

がん幹細胞の分裂制御機構の解明

[1] 組織

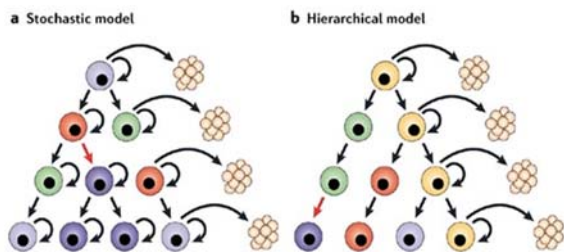
代表者：薛 香淑
 (Asan Medical Center)
 対応者：田中 耕三
 (東北大学加齢医学研究所)
 分担者：
 Se Jin Jan (Asan Medical Center)
 家村 颯自 (東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費30万円

[2] 研究経過

研究目的

がん幹細胞は既存の幹細胞に様々な要因で突然変異などの遺伝的変化が生じることによって発生し、その他大多数のがん細胞と異なり無限の増殖能をもつ細胞である (図1)。



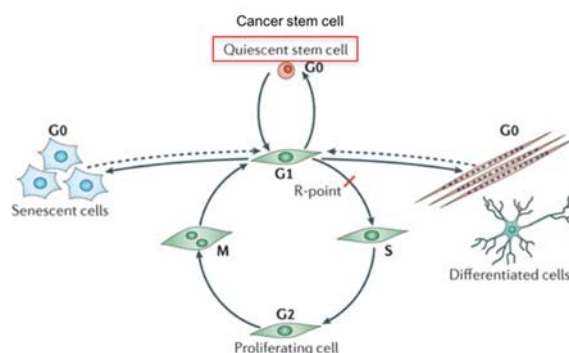
Nature Reviews Cancer 6.

図1. 腫瘍発生と形成

がん幹細胞は他のがん細胞に比べてより強い自己保護機構をもっており、既存の抗がん剤に対して抵抗性を示すことが多い。そのため体内のがん組織を手術や抗がん剤などで大部分除去できたとしても、がん幹細胞が生き残ることにより再発につながると考えられている。そこでがん幹細胞に対して有効な遺伝子治療や分子標的治療の開発が進められているが、その効果は未だに明確ではない。例えばがん幹細胞に特異的なマーカーを標的とした様々な治療法の研究が進行中であるが、同じ腫瘍でも種々のがん

幹細胞マーカーが存在するなどの困難が積みまわっている。

本研究ではがん幹細胞の性質を十分に理解し、これを除去する方法としてがん幹細胞を分化させて抗がん剤に対して感受性にするを目的として、がん幹細胞の分化に関与する因子の究明やその機能解析を目指す (図2)。



Nature Reviews Molecular Cell Biology 14

図2. 幹細胞停止の分子的な制御。

研究概要

1. がん幹細胞の培養および分離

特定がん幹細胞マーカーまたは低密着細胞 Dish を利用して、がん幹細胞と非がん幹細胞を分離する。分離したがん幹細胞と非がん幹細胞の増殖過程に関わる特異的な遺伝子群について、加齢医学研究所分子腫瘍学研究分野の蛍光顕微鏡あるいは共通機器管理室の共焦点顕微鏡で観察する。

2. がん幹細胞と非がん幹細胞において細胞分裂や分化に関わる遺伝子の発現比較

がん幹細胞において増加または低下する細胞分裂関連遺伝子をマイクロアレイ解析により同定する。同定された遺伝子産物を発現抑制あるいは過剰発現させた場合のがん幹細胞の増殖過程を観察し、増殖や分化に関与する因子を同定する。

以下、研究活動状況の概要を記す。

代表者の薛は、対応者の田中および分担者の家村と、メール会議によって研究の打ち合わせを行った。

その後薛は、打ち合わせの内容をふまえて、がん幹細胞に特徴的に見られる遺伝子発現の変化の解析を行った。一方田中と家村は、がん幹細胞の生細胞観察による解析を行った。薛は9月28日から30日まで来日し、田中とこれまでの成果を検討すると共に、今後の方針について議論した。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

1. ヒト肝臓がん細胞株 (Hep3B) の非がん幹細胞とがん幹細胞を sphere assay によって分離し、両細胞群において、mRNA array 分析を行った。具体的には、一般細胞 dish に培養したものを非がん幹細胞 (2D) とし、また、低密着 dish に培養し、sphere を形成した細胞 (S) をがん幹細胞とした。分析結果から、がん幹細胞で有意に低下している遺伝子のうち、細胞周期に影響する遺伝子を同定した。これらの遺伝子は、細胞周期の G0 期から G1 期への移行に関与することが知られている遺伝子であり、がん幹細胞の性質に重要であることが示唆された。
2. これらの遺伝子のうち、G0 期から G1 期への移行に重要な因子として、CDK6 に着目した。mRNA array 分析の結果に基づいて、Hep3B, HepG2, Huh7 といった肝臓がん細胞株における発現を q-RT-PCR で検定した。非がん幹細胞とがん幹細胞での比較を行ったところ、CDK6 の発現は肝臓がん幹細胞で低くなっていることが確かめられた。またウェスタンブロットティングによる検討で、この遺伝子産物の発現低下がタンパク質レベルでも確認された。また、database 解析により、CDK6 の promoter region に stemness factor の一つである SOX2 結合部位が存在していることが判明した。SOX2 結合による CDK6 の発現変動を調べるために、Promoter activity assay と ChIP を行ったところ、SOX2 の結合により CDK6 promoter activity が低下することが分かった。

3. CDK6 を過剰発現させた細胞株を利用し、がん幹細胞への影響を調べたところ、過剰発現した細胞において、Sphere formation の能力が低下するとともに、G0 期の細胞の減少および G1 期の細胞の増加が見られることが分かった。さらに細胞周期に関わる遺伝子のタンパク質レベルを分析したところ、CDK6 の過剰発現により、細胞周期の進行に関わる遺伝子 (Cyclin A, B, E) の発現が増加することがわかった。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究によって、がん幹細胞に特徴的に見られる遺伝子発現の変化が明らかになり、その中でがん幹細胞を休止期にとどめておく機構に関連するものとして CDK6 が見出された。がん幹細胞は SOX2 によって CDK6 の発現を抑え、これにより G0 期にとどまっているものと考えられた。がん幹細胞で CDK6 を過剰発現させると、細胞周期進行に関与するサイクリン遺伝子の発現が増加し、G0 期の細胞の減少・G1 期の細胞の増加が見られた。このことは、休止期にとどまっているがん幹細胞を、活発に細胞分裂を行うがん細胞へと変換させ、抗がん剤または放射線が効きやすくすることができる可能性を示唆しており、がん幹細胞を標的としたがん治療へと発展することが期待される。今後さらに、マウスモデルによる腫瘍形成能の分析などを行っていく予定である。

[4] 成果資料

- (1) Seol HS, Lee SE et al., Complement proteins C7 and CFH control the stemness of liver cancer cells via LSF-1. *Cancer Lett* (2016) 372(1).
- (2) Seol HS, Lee SE et al., Glutamate release inhibitor, Riluzole, inhibited proliferation of human hepatocellular carcinoma cells by elevated ROS production. *Cancer Lett* (2016) 382(2).
- (3) Tanaka, K, and Hirota, T. Chromosomal Instability: A common feature and a therapeutic target of cancer. *Biochim Biophys Acta* (2016) 1866, 64-75.