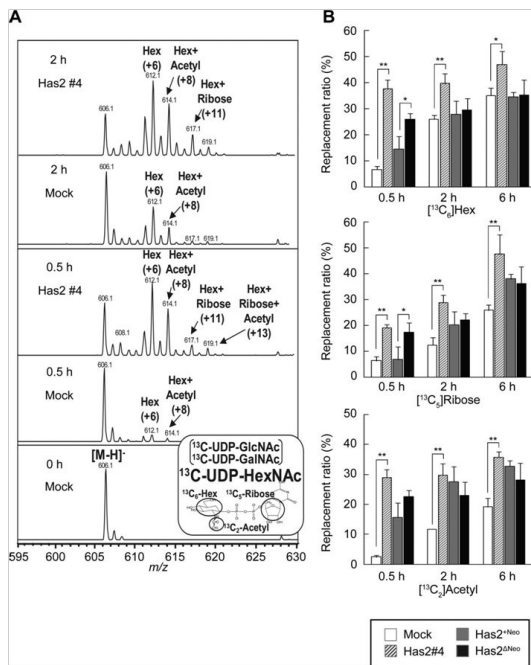


図 1. ヘキソサミン代謝流束

A, 質量分析プロファイル B, UDP-GlcNAc 中のヘキソース, リボース, アセチル基における安定同位体元素への置換割合  
ヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞; Has2<sup>Neo</sup> と Has2 #4, 対照細胞; Has2<sup>Neo</sup> と Mock

ヘキソサミン合成経路は、ヒアルロン酸糖供与体である UDP-*N*-アセチルグルコサミン (UDP-GlcNAc) の生合成反応経路であり、ヒアルロン酸合成の調節に働くとともに、他の複合糖質の生合成やタンパク質の *O*-GlcNAc 修飾の調節に働き、細胞動態を広範に制御している。このことは、ヒアルロン酸がヘキソサミン合成経路を介して、がん幹細胞性を制御している可能性を示唆している。

そこで、ヘキソサミン合成経路の律速酵素である GFAT1 遺伝子の過剰発現あるいはノックダウン細胞を作製して、ヘキソサミン合成経路ががん幹細胞性の制御に働く可能性を検討した。その結果、GFAT1 を強制発現した Has2<sup>Neo</sup> 細胞では、がん幹細胞性の制御に重要とされる低酸素誘導因子 HIF-1 のサブユニットの発現が亢進していた (図 2)。一方、Has2<sup>Neo</sup> 細胞で GFAT1 の遺伝子の発現を抑制した場合には、HIF-1 サブユニットの発現とがん幹細胞性が共に抑制された (図 3、4)。このことは、ヒアルロン酸産生の下流でヘキソサミン合成経路が低酸素誘導因子 HIF-1 シグナルを調節して、がん幹細胞性の制御に働くことを示唆している。

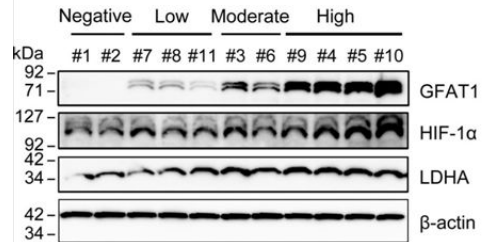


図 2. GFAT1 遺伝子導入細胞における HIF-1 の発現 GFAT1 発現量の異なる 4 群の細胞 (Negative, Low, Moderate, High) を用いて、HIF-1 の発現量をウエスタンブロット法により解析した。

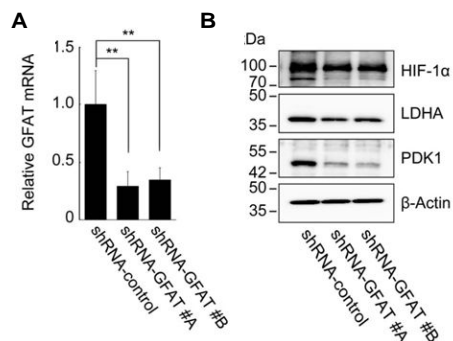
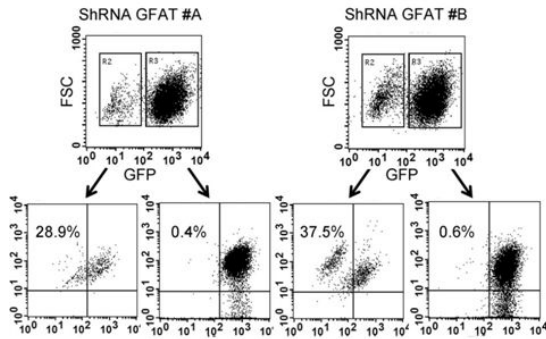


図 3. GFAT1 遺伝子ノックダウン細胞における HIF-1 の発現

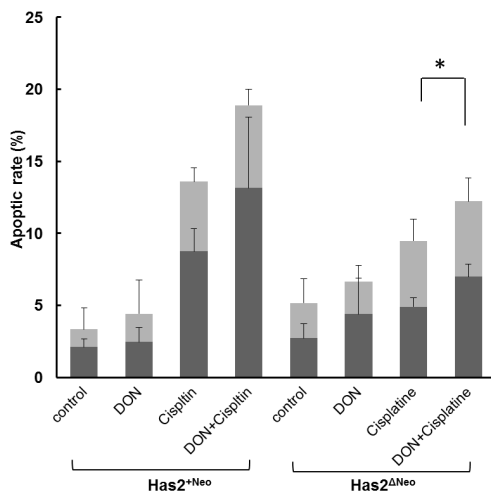
A, GFAT1 遺伝子ノックダウン細胞における GFAT1 遺伝子の発現 B, HIF-1 サブユニット発現のウエスタンブロット解析



**図4 .GFAT1 遺伝子ノックダウン細胞におけるがん幹細胞様細胞の割合**

GFAT1 遺伝子ノックダウン細胞(GFP 陽性細胞)と非ノックダウン細胞 (GFP 陰性) におけるがん幹細胞様細胞の割合。がん幹細胞様細胞の割合は、CD24 と CD44 の発現を指標にフローサイトメーターにより解析した。

がん幹細胞は抗がん剤耐性を発現することが知られている。そこで、ヘキサミン合成経路が抗がん剤耐性の発現に与する可能性を検討する目的で、GFAT1 の阻害剤でヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞を処理し、抗がん剤のシスプラチン処理後のアポトーシス細胞の割合を解析した。その結果、Has2<sup>Neo</sup> 細胞において GFAT1 の活性阻害により、シスプラチンに対する感受性が上昇した(図5)。



**図5 .シスプラチン処理後のアポトーシス細胞の割合**

ヒアルロン酸過剰産生乳がん Has2<sup>Neo</sup> 細胞と対照 Has2<sup>ΔNeo</sup> 細胞を DON 単独、シスプラチン単独、あるいは両者を併用処理し、アポトーシス細胞の割合をフローサイトメトリー解析した。初期アポトーシス細胞の割合(灰色)は、アネキシン V 染色陽性細胞の割合として測定し、後期アポトーシス細胞の割合(黒色)は PI 染色陽性細胞の割合として測定した。

以上の結果から、ヒアルロン酸の産生がヘキサミン合成経路を介して、がん幹細胞性の制御と抗がん剤に対する耐性の発現に働くことが示唆された。このことは新規の発見であり、その成果は、抗がん剤耐性を獲得したがん細胞に対する新たな治療法の開発に途を拓くと期待される。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1. Chanmee T, Ontong P, Izumikawa T, Higashide M, Mochizuki N, Chokchaitaweek C, Khansai M, Nakajima K, Kakizaki I, Kongtawelert P, Taniguchi N, Itano N. Hyaluronan production regulates metabolic and cancer stem-like properties of breast cancer cells via hexosamine biosynthetic pathway-coupled HIF-1 signaling. *J Biol Chem*. 291, 24105-24120 (2016) 査読有
2. Chanmee T, Ontong P, Itano N. Hyaluronan: A modulator of the tumor microenvironment. *Cancer Lett*. 375, 20-30 (2016) 査読有
3. Chanmee T, Ontong P, Kimata K, Itano N. Key roles of hyaluronan and its CD44 receptor in the stemness and survival of cancer stem cells. *Front Oncol*. 5:180. doi: 10.3389/fonc.2015.00180. eCollection 2015. 査読有

〔学会発表〕(計11件)

1. 泉川友美、板野直樹 ヒアルロン酸合成を起点とした代謝リプログラミングとがん幹細胞性の発現調節 ConBio2017 神戸、2017.12.7.
2. 東出実歩、泉川友美、Chokchaitaweek C, Chatchadawarai、板野直樹 乳がん細胞の上皮-間葉転換を制御するヘキサミン合成経路の役割 ConBio2017 神戸、2017.12.6.
3. 板野直樹 ヘキサミン合成経路を介したがん幹細胞様細胞の代謝リプログラミング 第26回日本がん転移学会 学術集会・総会 大阪、2017.7.27.
4. 泉川友美、チャンミー シーラウト、東出実歩、ショーチャイタウィスウ チャッチャダワライ、中嶋和紀、柿崎育子、谷口直之、板野直樹 ヘキサミン合成経路を介したがん幹細胞の代謝リプログラミング 第36回日本糖質学会年会. 旭川、2017.7.21
5. Itano, N. Hyaluronan signaling in stem cell regulation. International Society for Hyaluronan Sciences 11<sup>th</sup> International Conference (Hyaluronan 2017) Cleveland, OH, USA, 2017. 6. 15.
6. 泉川友美, Theerawut Chanmee, Pawared Ontong, 東出実歩, 望月信利,

Chatchadawalai Chokchaitaweasuk,  
Manatsanan Khansai, 中嶋和紀, 柿崎育  
子, Prachya Kongtawelert, 谷口直之,  
板野直樹 ヒアルロン酸産生によるが  
ん幹細胞の代謝リプログラミング 第  
64 回日本生化学会 近畿支部例会、大  
阪大学豊中キャンパス、大阪、  
2017.5.27

7. Tomomi Izumikawa, Theerawut Chanmee,  
Pawared Ontong, Miho Higashide,  
Nobutoshi Mochizuki, Chatchadawalai  
Chokchaitaweasuk, Manatsanan Khansai,  
Kazuki Nakajima, Ikuko Kakizaki, Prachya  
Kongtawelert, Naoyuki Taniguchi, Naoki  
Itano Hyaluronan production regulates  
metabolic and cancer stem-like properties of  
breast cancer cells via hexosamine  
biosynthetic pathway-coupled HIF-1  
signaling. 第 89 回日本生化学会大会  
2016 年 9 月 27 日 仙台市
8. 東出実歩、望月信利、チャンミー シー  
ラウト、板野直樹 ヘキソサミン合成  
経路による上皮 間葉転換制御機構  
第 63 回日本生化学会近畿支部例会  
2016 年 5 月 21 日 神戸市
9. 板野直樹 ヒアルロン酸産生によるが  
ん幹細胞の代謝リプログラミング  
BMB2015 神戸、2015.12.4.
10. 板野直樹 がん幹細胞制御因子として  
のヒアルロン酸 第 74 回日本癌学会学  
術総会 名古屋、2015.10.10.
11. Itano, N., Chanmee, T., Ontong, P.,  
Mochizuki, N., Kongtawelert, P.,  
\*Konno, K. Excessive hyaluronan  
production promotes acquisition of  
cancer stem signatures. International  
Society for Hyaluronan Sciences 10th  
International Conference (Hyaluronan  
2015) Florence, Italy, 2015. 7. 11.

〔図書〕(計 1 件)

1. Chanmee, T., Ontong, P., Itano, N.  
Hyaluronan: cancer and cancer metastasis.  
Glycoscience: Biology and Medicine (Eds.  
Taniguchi N. et al.) Springer pp. 1411-1417,  
2015.

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~itanon/in  
dex2.html](http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~itanon/in<br/>dex2.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

板野 直樹 (ITANO, Naoki)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：40257712

### (2) 研究協力者

泉川 友美 (IZUMIKAWA, Tomomi)  
京都産業大学・総合生命科学部・研究助教

Chanmee Theerawut  
京都産業大学・総合生命科学部・研究員

Ontong Pawared  
京都産業大学大学院・工学研究科学生

望月 信利 (MOCHIZUKI, Nobutoshi)  
京都産業大学大学院・生命科学研究科学生

東出 実歩 (HIGASHIDE, Miho)  
京都産業大学大学院・生命科学研究科学生

Chokchaitaweasuk Chatchadawarai  
京都産業大学大学院・生命科学研究科学生