

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640076

研究課題名(和文) 卵巣癌における「癌幹細胞化」機構の解明

研究課題名(英文) The mechanism of "alteration to a cancer stem cell" in ovarian cancer

研究代表者

越山 雅文 (Koshiyama, Masafumi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：50724390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣癌が比較的容易に治療抵抗性(化学療法耐性、少ない細胞数からの腫瘍形成能力)を獲得するのは、何らかの遺伝子発現低下が起因ではないかと仮定し、ほぼ全ゲノムを対象としたスクリーニングを行った。その結果、たった一つの遺伝子発現低下が卵巣癌の治療抵抗性獲得を起こす事を見いだした。しかもそのような遺伝子が、少なくとも6つあることも分かった。この6因子の発現低下から生じる治療抵抗性獲得には、ヘッジホッグ経路が関わる事も分かり、その阻害剤の投与で、獲得された治療抵抗性が減弱する事も分かった。これにより、難治性卵巣癌に対する新たな治療選択を探索する道が開けると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Ovarian cancer frequently acquires malignant phenotypes, such as chemo-resistance and tumorigenicity. We hypothesized that suppression of a gene's expression might cause such an acquisition. We performed a functional genomics screen using a shRNA library targeting almost all genes. As a result, we found that suppression of only a single gene's expression caused the acquisition of malignant phenotypes of ovarian cancer. In addition, we identified at least 6 such kinds of genes. Furthermore, suppression of those 6 genes enhanced malignant phenotypes of ovarian cancer via activation of the Hedgehog pathway. When we inhibited its pathway by a specific inhibitor, cyclopamine, it markedly decreased the malignant phenotypes which had been enhanced by suppression of each of 6 genes. Our findings should be helpful for developing the new treatment for refractory ovarian cancer.

研究分野：癌治療

キーワード：癌幹細胞 化学療法耐性 ヘッジホッグ経路 治療抵抗性獲得 卵巣癌

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は婦人科悪性腫瘍の中で最も予後が不良である。その中でも多数を占める卵巣高悪性度漿液性腺癌は、治療の過程で容易に治療抵抗性、すなわち化学療法耐性やより少ない細胞数での腫瘍増性能の獲得を起こす事が知られている。

これまでの、卵巣癌の遺伝子変化を網羅的に調べた報告の中で、卵巣癌ではコピー数の変化が非常に頻りに生じており、それによる何らかの遺伝子発現低下が多くの症例で起きている事が分かってきた。それほど頻りに生じる何らかの発現低下が、漿液性腺癌特有の、容易に悪性性質を獲得する事と繋がっている可能性がある。治療抵抗性獲得メカニズムの解明は、難治性卵巣癌に対する新たな治療法の探索に直結し、予後の改善に大きく寄与すると考える。

2. 研究の目的

卵巣高悪性度漿液性腺癌の、治療抵抗性獲得に関わる機序の探索を目的とした。

悪性度の高い細胞集団のマーカーとして、我々は Hoechst 色素の排泄能が亢進していることが知られている side population; SP 分画を用いた。卵巣癌にも SP 分画が存在し、予後不良因子である事が知られている。

3. 研究の方法

(1) SP 分画を指標とした、shRNA ライブラリーを用いたスクリーニング

我々はより悪性度の高い分画の指標として、Hoechst の排泄能から規定される SP 分画を用いた。SP 解析は Hoechst33342 染色と BD 社の FACS AriaII system を用いて施行した。卵巣漿液性腺癌の細胞株 20 種類について、その SP 分画の有無について調べ、SP 分画をほとんど持たない CH1 と SKOV3 をスクリーニングに用いる事とした。

1 次スクリーニング

Celllecta 社より無償提供された、81000 個の shRNA プラスミド (その標的遺伝子は 15000 個) からなる shRNA ライブラリーを使用した。CH1, SKOV3 にそれぞれライブラリーを導入し、SP 解析を施行した。ライブラリーは Multiplicity of infection; MOI が 0.3 以上になる条件を設定して導入した。同定した SP 細胞を single cell sort して、すべて独立して培養した。その後それらの DNA を抽出し、それらに組み込まれている shRNA プラスミドの anti-sense 配列を、サブクローニングにて同定した。また の 2 次スクリーニングに使用するため、サブクローニングと同時に、組み込まれていた shRNA プラスミドを再構築した。

2 次クスクリーニング

で再構築した shRNA プラスミドを一つずつ、それぞれ CH1 もしくは SKOV3 に導入し、SP 分画が増加するかどうか調べた。

さらに、そのプラスミドの標的遺伝子発現が確かに抑制されているか、qPCR にて調べた。

off target 効果の排除

で同定できた shRNA プラスミドとその標的遺伝子について、off target effect の排除を検討した。標的遺伝子についての異なる anti-sense 配列を持つ、別の shRNA プラスミドを複数導入し、発現の低下と SP 分画増加の再現性が得られるか、検討を行った。

(2) 生じた SP 分画の機能評価

SP 分画は、化学療法耐性能力の他、腫瘍形成能力等の Cancer stem cell; CSC 様の機能を有すると言われている。そこで、今回生じた SP 細胞についても、CSC 様機能があるか検討した。

sphere formation 能力

細胞を 2000 個/well of 24well で、ultra low attachment dish に播種し、2 週間後の sphere 形成を評価した。培地は Serum free の stem cell 用特殊培地を使用した。

single cell clonogenicity

細胞を 1 個/well of 96well で播種し、クローンが増殖する割合を調べた。

In vivo tumorigenicity

Limited dilution 法を用いて腫瘍を形成する細胞数を評価した。メスの NOD-SCID マウスに細胞を皮下接種して、腫瘍形成能力を調べた。

化学療法感受性

Cisplatin, Doxil, Gemcitabine, Paclitaxel の 4 剤に関して調べた。

72 時間これらの薬剤に様々な濃度で暴露させ、Dose-response curve を作成して IC50 を計算し、それを指標として化学療法感受性の変化を調べた。

(3) 過剰発現による変化

今回は、発現低下を契機として、SP 分画が増加する因子を探索している。そこで、過剰発現させた場合に逆の効果、すなわち、SP 分画の減少などが起きるか検証した。

卵巣漿液性腺癌細胞株の中で、A2780, IGROV1 には SP 分画がいくらか含まれている事が、preliminary 実験で分かっている。これらが、今回同定した因子の過剰発現で変化するか、検討した。過剰発現は、該当遺伝子の open reading frame を組み込まれたレンチウイルスベクターを用いて細胞に導入し、stable 発現亢進株を作成する事で行った。発現は qPCR にて確認した。さらにその他の CSC 様性質についても変化するか、検討を加えた。

(4) 発現低下が制御するメカニズムの解明

同定した因子の発現が、何を介して SP 分画の上昇に寄与しているのか探索した。SP に関わり、また脱分化にも関わると報告されている pathway として transforming growth factor (TGF) beta pathway, beta catenine pathway, Hedgehog pathway が知られている。

そこで、これら3つの pathway が変化しているか検討することとした。

TGF beta pathway

転写因子である smad3C のリン酸化を western blotting にて評価した。

Beta-catenine pathway

Beta-catenine の核内蓄積を、western blotting にて評価した。

Hedgehog pathway

GLI binding activity について、GLI 認識コンセンサス配列を用いた Dual reporter assay にて評価した

(5) 阻害剤による変化

(4) で変化が起きている pathway が見つかった場合、その阻害剤を使用して、SP の増加や CSC 性質の獲得といった変化が阻害されるか、検討を行った。

4. 研究成果

(1) Side population (SP) 分画を指標とした、shRNA ライブラリーを用いたスクリーニング

1次スクリーニング

shRNA ライブラリーを MOI が少なくとも 0.3 以上となる条件で CH1 に導入し、 3.0×10^7 個のライブラリー導入 CH1 細胞を用いて SP 解析を施行した。確認できた SP 細胞をシングルセルソートして subculture を行い、クローンを作成した。86 クローンを作成する事ができた。それらの DNA を抽出してサブクローニング & shRNA プラスミドの再構築を行った。最終的に、94 種類の shRNA プラスミド同定・再構築を行う事ができた。

同様に、SKOV3 を用いてスクリーニングを行った。やはり MOI が 0.3 以上となるよう shRNA ライブラリーを導入し、 1.5×10^7 個のライブラリー導入 SKOV3 細胞を用いて SP 解析を施行した。確認できた SP 細胞をシングルセルソートし、97 個のクローンを得る事ができた。それらに含まれる shRNA プラスミドを同定・再構築を行い、115 種類の shRNA プラスミドを同定・再構築する事ができた。

2次スクリーニング

1次スクリーニングで同定・再構築できた shRNA プラスミドを1つずつ導入して、再現性をみた。

まず CH1 細胞について、96 種類の shRNA プラスミドを一つずつ導入して SP 解析を行った。その結果、32 種類の shRNA プラスミドが、その導入により CH1 の SP 分画が著しく上昇することが分かった。それらの標的遺伝子の発現が抑制されているか qPCR で評価したところ、9 つの shRNA が、その標的遺伝子発現を大きく抑制している事が分かった。

同様に SKOV3 についても行った。115 種類の shRNA プラスミドを一つずつ導入したところ、36 種類の shRNA プラスミドの導入により SP 分画が著しく上昇する事が分かった。それらの標的遺伝子の発現が抑制されているか qPCR で評価したところ、21 種類の shRNA プ

ラスミドは、確かにその標的遺伝子発現を大きく低下させている事が分かった。

off target 効果の排除

2次スクリーニングで同定した、CH1;9 遺伝子、SKOV3;21 遺伝子について、off target effect でないかどうか検証した。これらについて、異なる anti-sense 配列を持つ複数の shRNA プラスミドを導入し、遺伝子発現低下と SP 分画上昇の再現性が見られるか検証した。

その結果、CH1 に関しては、*MSL3*, *ZNF691*, *VPS45* の遺伝子発現低下が、再現性を持って SP 分画を著しく増加させる事を見いだした。また SKOV3 に関しては、*ITGB3BP*, *TLE2*, *ZSCAN25* の発現低下が、SP 分画を著しく増加させる事を見いだした。

以上より、shRNA ライブラリーを用いた機能的ゲノミクススクリーニングにより、その発現低下が SP を著しく上昇させる 6 遺伝子；*MSL3*, *ZNF691*, *VPS45*, *ITGB3BP*, *TLE2*, *ZSCAN25* を同定する事ができた。

(2) 生じた SP 分画の機能評価

SP 分画は CSC 様の機能を備える事もある、という既報が複数あるため、今回(1)で同定した6因子の発現低下により新たに生じた SP 分画に、CSC 様機能があるか検討した。

Sphere formation assay

SP 細胞と main population (MP) 細胞との間で、sphere formation ability を評価した。その結果、CH1 の 3 因子により生じた SP 分画はそれぞれ、MP 細胞と比して、明らかに高い sphere formation 能力を備える事が分かった(全て $p < 0.05$)。

SKOV3 についても同様に検討し、同定した3因子発現低下により生じた SP 細胞と MP 細胞で sphere formation 能力を調べたところ、SP 分画が明らかに高い sphere formation ability を備えていた(全て $p < 0.05$)。

Single cell clonogenicity

CH1, SKOV3 それぞれの 3 因子発現低下で生じた SP 細胞は、MP 細胞と比して明らかに高い single cell clonogenicity を備えていた($p < 0.05$)。

In vivo tumorigenicity

CH1, SKOV3 それぞれの 3 因子発現低下で生じた SP 細胞と MP 細胞で、in vivo tumorigenicity を評価した。CH1 について、特に *ZNF691*, *VPS45* の発現低下で生じた SP 細胞は、MP 細胞と比して明らかに高い in vivo tumorigenicity を持っていた($p < 0.05$)。SKOV3 について、その 3 因子の発現低下で生じた SP 細胞は、MP 細胞と比して明らかに高い in vivo tumorigenicity を有していた($p < 0.05$)。

以上より、6 因子の発現低下で生じた SP 細胞は、高い in vivo tumorigenicity を備える事が分かった。

Chemosensitivity

6 因子の発現低下による 72 時間 IC50 値の変化を調べた。その結果、CH1 の 3 因子発現低下により、Cisplatin に対する抵抗性が明らかに増加していた ($p < 0.05$)。paclitaxel による抵抗性については、ZNF691, VPS45 の発現低下によって明らかに増加していた ($p < 0.05$)。SKOV3 に関しては、ITGB3BP, TLE2 の発現低下により Cisplatin, Paclitaxel に対する抵抗性が明らかに増加し ($p < 0.05$)、ZSCAN25 の発現低下では Gemcitabine, Doxil に対する抵抗性が明らかに増加した ($p < 0.05$)。以上より、6 因子の発現低下は、複数の化学療法に対する抵抗性獲得に寄与する事が分かった。

(3) 過剰発現による変化

A2780, IGROV1 に先に同定した 6 因子の過剰発現を試みたところ、A2780 については MSL3, VPS45, ITGB3BP, TLE2 の過剰発現株を作成でき、IGROV1 については VPS45, ITGB3BP, TLE2, ZSCAN25 の過剰発現株を作成できた。それぞれの過剰発現株について、機能解析を行った。

SP 解析

全ての過剰発現株において、コントロールと比して明らかに SP 分画は低下した ($p < 0.0001$)。

Sphere formation assay

A2780 について、過剰発現株はコントロールと比して明らかに sphere formation ability が低下していた ($p < 0.001$)。IGROV1 については、TLE2, ZSCAN25 の過剰発現で明らかに sphere formation ability が低下していた ($p < 0.05$)。

Single cell clonogenicity

A2780 について、VPS45, ITGB3BP, TLE2 の過剰発現株は、コントロールと比して明らかに single cell clonogenicity が低下していた ($p < 0.001$)。IGROV1 については、VPS45, TLE2, ZSCAN25 の過剰発現で明らかに single cell clonogenicity が低下していた ($p < 0.05$)。

In vivo tumor proliferation

A2780 について、コントロール株と過剰発現株を Foxn1-nu/nu マウスに皮下接種し、in vivo 腫瘍増殖能力を比較した。その結果、コントロールと比して VPS45, ITGB3BP, TLE2 過剰発現株は明らかに in vivo 腫瘍増殖能力の低下が見られた ($p < 0.05$)。IGROV1 に関して、コントロール株と ZSCAN25 過剰発現株を NOD-SCID マウスに皮下接種して in vivo 腫瘍増殖能力を比較したところ、コントロールと比して明らかに低下していた ($p < 0.05$)。

以上より、ZNF691 を除く 5 因子の過剰発現により、SP 分画の低下に加えて sphere formation, single cell clonogenicity, in vivo 腫瘍形成能などの、複数の CSC 様機能が減弱する事が分かった。

(4) 発現低下が制御するメカニズムの解明

TGF beta pathway

転写因子である smad3C のリン酸化を評価したところ、SKOV3 の 3 因子発現低下により、phospho-smad3C が明らかに上昇していた ($p < 0.05$)。

Beta-catenine pathway

Beta-catenine の核内蓄積を評価したところ、CH1, SKOV3 それぞれの 3 因子発現低下株において、コントロール株と比して核内蓄積の増加は見られなかった。

Hedgehog pathway

GLI binding activity をレポーターアッセイによって評価したところ、CH1, SKOV3 それぞれの 3 因子発現低下によって、明らかに GLI-binding activity が増加していた ($p < 0.05$)。また A2780, IGROV1 の過剰発現株において、コントロールと比して binding activity は明らかに低下していた ($p < 0.05$)。

以上より、6 因子の発現は Hedgehog pathway を制御して SP 分画の増加/低下を起こしている可能性が示唆された。加えて ITGB3BP, TLE2, ZSCAN25 の発現低下は TGF beta pathway の制御を介して SP 分画の増加/低下を起こしている可能性も示唆された。

(5) 阻害剤による変化

SKOV3 について、3 因子の発現低下株に TGF beta 阻害剤の A83-01 を添加し、Smad3C のリン酸化の低下を確認した上で、SP 解析を行った。その結果、SP 分画に変化を認めなかった。3 因子の発現低下で SKOV3 の TGF beta pathway が活性化しているが、それと SP 分画の制御に明らかな関連が無いと考えられた。

次に CH1 の 3 因子、SKOV3 の 3 因子発現抑制株に、Hedgehog pathway 阻害剤のシクロパミンを添加し、GLI-binding activity が下がる事を確認した上で、SP 解析を施行した。その結果、CH1, SKOV3 で生じた SP 分画が、明らかに低下した ($p < 0.001$)。また sphere formation についても、明らかに低下した ($p < 0.001$)。

以上より、6 因子の発現は、Hedgehog pathway を活性化/不活化を介して、SP 分画の増加/減少を制御している可能性が高い事が示唆された。

以上の結果より、機能的ゲノミクススクリーニングから、卵巣高悪性漿液性腺癌は、わずか一つの遺伝子発現低下を契機として治療抵抗能力を獲得しうる事を、世界で初めて見いだすことができた。またそのような遺伝子が、少なくとも 6 つ有り得る事も見いだした。それらの発現は hedgehog pathway の制御を介して治療抵抗能力に寄与している可能性がある。そしてその阻害剤であるシクロパミンが、獲得された治療抵抗能力に対する治療薬になる可能性がある。

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 0 件)

発表論文は現在のところない。投稿準備中である。

〔学会発表〕(計 4 件)

Noriomi Matsumura, Koji Yamanoi, Masafumi Koshiyama, et al. American Association for Cancer Research, Advances in Ovarian cancer Research, Oct 17-20, 2015. Orlando, USA.

Koji Yamanoi, Noriomi Matsumura, Masafumi Koshiyama, et al. Asian Society of Gynecologic Oncology, the 4th Biennial Meeting, Nov 12-14, 2015. Seoul, Korea.

山ノ井康二、松村謙臣、越山雅文、他
第4回婦人科がんバイオマーカー研究会、2月27日、2016年、岐阜
2016日本産科婦人科学会

山ノ井康二、松村謙臣、越山雅文、他
第68回日本産科婦人科学会学術講演会、4月21-24日、2016年、東京

〔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

越山 雅文(KOSHIYAMA, MASAFUMI)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号：50724390

(2)研究分担者

松村 謙臣(MATSUMURA, NORIOMI)
京都大学・医学研究科・準教授
研究者番号：20452336

馬場 長(BABA, TSUKASA)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号：60508240

小西 郁生(KONISHI, IKUO)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：90192062