

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月24日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011-2012

課題番号：23701048

研究課題名（和文） 癌進展過程における癌幹細胞様細胞の出現を p R b が抑制する

研究課題名（英文） Undifferentiated state induced by Rb inactivation associated with activation of inflammatory signaling

研究代表者

北嶋 俊輔 (KITAJIMA SHUNSUKE)

金沢大学・がん進展制御研究所・博士研究員

研究者番号：90566465

研究成果の概要（和文）：がん抑制遺伝子 Rb の不活性化は、がんの悪性進展過程において頻繁に観察される。これまでに私達は、p53 が欠損したがん細胞において、Rb の不活性化により、がん幹細胞様細胞が出現することを明らかにした。RNA sequence により遺伝子発現を解析した結果、Rb 不活性化により誘導されるがん幹細胞様細胞群では炎症性サイトカインの発現が亢進していることが明らかになった。さらに遺伝子ノックダウン実験から、これら炎症性サイトカインの分泌さらにその下流の STAT3 活性化が、Rb 不活性化によるがん幹細胞様細胞の誘導と炎症性がん微小環境の形成に寄与することが明らかになった。これは、Rb 不活性化が、がん細胞の幹細胞性獲得という Cell autonomous な作用のみならず、Non-cell autonomous な作用を介して、がんの悪性を促進することを意味する。

研究成果の概要（英文）：Inactivation of Rb is frequently found during tumor progression. We found that Rb inactivation in p53 null background contributes to the acquisition of cancer stemness. RNA sequence analysis revealed that these cells exhibited signatures of inflammatory conditions. Knockdown experiments showed that sphere-forming activity induced by Rb depletion depend on activation of IL6-STAT3 axis. Moreover, it seems that activation of STAT3 pathway induced by Rb inactivation directly cause an inflammatory tumor environment. These results are expected to provide some new insights into cell autonomous and non-cell autonomous function of Rb during tumor progression.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|-----------|-----------|
| 交付決定額 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：腫瘍分子生物学

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：Rb, p53, Cancer stem cell, Inflammation

1. 研究開始当初の背景

がんは、昭和56年に日本における死因の第1位となって以降、現在では国民の約3人に1人ががんで命を奪われている。診断治療技術が格段に進歩しつつある今日でも、がんによる死者数は、減少どころか、数年後には2人に1人ががんで亡くなるとも予測され

ており、その最大の原因は、いまだがんの再発・転移・薬剤耐性の制御が実現されないことにある。盛んに増殖するがん細胞集団を主要な標的とし、腫瘍の縮小を第一の効果指標として開発された従来の化学療法の限界が顕著になった。

近年提唱されている「がん幹細胞」の概念

は、腫瘍の縮小が必ずしも治療効果と相関しないことを示唆している。自己複製能を持ち、がん組織を再構成できる少数の細胞集団を治療標的としない限り、がんの根治にはつながらない。しかし、実際は「がん幹細胞」の起源や維持機構、ともすると存在自体がいまだに不明瞭な状況である。モデル先行型の研究分野であることは否めず、現時点でがん幹細胞仮説を全てのがんに単純に適用することは大変危険と思われる。そこで、がん幹細胞様細胞の本態解明には、従来の幹細胞観に捉われずに、治療標的とすべき性質を限定的かつ安定的に表現する *in vitro* 系の創出が重要であると考えられる。がん幹細胞様細胞の出現を、がんの悪性進展における終末像と捉え、実際にヒト腫瘍で頻繁に変異が見つかるがん抑制遺伝子の解析から得られた知見をもとに、これらの複合遺伝子変異によりがん幹細胞様細胞を誘導する *in vitro* 系の構築を目指した。

2. 研究の目的

がん抑制遺伝子 Rb は、主に細胞周期における G1 期の進行と S 期への進入を抑制している。Rb 経路の破綻は、無制限な増殖という癌細胞に不可欠な表現型を引き起こし、Rb の活性を制御する cyclin D1 の過剰発現や p16 の欠失、下流の転写因子である E2F family の過剰発現などを含めると、実際にほとんどのヒト腫瘍において Rb 経路の異常が存在することが明らかとなっている。一方で、網膜芽細胞腫や肺小細胞がんなど一部の例を除くと、Rb 経路の異常は、発がん過程ではなく、がんの悪性進展過程において頻繁に観察される。

Rb 単独の不活性化が発がんに十分ではない原因の 1 つに、E2F1 の活性化を介した p53 経路の活性化が挙げられる。申請者らは、これまでに Rb および p53 経路関連遺伝子 (p19、p53、p21) 複合欠損マウスの解析を行い、Rb ヘテロ型マウスは、甲状腺 C 細胞 (カルシトニン産生細胞) における Rb の Loss of Heterozygosity (LOH) に伴い良性腫瘍を発症するが、p19 または p53、p21 のいずれかを欠損した Rb ヘテロ型マウスでは、全ての個体において腫瘍の早期悪性が観察された。特に興味深い結果として、p53 欠損型においてのみ、分化マーカーの発現が極めて低い未分化腫瘍を発症し、この腫瘍から樹立した細胞株は、p19、p21 欠損マウス由来の細胞株と比較して、Tumor sphere 形成能やヌードマウスへの生着能および転移能が有意に高く、がん幹細胞様の特徴を示す細胞群を多く含んでいた。

これらの結果から、p53 が欠損した特定の腫瘍細胞においては、Rb の不活性化により脱分化が誘導され、がん幹細胞様細胞が出現す

るといふ仮説を立てた。この仮説を検証するにあたり、マウス甲状腺 C 細胞腫より樹立した初代培養細胞を、安定的に形質を維持したまま長期間培養するための方法が確立されていないという問題点があった。一方で、p53 欠損マウス由来の軟部腫瘍細胞は、通常の細胞培養法でも安定的に培養することが可能であり、この細胞においても、Rb のノックダウンにより、Tumor sphere 形成能を有し、免疫不全マウスへの造腫瘍能の高い幹細胞様の細胞群を誘導できることが明らかになったことから、本研究では C57BL/6 背景 p53 欠損マウスに自然発生した軟部腫瘍より樹立した初代培養細胞を用いて、p53 欠損背景において Rb 不活性化によりがん幹細胞様細胞が誘導される分子機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

まず始めに、p53 欠損マウスに自然発生した軟部腫瘍より樹立した初代培養細胞において、Rb 不活性化により誘導されるがん幹細胞様細胞の遺伝子発現解析を行った。これらの細胞群は、絶対的数量が少なく、セルソーター等で濃縮するための表面抗原も明確でないことから、Tumor sphere 形成能の有無を指標に選択・培養することで純化を試みた。その結果、得られた細胞群は、純化前の細胞と比較して増殖速度にはほとんど違いが無いが、Doxorubicin 等の抗がん剤への薬剤耐性が高く、さらに C57BL/6 背景野生型マウスに対して高い造腫瘍能と転移能を示した。そこで、RNA sequence および DNA microarray により、この純化したがん幹細胞様性質を持つ細胞群の遺伝子発現を解析することで、Rb の不活性化により誘導され、かつ幹細胞性の維持に必要と考えられる遺伝子群のリストを作成し、GSEA および GeneSpring software、KEGG データベース等を用いたバイオインフォマティクスの手法により遺伝子発現パターン解析を行った。

4. 研究成果

RNA sequence および DNA microarray により、Rb 不活性化により誘導されるがん幹細胞様細胞群の遺伝子発現を解析した結果、これらの細胞群では IL-6、CCL2 などケモカインを含む種々の炎症性サイトカインの発現が顕著に亢進していることが明らかになった。また、Rb 不活性化細胞ではこれらサイトカイン群の細胞外への分泌が顕著に亢進しており、Paracrine 型または Autocrine 型に作用することで、その下流シグナルとして特異的に STAT3 経路を活性化させることを実験的に明らかにした。さらに、遺伝子ノックダウンや種々の阻害剤を用いた実験から、これら炎症性サイトカインの分泌および STAT3 の活性

化が、Rb 不活性化によるがん幹細胞様細胞の誘導に必須であることが明らかになった。加えて、In silico プロモーター解析の結果、これら Rb 不活性化により発現誘導される炎症性サイトカインにおいて、プロモーター領域に E2F 結合サイトの存在が推測される遺伝子が複数種類存在することがわかり、現在 Rb および E2F family の結合を定量的クロマチン免疫沈降法 (qChIP assay) により確認している。

一方で、C57BL/6 背景野生型マウスへ皮下移植した p53 欠損繊維芽腫細胞の免疫組織染色による観察から、Rb が正常であるコントロール細胞由来の皮下腫瘍と比較して、Rb 不活性化細胞由来の腫瘍形成部位では、マクロファージおよび好中球の遊走が著しく亢進していることが明らかになった。そこで、Rb 不活性化により誘導される炎症性サイトカインの分泌亢進と STAT3 活性化が、腫瘍形成部位における炎症性微小環境の形成に促進的に作用するか否かを明らかにするため、現在、遺伝子改変マウスや遺伝子ノックダウン、阻害剤を用いた実験により解析を進めている。また、STAT3 活性化の下流として VEGF α など血管新生因子の発現が亢進することも見い出しており、今後は腫瘍形成部位における血管新生への役割も評価する予定である。

申請者らが確立した本研究手法は、Rb を中心に据え、がん抑制遺伝子の不活性化という生理的なコンテキストでがん幹細胞様細胞を誘導することが出来る。これは従来のヒトがん細胞株等を用いたがん幹細胞研究と比較して「がん幹細胞の成立」を解明する上で有用な実験系である。さらに、これらのがん幹細胞様の細胞群は、抗がん剤への薬剤耐性と、高い転移能を示すことから、現在までに確立されていない *in vitro* がん幹細胞モデルとして、様々な研究に発展応用できると考えている。

さらに、本研究では、Rb 不活性化により誘導されるサイトカインの分泌が、炎症性微小環境の形成に寄与し、がんの増殖、転移に促進的に作用することを示唆している。これは、Rb 不活性化が、がん細胞の幹細胞性獲得という cell autonomous な作用のみならず、non-cell autonomous な作用を介して、がんの悪性を促進することを意味する。炎症性微小環境が、がんの悪性化過程に関与する事はよく知られるが、その成立機構はいまだはっきりしない部分も多い。今後の本研究の発展により、「がん細胞自身の遺伝子変異が炎症性微小環境形成の引き金となる」という新しい概念を提唱したい。

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 1 件)

- ① Takahashi, C., Sasaki, N., Kitajima, S., Twists in views on RB functions in cellular signaling, metabolism and stem cells., 査読有, 103(7), 2012, 1182-1188
DOI:10.1111/j.1349-7006.2012.02284.x

[学会発表] (計 7 件)

- ① Kitajima, S., Takahashi, C., Undifferentiated state induced by Rb inactivation associated with metabolic reprogramming and inflammation., 9th AACR/JCA Joint Conference, 2013 年 2 月 22 日, Hyatt Regency Maui (USA)

- ② 北嶋俊輔, 高橋智聡, Undifferentiated state induced by Rb inactivation associated with metabolic reprogramming and inflammation., 平成 24 年度個体レベルでのがん研究支援活動ワークショップ, 2013 年 2 月 6 日, 琵琶湖ホテル (滋賀県)

- ③ 北嶋俊輔, 高橋智聡, Undifferentiated state induced by Rb inactivation associated with metabolic reprogramming and inflammation., 平成 24 年度がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動公開シンポジウム, 2013 年 1 月 30 日, 学術総合センター一橋講堂 (東京都)

- ④ Kitajima, S., Takahashi, C., Undifferentiated state induced by Rb inactivation associated with metabolic reprogramming and inflammation., The 3rd International Symposium on Carcinogenic Spiral and International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa, 2013 年 1 月 25 日, 金沢エクセルホテル東急 (石川県)

- ⑤ 北嶋俊輔, 高橋智聡, Undifferentiated state induced by Rb inactivation associated with metabolic reprogramming and inflammation., 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 13 日, 福岡国際会議場 (福岡県)

- ⑥ 北嶋俊輔, 高橋智聡, Undifferentiated cancer stem cell-like phenotypes induced by Rb-p53 inactivation., 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 20 日, ロイトン札幌 (北海道)

- ⑦ Kitajima, S., Takahashi, C., Undifferentiated cancer stem cell-like phenotypes induced by Rb-p53 inactivation., The 7th International

Symposium of the Institute Network, 2012
年 6 月 14 日, 東北大学加齢医学研究所 (宮
城県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北嶋 俊輔 (KITAJIMA SHUNSUKE)

金沢大学・がん進展制御研究所

博士研究員

研究者番号 : 90566465

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし