

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460424

研究課題名(和文) 脂肪酸シグナルを標的とする癌幹細胞ターゲティングの検討

研究課題名(英文) Cancer stem cell targeting by fatty acid signals

研究代表者

大森 斉 (Ohmori, Hitoshi)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：80213875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：一般的な食品成分である脂肪酸の癌幹細胞への影響を、幹細胞性への影響を与える機序、および、がん転移・がん化学療法への影響について検討を行った。とくに、トランス脂肪酸であるエライジン酸は、強い癌転移促進効果を有し、長鎖脂肪酸受容体からEGFRへのトランス活性化を介したwnt系の活性化、マイクロRNAを介した分化誘導遺伝子の抑制などによりがん幹細胞性を促進することが明らかになった。また、-6系長鎖脂肪酸であるリノール酸ではdormant stemに関連する遺伝子系の発現が亢進しており、化学療法においては癌幹細胞の存続を促進する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Effect of fatty acids is studied on mechanism of cancer stem activation, influence to cancer metastasis and chemoresistance. Elaidic acid, a trans fatty acid, showed high potential promoting cancer metastasis by activating cancer stem cells by 1) transactivation of EGFR and the subsequent wnt activation, and 2) inhibition of expression of pro-differentiation genes by micro RNAs. Linoleic acid, an -6 long chain fatty acid, induced gene expression of dormant-stem-associated factors and enhanced survival of cancer stem cells against chemotherapy.

研究分野：分子病理

キーワード：エライジン酸 リノール酸 がん幹細胞 マイクロRNA

## 1. 研究開始当初の背景

われわれは、長鎖脂肪酸であるリノール酸やトランス脂肪酸であるエライジン酸が癌幹細胞に対し影響を与え、前者は癌幹細胞に冬眠状態を誘導するのに対し後者は増殖を促進することを発見していた。これらのことから、食品中の脂肪酸が癌幹細胞のニッチとしてその制御に関係し、癌の発生・進展に多大の影響を与えることが示唆され、脂肪酸と癌との関係を検討することが強く要請された。

## 2. 研究の目的

長鎖脂肪酸は食品中脂質の主要成分であり生体内で種々の生理活性を有する。われわれは、長鎖脂肪酸の癌幹細胞に与える影響とその機序を解明すること、および、その知見をもとに長鎖脂肪酸シグナルを標的とする癌がん予防・転移予防につながる食品の開発を目的とする。この結果、現在の癌治療に加えて食品を通じた癌幹細胞ニッチ・ターゲティングを行うことが可能になるだけでなく、高い利便性と治療経費の軽減も利点となると考えられる。

## 3. 研究の方法

研究は、以下の5題のテーマに沿って行う。

リノール酸・エライジン酸の幹細胞特異的シグナル同定、および、細胞・動物を用いたシグナルの確認と標的化。既知の長鎖脂肪酸受容体の検討、細胞内脂肪酸受容体の同定、膜型受容体トランス活性化、脂肪酸によるmicroRNA発現変化も検討する。細胞膜への脂肪酸組込による癌転移能の変化、骨髄間葉系幹細胞への脂肪酸の作用、脂肪酸シグナルの癌幹細胞性との関連、脂肪酸シグナルを標的とする治療可能性の検討、について多角的に検討する。

## 4. 研究成果

C18:2 トランス型脂肪酸であるエライジン酸(EA)の大腸癌への影響を検討したところ、細胞培養ではEAは癌細胞の増殖・浸潤・生存を亢進させ、腹膜播種、肝転移、肺転移のいずれのマウス転移モデルにおいても、EA投与量依存性に転移の促進が各転移モデルにおいて認められた。長鎖脂肪酸の受容体とされるGタンパク共役受容体(GPCR)であるGPR40とGPR120を検討するとEA処理により両者ともmRNA増加が認められ、表面発現アッセイでレベルは低下しinternalizationが示唆された。EA処理により細胞膜にEAが取り込まれると同時に、コレステロール・ラフトの拡大が見られ、EGFRのリン酸化の増大が認められた。このリン酸化はGPCR依存性のc-SRCリン酸化を介しており、コレステロールの吸着により消失した。さらに、EGFR処理により、Wntシグナル活性化を介して幹細胞マーカーのnucleosteminの発現亢進が認められたが、ERK1/2の阻害によりその効果

は消失した。このように、ラフトを場とするEGFRのトランス活性化がEAによる幹細胞性の増大に關与することが示唆された。さらに、幹細胞性誘導シグナルを検討すると、canonicalあるいはnon-canonical Wnt系の活性とNotch抑制が見られた。

DNAアレイを用いた発現解析では、EAでは、HGF, insulin, EGFRなど増殖系の遺伝子発現が促進されるのに対し、-notch, hedgehog, retinoid receptorなど分化誘導関連遺伝子の発現低下が見られた。一方、LAでは、TGFの発現亢進、糖代謝関連遺伝子群の発現亢進が見られ、細胞周期関連遺伝子や増殖シグナル関連遺伝子の発現が低下していた。これに対して、インテグリン関連因子などアポトーシス抑制遺伝子の発現は両者で亢進していた。

脂肪酸が、がん幹細胞に影響をあたえることから、化学療法に対しても脂肪酸が何らかの影響を与えることが考えられたため検討を行った。

EAが5-FUの抗腫瘍効果に与える影響について検討したところ、マウス大腸癌細胞株CT26, CMT93およびマウス肺癌細胞株LL2について5-FU感受性を検討するとCMT93は低感受性を示した。IC50濃度の5-FU及びアポトーシス誘導濃度のEAを同時に処理するとCT26, CMT93, LL2における増殖抑制効果は各々1.0倍、1.2倍、1.1倍に増加した。このときの癌幹細胞性の変化をALDH活性により検討すると、CT26, LL2ではEAと5-FUの同時処理によりALDH活性が3.8倍に増加していたがCMT93では1.5倍であった。また、幹細胞マーカーであるnucleosteminの発現を検討すると、EA単独処理とEAと5-FUの同時処理では、CT26, LL2では発現は増加したが、CMT93では発現レベルはほとんど変化しなかった。以上のことから、EAは癌細胞の5-FU感受性に著変は与えず、むしろ癌幹細胞の残存を促進する可能性が示唆された。

一方、-6脂肪酸であるリノール酸(LA)は、癌細胞にアポトーシスを誘導し抗腫瘍効果を示すが、他方、非増殖性癌幹細胞を選別する可能性を有することを既に報告している。EAと同様にマウス癌細胞株3株について5-FU感受性を検討するとCMT93は低感受性を示した。IC50濃度の5-FU及びアポトーシス誘導濃度のLAを同時に処理するとCT26, CMT93, LL2における増殖抑制効果は各々2.5倍、1.4倍、2.6倍に増加した。このときの癌幹細胞性の変化をALDH活性により検討すると、いずれの細胞株でもLAと5-FUの同時処理によりALDH活性が1.7-3.2倍に増加していた。また、nucleostemin発現は、LA単独処理とLAと5-FUの同時処理では、発現レベルはほとんど変化が認められなかった。以上のことから、LAは癌細胞の5-FU感受性を亢進させるように見えるが、実際には癌幹細胞の残存を増加させる可能性が示唆された。

マイクロ RNA アレイを用いた発現解析では、EA では、発現亢進が 31 種で、発現低下が 3 種で見られた。一方、LA では、発現亢進が 13 種に見られ、発現低下を来したものは認められなかった。両者に共通して発現亢進が見られたものは 3 種であった。これらのマイクロ RNA に既にその機能が明らかにされているものはほとんど見られなかった。さらに、個々のマイクロ RNA について、その機能を検討し脂肪酸シグナルへの役割を検討した。脂肪酸によるマイクロ RNA 発現の変化を検討し癌幹細胞への影響を検討した。CT26 大腸癌細胞を LA またはエライジン酸 EA で処理しアレイにより検討し、両脂肪酸で発現亢進を示したもののうち miR-494 について検討を行った。両脂肪酸と miR-494 mimic または inhibitor を処理し、sphere assay により幹細胞性を検討した。Sphere density は LA, EA により増加したが、mimic 処理により強い増加が認められた。一方、inhibitor 処理により sphere density は低下し、LA, EA による density の増加も抑制された。Sphere assay による癌幹細胞マーカーの発現を検討すると、CD133 は LA と mimic で増加し、nucleostemin (NS) は EA と mimic で増加した。一方、inhibitor 処理により、両脂肪酸で CD133・NS の発現は消失した。さらに、miR-494 標的遺伝子候補で癌幹細胞分化に関係する PPAR coactivator 1A、PTEN、activin A receptor 1C、FGFR2 について mRNA 発現を検討すると FGFR2 以外では、EA, LA, mimic では発現低下が、inhibitor では発現亢進が認められた。このように、miR-494 は脂肪酸により発現が促進され、分化促進因子を抑制し癌幹細胞性の維持に参与することが示唆された。

## 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 34 件)

(1) Fujii K, Luo Y, Nishiguchi Y, Fujiwara R, Kishi S, He S, Yang S, Sasaki T, Ohmori H, Kuniyasu H. Pro-metastatic intracellular signaling of elaidic acid, a trans fatty acid. **Int J Oncol** 50: 85-92, 2017.

(2) Ohmori H, Fujii K, Kadochi Y, Mori S, Nishiguchi Y, Fujiwara R, Kishi S, Sasaki T, Kuniyasu H. Elaidic acid, a trans fatty acid, enhances the metastasis of colorectal cancer cells. **Pathobiol** 84(3):144-151, 2017.

(3) Tanabe E, Kitayoshi M, Fujii K, Ohmori H, Luo Y, Fujiwara R, Kadochi Y, Mori S, Kuniyasu H. Fatty acids inhibit anti-cancer effect of 5-fluorouracil in mouse cancer cell lines. **Oncol Lett** 14: 681-686, 2017.

(4) Mori S, Kadochi Y, Luo Y, Fujiwara-Tani R, Nishiguchi Y, Kishi S, Fujii K, Ohmori H, Kuniyasu H. Proton pump inhibitor induces-collagen expression in colonocytes is associated with collagenous colitis. **World J Gastroenterol** 23(9):1586-1593, 2017.

(5) Kadochi Y, Mori S, Fujiwara-Tani R, Luo Y, Nishiguchi Y, Kishi S, Fujii K, Ohmori H, Kuniyasu H. Remodeling of energy metabolism by a ketone body and medium-chain fatty acid suppressed proliferation of CT26 mouse colon cancer cells. **Oncol Lett** 14: 673-680, 2017.

(6) Kawahara I, Mori T, Goto K, Fujii K, Ohmori H, Fujiwara-Tani R, Kuniyasu H. Fatty acids induce stemness in the stromal cells of a CT26 mouse tumor model. **Pathobiol** in press, 2017.

(7) Obayashi M, Yoshida M, Tsunematsu T, Ogawa I, Sasahira T, Kuniyasu H, Imoto I, Abiko Y, Xu D, Fukunaga S, Tahara H, Kudo Y, Nagao T, Takata T. microRNA-203 suppresses invasion and Epithelial-mesenchymal Transition induction via targeting NUA1 in head and neck cancer. **Oncotarget** 7(7):8223-39, 2016.

(8) Sasahira T, Nishiguchi Y, Fujiwara R, Kurihara M, Bosserhoff AK, Kirita T, Kuniyasu H. Storkhead Box 2 and melanoma inhibitory activity promote oral squamous cell carcinoma progression. **Oncotarget** 7(18):26751-64, 2016.

(9) Sasahira T, Kirita T; Nishiguchi Y, Kurihara M, Nakashima C, Bosserhoff AK, Kuniyasu H. A comprehensive expression analysis of the MIA gene family in malignancies: MIA gene family members are novel, useful markers of esophageal, lung, and cervical squamous cell carcinoma. **Oncotarget** 7(21):31137-52, 2016.

(10) Sasahira T, Kurihara M, Nishiguchi Y, Fujiwara R, Kirita T; Kuniyasu H. NEDD 4 binding protein 2-like 1 promotes cancer cell invasion in oral squamous cell carcinoma. **Virchow Arch** 469(2):163-72, 2016.

(11) Sasahira T, Kurihara M, Nakashima C, Kirita T, Kuniyasu H. LEM domain containing 1 promotes oral squamous cell carcinoma invasion and endothelial transmigration. **Br J Cancer** 115(1):52-8, 2016.

(12) Hashimoto Y, Kawahigashi Y, Hata T, Li X, Watari A, Tada M, Ishii-Watabe A, Okada Y, Doi T, Fukasawa M, Kuniyasu H, Yagi K, Kondoh M. Efficacy and safety evaluation of claudin-4-targeted antitumor therapy using a human and mouse cross-reactive monoclonal antibody.

**Pharmacol Res Perspect** 4(5):e00266, 2016.

(13) Ohmori H, Luo Y, Fujii K, Sasaki T, Kuniyasu H. High motility group box 1 induces cancer aggressiveness and drug resistance. **Ann Clin Pathol** 3(1): 1042, 2015.

(14) Luo Y, Yoneda J, Sasaki T, Kawahara I, Goto K, Fujii K, Ohmori H, Kuniyasu H. Alteration of the plasma free amino acids profiles in cancer patients is associated with dysregulated metabolism in skeletal muscle. **Arch Cancer Res** 3(1):5, 2015

(15) Sasaki T, Yamashita Y, Kuniyasu H. AKT plays a crucial role in gastric cancer. **Oncol Lett** 10(2):607-611, 2015.

(16) Fukasawa M, Nagase S, Shirasago Y, Iida M, Yamashita M, Endo K, Yagi K, Suzuki T, Wakita T, Hanada K, Kuniyasu H, Kondoh M. Monoclonal antibodies against extracellular domains of claudin-1 block hepatitis C virus infection in a mouse model. **J Virol** 89(9):4866-4879, 2015.

(17) Goto K, Kawahara I, Kuniyasu H, Takaki M. A protein tyrosine kinase receptor, c-RET signaling pathway contributes to the enteric neurogenesis induced by a 5-HT4 receptor agonist at an anastomosis after transection of the gut in rodents. **J Physiol Sci** 65(4): 377-383, 2015.

(18) Luo Y, Tanabe E, Kitayoshi M, Nishiguchi Y, Fujiwara R, Matsushima S, Sasaki T, Sasahira T, Chihara Y, Fujii K, Ohmori H, Kuniyasu H. Expression of MAS1 in breast cancer. **Cancer Sci.** 106(9):1240-1248, 2015.

(19) Fujiwara R, Luo Y, Sasaki T, Fujii K, Ohmori H, Kuniyasu H. Cancer therapeutic effects of titanium dioxide nanoparticles are associated with oxidative stress and cytokine induction. **Pathobiol** 82:243-251, 2015.

(20) Kuwada M, Chihara Y, Luo Y, Li X, Nishiguchi Y, Fujiwara R, Sasaki T, Fujii K, Ohmori H, Fujimoto K, Kondoh M, Kuniyasu H. Pro-chemotherapeutic effects of antibody against extracellular domain of claudin-4 in bladder cancer. **Cancer Lett** 369(1):212-21, 2015.

(21) Goto K, Kawahara I, Inada H, Misawa H, Kuniyasu H, Nabekura J, Takaki M. Activation of 5-HT4-receptors facilitates neurogenesis from the transplanted neural stem cells in thick tissue at the anastomosis in murine ileum. **J Physiol Sci** 66(1):67-76, 2016

(22) Sasahira T, Kirita T, Kuniyasu H. Update of molecular pathobiology in oral cancer: a review. **Int J Clin Oncol** 19:431-436, 2014

(23) Sasaki T, Kuniyasu H. Significance of AKT in gastric cancer. **Int J Oncol** 45(6):2187-92, 2014.

(24) Sasaki T, Kuniyasu H, Luo Y, Kitayoshi M, Tanabe E, Kato D, Shinya S, Fujii K, Ohmori H, Yamashita Y. AKT activation and telomerase reverse transcriptase expression are concurrently associated with prognosis of gastric cancer. **Pathobiol** 81(1):36-41, 2014.

(25) Aoki K, Obata K, Kurihara M, Kuniyasu H, Kirita T, Takaki M. Clinically observed taste disorder-related peripheral mechanism in an anticancer drug, S-1 administered rats. **Int J Clin Oncol** 19(3):549-556, 2014.

(26) Luo Y, Yoneda J, Ohmori H, Sasaki T, Shimbo K, Eto S, Kato Y, Miyano H, Kobayashi T, Sasahira T, Chihara Y, Kuniyasu H. Cancer usurps skeletal muscle as an energy repository. **Cancer Res** 74:330-340, 2014.

(27) Sasahira T, Ueda N, Yamamoto K, Kurihara M, Matsushima S, Bhawal UK, Kirita T, Kuniyasu H. Prox1 and FOXC2 act as regulators of lymphangiogenesis and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. **PLoS ONE**9:e92534.

(28) Kuwada M, Chihara Y, Luo Y, Torimoto K, Kagebayashi Y, Tamura K, Shuin T, Fujimoto K, Kuniyasu H, Samma S. Novel missense mutation in the FH gene in familial renal cell cancer patients lacking cutaneous leiomyomas. **BMC Res Notes** 7:203, 2014.

(29) Zhou L, Luo Y, Sato S, Tanabe E, Kitayoshi M, Fujiwara R, Sasaki T, Fujii K, Ohmori H, Kuniyasu H. Role of two types of angiotensin II receptors in colorectal carcinoma progression. **Pathobiol** 81(4):169-175, 2014.

(30) Shinmei S, Sentani K, Hayashi T, Sakamoto N, Goto K, Teishima J, Matsubara A, Oue N, Kuniyasu H, Yasui W. Identification of PRL1 as a Novel Diagnostic and Therapeutic Target for Castration Resistant Prostate Cancer by the Escherichia Coli Ampicillin Secretion Trap (CAST) Method. **UOSO** 32(6):769-78, 2014.

(31) Sasaki T, Kuniyasu H, Luo Y, Fujiwara R, Kitayoshi M, Tanabe E, Kato D, Shinya S, Fujii K, Ohmori H, Yamashita Y. Serum CD10 is associated with liver metastasis in colorectal cancer. **J Surg Res** 192: 390-394, 2014.

(32) Sasahira T, Kirita T, Yamamoto K, Ueda N, Kurihara M, Matsushima S, Bhawal UK, Bosserhoff AK, Kuniyasu H. Transport and Golgi organisation protein 1 is a novel tumour progressive factor in oral squamous cell carcinoma. **Eur J Cancer** 50: 2142-2151, 2014.

(33) Sasahira T, Kurihara M, Yamamoto K, Matsushima S, Bhawal UK, Kirita T, Kuniyasu H. HuD promotes progression of oral squamous cell carcinoma. **Pathobiol** 81:206-214, 2014.

(34) Li X, Iida M, Tada M, Watari A, Kawahigashi Y, Kimura Y, Yamashita T, Ishii-Watabe A, Uno T, Fukasawa M, Kuniyasu H, Yagi Y, Kondoh M. Development of an anti-claudin-3 and -4 bispecific monoclonal antibody for cancer diagnosis and therapy. **J Pharmacol Exp Ther** 351(1):206-13, 2014.

#### 〔学会発表〕(計4件)

(1) Kuwada M, Chihara Y, Luo Y, Sasaki T, Fujimoto K, Kondoh M, Kuniyasu H. Pro-chemotherapeutic effects of antibody against extracellular domain of claudin-4 in bladder cancer. **Annual Meeting of American Association for Cancer Research 2016**, New Orleans, 2016.4.16-20.

(2) Ohmori H, Kuwai T, Kitadai Y, Fujii K, Fujiwara R, Nishiguchi Y, Sasahira T, Kuniyasu H. Protumoral role of trans fatty acid. **Annual Meeting of American Association for Cancer Research 2016**, New Orleans, 2016.4.16-20.

(3) Luo Y, Kitadai Y, Nishiguchi Y, Fujiwara R, Sasaki T, Ohmori H, Kuniyasu H. Expression of MAS1 in triple-negative breast cancer. **Annual Meeting of American Association for Cancer Research 2015**, Philadelphia, 2015.4.18-23

(4) Kuwada M, Chihara Y, Miyake M, Anai S, Tanaka N, Kuniyasu H, Fujimoto K. Cancer stem-like cells and epithelial mesenchymal transition is responsible for failure in bacillus Calmette-Guérin therapy for primary carcinoma in situ. **Annual Meeting of American Urology Association 2015**, New Orleans, 2015.5.15-19.

#### 〔図書〕(計7件)

(1) Kuniyasu H, Fujii K, Ohmori H, Fujiwara-Tani R, Luo Y, Sasaki T. Role of CD10 in the metastasis of colorectal cancer to the liver. **Current Research in Cancer** 10, p31-40, Research Media, Kerala, India, 2016.

(2) Fujiwara-Tani R, Ohmori H, Fujii K, Sasaki T, Luo Y, Kuniyasu H. Significance of

anti-CLDN4 extracellular domain antibody in cancer treatment. **Current Research in Cancer** 10, p41-51, Research Media, Kerala, India, 2016.

(3) Sasaki T, Kuniyasu H. Non-functional pancreatic neuroendocrine carcinoma. **Current Research in Cancer** 9, p31-40, Research Media, Kerala, India, 2015.

(4) Kuniyasu H, Ohmori H, Fujii K, Iwata N, Katsuragawa H, Fujiwara R, Sasaki T. Significance of trans fatty acids in colorectal cancer. **Current Research in Cancer** 9, p21-29, Research Media, Kerala, India, 2015.

(5) Kuniyasu H. Linoleic acid. **Encyclopedia of Cancer**, Springer-Verlag Berlin Heidelberg

(6) Sasaki T, Yamashita Y, Kuniyasu H. Significance of AKT in gastric cancer. **Current Research in Cancer** 8, p7-18, Research Media, Kerala, India, 2014.

(7) Kuniyasu H, Luo Y, Yoneda J, Sasaki T, Fujii K, Ohmori H. Significance and the cause of alteration of the plasma free amino acids profiles in cancer. **Current Research in Cancer** 8, p19-27, Research Media, Kerala, India, 2014.

#### 〔その他〕

#### ホームページ

HP : <http://www.naramed-u.ac.jp/~molepath/>

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

大森 斉 (OHMORI, Hitoshi)  
奈良県立医科大学・医学部・研究員  
研究者番号 : 80213875

##### (2)研究分担者

國安弘基 (KUNIYASU, Hiroki)  
奈良県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 00253055