



The Tissue Reconstructing Ability of Colon CSCs is Enhanced by FK506 and Suppressed by GSK3 Inhibition

Ishida, Ryo

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2017-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7036号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007036>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

The Tissue Reconstructing Ability of Colon CSCs is Enhanced by FK506 and Suppressed by GSK3 Inhibition

大腸がん幹細胞の組織形成能は、FK506 により促進され、GSK3 阻害により抑制される

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
食道胃腸外科学
(指導教員：掛地 吉弘 教授)

石田 諒

<はじめに>

癌幹細胞 (CSCs) は、癌患者の予後不良の責任細胞と考えられている。CSC 特性の獲得や維持に関する分子機構は明らかになっていないが、その一因として CSC 研究のためのサンプルの量的制限がある。このサンプルの量的制限を克服する方法として、我々のグループは 2013 年、大腸癌細胞株に OCT3/4、SOX2、KLF4 を導入することにより人工大腸癌幹細胞 (iCSCs) を誘導することに成功した。今回われわれは、この iCSC を用いて大腸癌幹細胞の最も重要な特性である組織形成能に関わる分子機構とその制御法を探索した。その結果、iCSC の組織形成能は FK506 により促進され、GSK-3 阻害により抑制されることを見出した。FK506 と GSK-3 阻害は iCSC における NFATc3 の核-細胞質間の移行に対して逆の作用を有することが観察された。このことは、大腸癌幹細胞の組織形成能の制御は NFATc3 の核-細胞質局在を介して起こっている可能性を示唆する。

<結果>

1. OCT3/4、KLF4、SOX2 一連ベクターを作製し、人工大腸癌幹細胞を誘導

われわれは過去に、OCT3/4、KLF4、SOX2 遺伝子を大腸癌細胞株 SW480 に導入することで iCSC を誘導できることを報告した。この報告では 3 因子を別々のベクターに搭載して導入していたことから、1 因子のみ、あるいは 2 因子のみが導入されている細胞も混在していたほか、3 因子が導入された細胞においても、それぞれの因子の発現量にはばらつきがあり、誘

導された細胞にも特性のばらつき (heterogeneity) が大きいと考えられるという問題があった。その heterogeneity を解消するべく、われわれは OKS 一連ベクターを作製し大腸癌細胞株に導入した。OKS 一連ベクターを用いても、既報の iCSCs と同様の形態的変化がみられた。ベラパミル 50 μ M 存在下でもヘキスト色素を排出する細胞をソーティングすることを 2 度行って得られた細胞集団を 2nd V50-OKS 細胞と名付けた。この 2nd V50-OKS 細胞は、既報の iCSCs と同様に、幹細胞マーカーの上昇、cell cycle の遅延、抗癌剤耐性などの表現型を示した。よって、今回われわれが使用した OKS 一連ベクターでも我々の既報の iCSCs と同様の iCSCs が誘導できると考え、本研究では OKS 一連ベクターを使用して研究を進めることとした。

2. 人工大腸癌から作製した Sphere は、ヒト大腸癌組織を再現する。

2nd V50-OKS 細胞のスフェア形成能を調べたところ、parental SW480 と比べてスフェア形成能が著明に上昇していた。次に、この in vitro で作製したスフェアを免疫染色で評価した。2nd V50-OKS 細胞由来のスフェアでは、既報の iCSCs 由来 Xenograft と同様に CK20+、CK7-、CDX2+ という実際のヒト大腸癌組織類似の免疫染色パターンであった。よって、iCSCs 由来の組織は、in vivo だけでなく、in vitro においても、ヒト大腸癌組織を再現する評価法になり得ると考え、本研究では in vitro でのスフェア形成を iCSCs の組織形成能の指標とした。

次に、癌のニッチを模倣するため間葉系幹細胞(MSCs)、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs)と混

合培養を行った。すると、parental SW480 との混合培養では細胞同士は密な細胞間接着を形成せず。 α -SMA 陽性細胞 (癌関連線維芽細胞あるいは筋線維芽細胞) や CD31 陽性細胞 (血管内皮細胞) も認めないのに対し、2nd V50-OKS 細胞と混合培養を行った場合は、細胞同士が密集合体を形成し、スフェアの免疫染色でも α -SMA 陽性細胞や CD31 陽性細胞が共存していた。この結果は、iCSCs が MSCs や HUVECs と協調して組織を構築し、成熟していく能力があることが示唆された。

3. 遺伝子発現解析による幹細胞特性メカニズムの解析

CSCs 特性を制御する分子メカニズムの解明のため、mock-SW480、non-V50 細胞(from 1st V50-OKS)、2nd V50-OKS 細胞の遺伝子発現に比較をマイクロアレイで網羅的に行った。スフェア形成能と大小と相関する動きを示す遺伝子を統計処理によって抽出した結果、3 つの遺伝子:SEMA6A、FAM105A、RCAN2 を CSC 特性に関与する候補遺伝子として同定した。そこで、これらの遺伝子と同じ作用が期待できる化合物を用いて研究を進めることとし、その中でも、今回われわれは RCAN2 と同じカルシニューリンを抑制する働きを持つ FK506 に焦点を絞った。

4. カルシニューリン阻害は特異的に CSCs の特性を増強する

カルシニューリン阻害剤である FK506 を添加したところ、parental SW480 は細胞数の有意な低下を認めるのに対し、2nd V50-OKS 細胞では細胞数の低下は認めなかった。細胞形態に関して

は、parental SW480 では形態変化を認めないのに対し、2nd V50-OKS 細胞はドーム状の colony 形態がより顕著となった。さらに、スフェア形成能に関しても、FK506 添加すると、parental SW480 ではスフェア形成能に著名な変化は見られないのに対し、2nd V50-OKS においては著明にスフェア形成能の上昇がみられた。これらの結果は、カルシニューリン阻害が大腸 CSCs 特異的に作用し、その特性を促進させる可能性を示唆した。

5. GSK3 阻害は iCSCs に対してカルシニューリン阻害と反対の作用を持つ

カルシニューリンは NFAT を脱リン酸化して核内移行を誘導し、逆に、GSK3 は NFAT をリン酸化して核外に出す働きが、COS というサル腎臓由来細胞を用いた実験結果から報告されている。iCSC においても GSK3 阻害がカルシニューリン阻害剤の FK506 と逆の働きをするかを調べるため、GSK3 α および GSK3 β を siRNA を用いてノックダウンした。GSK3 α あるいは GSK3 β どちらか一方のノックダウンでは表現型の変化は見られなかったが（互いに相補的に作用する可能性が考えられる）、GSK3 α と GSK3 β を共にノックダウンさせると、parental SW480、2nd V50-OKS 細胞いずれにおいても培養維持が困難となった。

次に、GSK-3 阻害剤としてバルプロ酸(VPA)と CHIR99021(CHIR)を添加したところ、parental SW480、2nd V50-OKS 細胞ともに細胞数が減少し、2nd V50-OKS 細胞のみで形態変化を認め、ドーム状のコロニーを形成する細胞形態は平坦な形態へと変化した。さらに、2nd V50-OKS 細胞のスフェア形成能は、VPA や CHIR の添加によって著明に抑制された。

6. 2nd V50-OKS 細胞における NFAT 局在

最後に、FK506、VPA、CHIR を添加した際の iCSCs における NFATc3 の局在を調べるため、NFATc3 と GFP の融合タンパク質 (NFATc3-GFP)を、レトロウイルスを用いて 2ndV50-OKS 細胞に導入した。コントロール（添加薬剤なし）と FK506 添加した 2nd V50-OKS 細胞においては、NFATc3-GFP は細胞質に局在したが、GSK-3 阻害剤である VPA、CHIR を投与した 2nd V50-OKS 細胞においては、NFATc3-GFP の核内移行が観察された。siRNA による RCAN2 のノックダウンでも、GSK-3 阻害剤の添加と同様に、2nd V50-OKS 細胞において細胞形態の平坦化および NFATc3-GFP の核内移行を認めた。これらの結果から、GSK 阻害とカルシニューリン阻害が、NFAT の局在を介して逆の作用を及ぼしていることが示唆された。

<まとめ>

本研究において、colon iCSCs が in vitro においても、実際のヒト大腸癌を再現する組織を形成する能力を有することが示された。われわれの技術は、大腸癌幹細胞とヒト大腸癌組織を再現できるオルガノイドを十分量供給することにより、大腸 CSC の特性に関する研究やそれを標的とする創薬に有用と考えられる。

我々は、colon CSC において、カルシニューリン阻害剤である FK506 は促進的に、GSK3 阻害は抑制的にその組織形成能に働き、それらは NFAT 局在を介することを提示した。VPA は、す

でに抗てんかん薬として広く使われており、ドラッグリポジショニングによって CSC 標的治療薬

として切除不能大腸癌の予後改善に寄与することが期待される。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2729 号	氏 名	石田 諒
論文題目 Title of Dissertation	The Tissue Reconstructing Ability of Colon CSCs is Enhanced by FK506 and Suppressed by GSK3 Inhibition 大腸がん幹細胞の組織形成能は、FK506 により促進され、 GSK3 阻害により抑制される		
審査委員 Examiner	主 査 福本 巧 Chief Examiner 副 査 鈴木 聡 Vice-examiner 副 査 伊藤 智雄 Vice-examiner		

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)

癌幹細胞 (CSCs) は、癌患者の予後不良の責任病変と考えられているが、その CSC 特性の獲得や維持に関する分子機構は明らかでない。その一因としてサンプルの量的制限があるが、Oshima らは 2013 年に、このサンプルの量的制限を克服する方法として、大腸癌細胞株に OCT3/4、SOX2、KLF4 をレトロウイルスで導入することにより人工大腸癌幹細胞 (iCSCs) を誘導することに成功している。本研究では、この人工大腸癌幹細胞技術を用いて CSC 特性である組織形成能に関わる key pathway を探索した結果、大腸癌幹細胞の組織形成能は、FK506 により促進され、GSK-3 阻害により抑制されることを見つけた。また、FK506 と GSK-3 阻害では、NFATc3 の核-細胞質局在が反対であることから、この組織形成能の制御は NFATc3 の核-細胞質局在を介して起こっている可能性を示した。

Oshima らは 2013 年、大腸癌細胞株に OCT3/4、SOX2、KLF4 を導入することにより iCSCs を誘導できることを報告しているが、その分子メカニズムには関しては不明であった。iCSCs の癌幹細胞特性獲得の分子メカニズム解明には、誘導細胞間のバラツキを抑えることが必要と考え、本研究では、まず OCT3/4、SOX2、KLF4 の 3 因子が一連となったベクターを作製し、Oshima 論文と同じ iCSCs が誘導できるかを評価した。3 因子一連ベクターを用いても、Oshima らの報告と同様にドーム状に盛り上がったコロニーを形成する細胞を誘導することができ、それらの細胞は ABCG2 や LGR5 といった癌幹細胞マーカー発現、細胞周期の低下、抗癌剤耐性能の上昇、スフェア形成能の上昇などの癌幹細胞特性を認めた。よって、誘導細胞間のバラツキの少ない 3 因子一連ベクターでも Oshima 論文の iCSCs と同様の iCSCs が誘導可能で、本研究では 3 因子一連ベクターを使用して研究を進めることとした。

次に、癌幹細胞の特徴である、「がん細胞を再構築できる」という能力について調べた。既報の Oshima 論文では、マウス Xenograft において iCSCs が実際の大腸がん組織を模倣する腫瘍を形成することを示しているが、本研究ではスフェアの組織学的評価を行い、iCSCs から作製したスフェアが CK20 陽性、CK7 陰性、CDX2 陽性という大腸がん組織のパターンをとることを示した。よって、iCSCs 由来の組織は、in vivo だけでなく、in vitro においても、ヒト大腸癌組織を再現する評価法になり得ると考えられるため、本研究では in vitro のスフェア評価を iCSCs における組織形成能の指標とした。

次に、マイクロアレイを用いた遺伝子解析を行い、スフェア形成能とパラレルに動く SEMA6A、FAM105A、RCAN2 の 3 つの遺伝子をがん幹細胞特性に関わる遺伝子候補として挙げた。その中から RCAN2 (Regulator of calcineurin 2) に着目し、RCAN2 と同じカルシニューリン抑制に働く化合物、FK506 の iCSCs に対する作用を検討した。

iCSCs に FK506 を添加してみると、iCSCs のドーム状に盛り上がった colony 形態はより顕著となり、スフェア形成能も著明に上昇させた。よって、FK506 が大腸癌幹細胞の組織形成能を促進することが示された。

次に、NFAT の核-細胞質移行において、FK506 と反対の作用を持つと考えられる GSK-3 阻害が iCSCs に及ぼす影響を検討した。siRNA、あるいはバルプロ酸や CHIR99021 といった化合物による GSK-3 阻害を行うと、iCSCs の形態的特徴は失われ、ドーム状に盛り上がった細胞形態は平坦な形態へと変化した。また、GSK-3 阻害により iCSCs のスフェア形成能も有意に低下した。よって、GSK3 阻害が大腸がん幹細胞の組織形成能を抑制することが示された。

最後に、これらの癌幹細胞性の維持や喪失に、NFAT の局在が関与しているのかどうかを調べるため、融合タンパク GFP をつけた NFATc3 (NFATc3-GFP) を、レトロウイルスを用いて iCSCs に導入し、その局在を評価した。コントロールと FK506 添加した iCSCs においては、NFATc3-GFP は細胞質に認められ、GSK-3 阻害剤であるバルプロ酸や CHIR99021 を添加した iCSCs においては、NFATc3-GFP の核内移行が観察され、癌幹細胞特性消失に NFAT の核内移行が関わっている可能性が示された。

臨床検体においてがん幹細胞はサンプル確保が難しい、あるいはがん幹細胞のみの分離が難しい、といった問題点があるなか、本研究は、iCSCs が人工的な系ではあるが、幹細胞研究や癌幹細胞標的薬のドラッグスクリーニングに非常に有用なツールであることを示した。実際、本研究によりバルプロ酸やその他の GSK-3 阻害剤が、癌幹細胞標的治療となる可能性を示しており、そのメカニズムに関しても NFAT の核内移行が関与している可能性を示している。本研究をもとに、今後 in vivo の実験や臨床検体において NFAT 局在の意義やバルプロ酸と大腸がん予後の解析、などといったさらなる展開・応用が期待され、非常に意義のある研究である。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。