

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460468

研究課題名(和文) リプログラミングによるがんの制御法の開発

研究課題名(英文) Controlling cancer development by reprogramming technique

研究代表者

堀井 明 (Horii, Akira)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40249983

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)：膵がん細胞株2種(PK-8とPK-9)、それぞれに由来するジェムシタビン(以下GEMと略記)耐性細胞株2種(RPK-8とRPK-9)を用い、レンチウイルスで山中4因子を導入し、リプログラミングを試みたが奏功しなかった。さらにTETを用いた方法を試みたが奏功しなかった。しかし、本研究過程で予想外の結果が得られた。RPK-9はGEMを活性化するDCKが薬剤耐性の原因であり、超高濃度のGEMでも耐性を呈するがRPK-8は超高濃度では死滅する。また、幹細胞マーカーと間葉系マーカーの発現亢進、並びに細胞遊走能の亢進が確認され、stemnessとEMTがGEM耐性に密接に関わることがうかがわれた。

研究成果の概要(英文)：Reprogramming mediated control of pancreatic cancer cell lines were attempted in this study. Four Yamanaka factors were introduced into pancreatic cancer cell lines PK-8 and PK-9 as well as their derived gemcitabine (GEM herein after) resistant cell lines RPK-8 and RPK-9. Lentivirus vector was first used but results were not successful. We next tried TET-vector but results were not successful. However, we observed some unexpected interesting findings. GEM resistance in RPK-9 is caused by homozygous deletion of DCK that is essential for activation of GEM. Hence, RPK-9 can survive under very high concentration of GEM. On the other hand, RPK-8 can survive under low concentration of GEM but cannot survive under very high concentration. Furthermore, upregulation of genes associated with stemness and EMT were evident in RPK-8. Cell motility was also upregulated. These results may suggest that stemness associated with EMT is playing an important role in acquisition of GEM in RPK-8.

研究分野：実験病理学

キーワード：膵がん がん幹細胞 リプログラミング 増殖抑制 EMT 薬剤耐性 細胞遊走能

1. 研究開始当初の背景

文献的に、血液腫瘍のみならず固形がんでも山中因子を導入することによりリプログラミングに成功した報告がみられる。固形腫瘍の例では、Miyoshi et al. Proc Natl Acad Sci 107, 40-45, 2010 などで報告されているように大腸癌細胞株などを用いておこなわれ、造腫瘍性が抑制されたと報告されている。しかし、膀胱癌細胞株での報告例はなく、膀胱癌切除例から試みられている (Terada N. personal communication)。将来の臨床応用を見据えた場合、ウイルスベクターを用いる方法はあまり好ましくないため、マイクロ RNA 導入などでも試みられ、リプログラミングに成功した報告もある。これに関しては、Nishikawa et al. Exp Ther Med 4, 8-14, 2012 などの Review もある。しかし、どのマイクロ RNA を用いればよいのかのコンセンサスはない。組織、細胞により異なる可能性も考えられる。

2. 研究の目的

がんの種類により予後は大きく異なる。中でも膀胱癌は極めて予後不良であり、その原因として、癌細胞が有する特性が大きく関与していると考えられる。昨今、がん細胞をリプログラミングさせることによりがんとしての悪性度を抑えることができた報告が散見される。その方法として、ウイルスベクターを用いた山中因子の導入によるものだけでなく、マイクロ RNA によりリプログラミングさせる技術も開発されている。マイクロ RNA でリプログラミングを行うことができれば、将来的には臨床応用の可能性が高まる。本研究は、膀胱癌を主要な標的として、マイクロ RNA を用いてリプログラミングさせることによるがん細胞の初期化より、がん患者の予後を改善させる方策を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

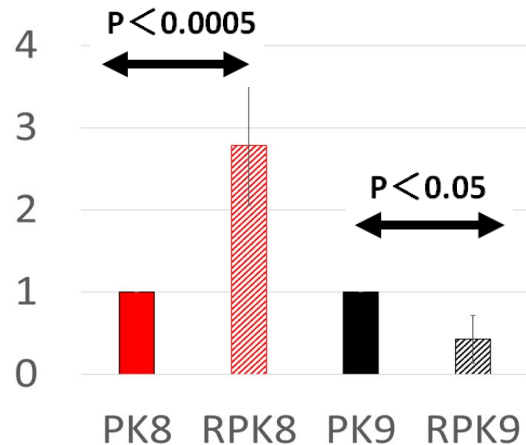
ウイルスベクターで山中 4 因子を膀胱癌細胞株 PK-8、PK-9、並びにこれらに由来するジェムシタピン (以下 GEM と略記) 耐性細胞株 RPK-8、RPK-9 に導入してリプログラミングを試み、さらに TET の遺伝子を用いた方法を試みる。また、この研究を進める過程で、興味深い事実が判明したので、さらに追究した。RPK-9 は GEM の細胞内での活性化に必須の *DCK* 遺伝子にホモ欠失があり、GEM を活性化できないために耐性を獲得していたため、超高濃度の GEM 存在下でも耐性を示すが、RPK-8 では *DCK* 遺伝子は正常で、100ng/ml 程度が限界であった。これらの細胞における初期化関連の遺伝子発現や EMT 関連の遺伝子発現、細胞遊走能などの検討を加えた。

4. 研究成果

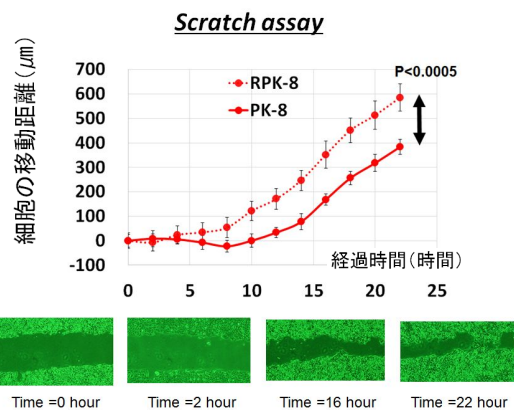
最初に、レンチウイルスベクターを用いて山中 4 因子を導入することでリプログラミングを試みたが奏功しなかった。そこで、近年開発された TET を組み合わせた方法も試みたが、有効なリプログラミングを誘導するこ

とはできなかった。

この研究を進める中で親株と耐性株で初期化関連遺伝子の発現を比較検討したところ、RPK-8 において特異的に発現が亢進している遺伝子が特定された。以下に結果の例を示すが、未発表データのため、遺伝子名は伏せる。



また、RPK-8 では EMT を想起させる遺伝子発現パターンが見られたため、細胞の motility の関係の検討を加えてみた。その結果、PK-9 と RPK-9 の間では違いが見られなかったが、PK-8 と RPK-8 の間では有意差をもって RPK-8 のほうが高い cell motility を呈した。なお、データは示していないが、細胞増殖のスピードは耐性獲得とともに遅くなった。逆に cell motility は高まったことは極めて興味深い。以下にスクラッチアッセイの結果を示す。



これらの結果から、RPK-8 は EMT とリンクした形での GEM 耐性が生じ、stemness と密接に関連した EMT が生じていることが推察された。これは、Zheng ら (Nature 527, 472-476, 2015)、並びに Fischer ら (Nature 527, 525-530, 2015) の報告と合致する。

なお、RPK-8 における GEM 耐性獲得が何らかの epigenetic なメカニズムである可能性が示唆されたため、さらなる耐性株樹立を試みたところ、新たな耐性株が樹立できた。*DCK*

は正常であり、メカニズム的には同様である可能性が考えられた。この可能性が正しいのであるなら、薬剤耐性獲得はどのような細胞にも生じ得る可能性が考えられる。したがって、抗癌剤治療を行う際に、十分な注意を払う必要があることを示唆している。

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 11 件)

Yamamura A, Miura K, Karasawa H, Motoi F, Mizuguchi Y, Saiki Y, Fukushima S, Sunamura M, Shibata C, Unno M, Horii A. *NDRG2*, suppressed expression associates with poor prognosis in pancreatic cancer, is hypermethylated in the second promoter in human gastrointestinal cancers. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 484, 2017, 138-143

DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.01.055

Wang R, Sumarpo A, Saiki Y, Chen N, Sunamura M, Horii A. ABCB1 is upregulated in acquisition of taxane resistance: Lessons from esophageal squamous cell carcinoma cell lines. *Tohoku J Exp Med*, 査読有, 240, 2016, 295-301

DOI: 10.1620/tjem.240.295

Mizuguchi Y, Saiki Y, Horii A, Fukushima S. Targeted TET oxidase activity through methyl-CpG-binding domain extensively suppresses cancer cell proliferation. *Cancer Med*, 査読有, 5, 2016, 2522-2533

DOI: 10.1002/cam4.830.

堀井明、膵癌におけるマイクロサテライト不安定性 (MSI) 解析、胆と膵、査読無、37、2016、803-806

Nakano T, Saiki Y, Kudo C, Hirayama A, Mizuguchi Y, Fujiwara S, Soga T, Sunamura M, Matsumura N, Motoi F, Unno M, Horii A. Acquisition of chemoresistance to gemcitabine is induced by a loss-of-function missense mutation of *DCK*. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 464, 2015, 1084-1089

DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.07.080

Fukushige S, Horii A. Technological advances in epigenomics lead to a better understanding of inflammatory diseases, decitabine and H3K27me3. *Epigenomics*, 査読有, 7, 2015, 133-136

DOI: 10.2217/epi.14.90

堀井明、膵癌、日本臨床、査読無、73, 2015, 445-448

Cucu D, Chiritoiu G, Petrescu S, Babes A, Stanica L, Duda DG, Horii A, Dima SO, Popescu I. Characterization of functional transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channels in human pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Pancreas*, 査読有, 43, 2014, 795-800

DOI: 10.1097/MPA.000000000000106

Kimura N, Takekoshi K, Horii A, Morimoto R, Imai T, Oki T, Saito T, Midorikawa S, Arai T, Sugisawa C, Yamada M, Otuka Y, Kurihara I, Sugano K, Nakane M, Fukuuchi A, Kitamoto T, Saitoh J, Nishikawa T, Naruse M. Clinicopathological study of *SDHB* mutation-related pheochromocytoma and sympathetic paraganglioma. *Endocr Relat Cancer*, 査読有, 21, 2014, L13-L16

DOI i: 10.1530/ERC-13-0530

Chen N, Sato D, Saiki Y, Sunamura M, Fukushima S, Horii A. S100A4 is frequently overexpressed in lung cancer cells and promotes cell growth and cell motility. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 447, 2014, 459-464

DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.04.025

Fukushige S, Horii A. Research Highlights: Highlights from the latest articles in epigenomics. *Epigenomics*, 査読有, 6, 2014, 171-173

DOI: 10.2217/epi.14.2

〔学会発表〕(計 17 件)

福重真一、カンチャン・チャクマ、元井冬彦、海野倫明、堀井明、*IRX4* 遺伝子の高度メチル化は膵癌に高頻度で発生し増殖優位性を与える、日本癌学会学術総会 2016.10.6-8 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

齋木由利子、蒔田真基、新井一守、桜田晃、岡田克典、堀井明、Upregulation of S100A10 is associated with poor prognosis in lung adenocarcinoma、日本癌学会学術総会、2016.10.6-8 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

Saiki Y, Nakano T, Hirayama A, Soga T, Sunamura M, Motoi F, Unno M, Horii A. Functional inactivation of DCK plays an important role for acquisition of gemcitabine resistance、日本病理学会総会、2016.5.12-14、仙台国際センター (宮城県・仙台市)

Makita M, Saiki Y, Arai K, Sakurada A, Okada Y, Horii A. Upregulation of S100A10 is associated with poor prognosis in lung cancer、日本病理学会総会、2016.5.12-14、仙台国際センター (宮城県・仙台市)

Fukushige S, Mizuguchi Y, Chakma K, Saiki Y, Horii A. Targeted TET oxidase activity through methyl-CpG binding domain extensively suppresses cancer cell proliferation, AACR Annual Meeting 2016, 2016. 4. 16-20, New Orleans, USA

Fukushige S, Mizuguchi Y, Chakma K, Saiki Y, Horii A. Targeted TET oxidase activity through methyl-CpG binding domain extensively suppresses cancer cell proliferation, International Congress of Human Genetics, 2016. 4. 3-7, Kyoto International Conference Center (京都府・京都市)

Saiki Y, Nakano T, Hirayama A, Soga T, Sunamura M, Motoi F, Unno M, Horii A. Functional inactivation of DCK plays an important role for acquisition of gemcitabine resistance. 10th AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics. 2016.2.16-20, Maui, USA

Miyauchi T, Horii A, Fukushima S, Methyl-CpG targeted transcriptional activation (MeTA) induces apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells by reactivating hypermethylated genes. 10th AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics. 2016.2.16-20, Maui, USA

Makita M, Saiki Y, Sakurada A, Okada Y, Horii A. Upregulation of S100A10 is associated with poor prognosis in lung cancer. 10th AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics. 2016.2.16-20, Maui, USA

福重真一、宮内隼弥、堀井明、DNMT-independent reactivation of hypermethylated genes induces growth suppression and apoptosis in LNCaP cells、第74回日本癌学会学術総会、2015.10.8-10 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

齋木由利子、石沢興太、砂村真琴、堀井明、ABCB1 in side populations is a key ABC transporter essential for taxane-chemoresistance in esophageal cancer cells、第74回日本癌学会学術総会、2015.10.8-10 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

石沢興太、Erin Stewart、Celine Mascaux、坂下信吾、Jenna Sykes、Ghassan Allo、Chang-Qi Zhu、Ming Li、Melania Pintilie、Igor Jurisica、Benjamin G. Neel、堀井明、Ming-Sound Tsao、Clinical utility of patient derived xenografts to map resistance pathways in EGFR-mutant lung adenocarcinoma、第74回日本癌学会学術総会、2015.10.8-10 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

Horii A, Saiki Yuriko, Nakano T, Kudo C, Sunamura M. Human cancer cells acquire chemoresistance to gemcitabine mainly through loss-of-function mutations in the *DCK* gene, AACR Annual Meeting 2015、2015.4.18-22、Philadelphia, USA

Horii A, Chen N, Sekine H, Tsukamoto N, Tabata T, Saiki Y, Fukushima S, Sunamura M. Molecular characterization of oncogenic properties of S100A4 in pancreatic and lung cancers, and identification of *PRDM2* and *IFI27* as the candidate downstream genes. American Society of Human Genetics, 2014.10.18-22, San Diego, USA

Chen N, Saiki Y, Sunamura M, Fukushima S, Horii A. S100A4 is frequently overexpressed in lung cancer cells and promotes cell motility. 第

73 回日本癌学会学術総会、2014.9.25-27、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Saiki Y, Hirayama A, Sugimoto M, Soga T, Sunamura M, Motoi F, Unno M, Horii A. Acquisition of chemoresistance to gemcitabine was caused by a loss-of-function missense mutation in deoxycytidine kinase gene in a human gastric cancer cell line. 第73回日本癌学会学術総会、2014.9.25-27、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Fukushima S, Saiki Y, Horii A. Methyl-CpG targeted DNA demethylation by TET hydroxylase activity suppresses the growth of cancer cells. 第73回日本癌学会学術総会、2014.9.25-27、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

〔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

<http://www.molpath.med.tohoku.ac.jp/>
<http://www.med.tohoku.ac.jp/about/laboratory/181.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀井 明 (HORII, AKIRA)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：40249983

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：

(4)研究協力者
なし ()