

Title	E-cad-Fc-Matrix Enhances Cancer Stem-Like Properties and Induces Mesenchymal Features in Colon Cancer Cells
Author(s)	銭, 雅敏
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/76484
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (銭 雅 敏)	
論文題名	E-cad-Fc-Matrix Enhances Cancer Stem-Like Properties and Induces Mesenchymal Features in Colon Cancer Cells (Eカドヘリンコーティング培養によって大腸癌細胞株における間葉様形質の獲得及び癌幹細胞性質への影響)
論文の要旨	
背景と目的 癌幹細胞は腫瘍組織中に存在し、高い腫瘍形成能と抗癌剤耐性を持つことから癌の再発や転移の原因と考えられているが、癌細胞集団の中で少数しか存在しないため実験手法が限定され、治療開発が遅れている。その解決策の1つとして、癌幹細胞性を高めるツールの開発が望まれている。可溶性のE-cadherinタンパクが癌細胞のEGFR (Epithelial Growth Factor Receptor) に結合し、Wntシグナル経路と並んで癌幹細胞の特性に重要と考えられているEGFRの下流シグナル経路を活性化することが報告されている。そこで本研究はE-cadherin-Fcキメラタンパク (E-cad-Fc) によるコーティングを施し、その上で大腸癌細胞株またはODC-degronを導入された癌幹細胞モデル細胞を培養して、癌幹細胞性が増幅するかどうかを明らかにすることを目的とした。更に癌幹細胞性と関連があると報告されている上皮間葉転換 (EMT: Epithelial Mesenchymal Transition) についても検討した。 材料と方法 実験には大腸癌細胞株SW480と比較的幹細胞性の低い大腸癌幹細胞モデルであるODC-degron導入KM12SM細胞を用いた。E-cad-Fc をコーティングした培養ディッシュ上で細胞を培養することで、E-cad-Fcが癌幹細胞性とEMTの誘導に及ぼす影響について検討した。癌幹細胞性の評価は、qRT-PCR、ウエスタンブロット、フローサイトメトリーによる癌幹細胞マーカーの発現解析、スフェア形態の観察、抗がん剤耐性およびプロテアソーム活性を測定することによって行った。EMTの評価は顕微鏡観察による細胞形態の変化の観察とqRT-PCR、ウエスタンブロットによるEMTマーカーの発現解析により行った。 結果と考察 まず始めに大腸癌細胞株SW480をE-cad-Fc をコーティングした培養ディッシュ上で培養し、癌幹細胞性に及ぼす影響について検討を行った。その結果、癌幹細胞マーカーであるCD44v9の発現上昇やALDH (Aldehyde dehydrogenase) の活性の上昇が認められた。また、E-cad-Fc 上で培養した細胞はEMTの特徴の1つである紡錘状の形態を示していた。そこで、EMT関連マーカーの発現を検討するとE-cad-Fc 上で培養した細胞においてN-cadherin, Snail1, Vimentinの発現が上昇していた。 次にE-cad-Fc が癌幹細胞性やEMT誘導に及ぼす影響をより詳細に検討するために比較的幹細胞性の低い大腸癌幹細胞モデルであるODC-degron導入KM12SMを用いて検討を行った。その結果、ODC-degron導入KM12SM細胞においてもE-cad-Fc上で培養することにより、①プロテアソーム活性の抑制、②癌幹細胞マーカーLgr5, Bmi-1, SOX9の発現上昇、③癌幹細胞表面マーカーCD44, CD44v9の発現上昇、④ALDHの活性上昇、⑤スフェア形成能の増強、⑥抗癌剤5-fluorouracil (5-FU) およびoxaliplatin (L-OHP) への耐性増強といった癌幹細胞性の増幅が認められた。また、紡錘状の形態変化に加え、N-cadherin、Snail1、Slug、Vimentin、ZEB1、Twist-1といったEMT関連マーカーの発現誘導もタンパク、mRNAレベルいずれにおいても認められた。 さらにE-cad-FcはWnt経路と並んで癌幹細胞性との関連が示されているEGFRのシグナルの活性化 (EGFR, ERK, PI3K, AKT, mTORのリン酸化) とEMTを誘導する増殖因子であるTGF-β1の発現亢進をもたらすことが明らかとなった。E-cad-FcはTGF-β1のmRNA発現量には影響を与えなかったことから、転写後調節機構を介してタンパク発現量を亢進させていると考えられる。以上の結果からE-cad-Fcは可溶性E-cadherin同様にEGFRシグナルの活性化を介して癌幹細胞性を増幅させるだけではなく、EMTの誘導も同時にもたらすことが示された。 結論 本研究の結果、E-cad-Fcは大腸癌細胞株、大腸癌幹細胞モデル細胞に対し、EGFRシグナルの活性化とTGF-β1の発現誘導を通じて癌幹細胞性の増幅とEMTの誘導をもたらすことが明らかとなった。E-cad-Fcは癌幹細胞やEMTの研究を行う上で有用な研究ツールとなる。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (銭 雅 敏)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教 授	山本 浩文
	副 査	教 授	小泉 雅彦
	副 査	教 授	尾路 祐介

論文審査の結果の要旨

(背景)

癌幹細胞は腫瘍組織中に存在し、高い腫瘍形成能と抗癌剤耐性を持つことから癌の再発や転移の原因と考えられているが、癌細胞集団の中で少数しか存在しないため実験手法が限定され、治療開発が遅れている。可溶性のE-cadherinタンパクが癌細胞のEGFR (Epithelial Growth Factor Receptor) に結合し、Wntシグナル経路と並んで癌幹細胞の特性に重要と考えられているEGFRの下流シグナル経路を活性化することが報告されている。そこで本研究はE-cadherin-Fcキメラタンパク (E-cad-Fc) によるコーティングを施し、その上で大腸癌細胞株または癌幹細胞モデル細胞を培養して、癌幹細胞性が増幅するかどうかを明らかにすることを目的とした。更に癌幹細胞性と関連があると報告されている上皮間葉転換 (EMT: Epithelial Mesenchymal Transition) についても検討した。

(方法と結果)

大腸癌細胞株SW480と大腸癌幹細胞モデルであるODC-degron導入KM12SM細胞を用いた。癌幹細胞性の評価は、qRT-PCR、ウェスタンブロット、フローサイトメトリーによる癌幹細胞マーカーの発現解析、スフェア形態の観察、抗がん剤耐性およびプロテアソーム活性を測定することによって行った。EMTの評価は顕微鏡観察による細胞形態の変化の観察とqRT-PCR、ウェスタンブロットによるEMTマーカーの発現解析により行った。

大腸癌細胞株SW480をE-cad-Fc をコーティングした培養ディッシュ上で培養した結果、癌幹細胞マーカーであるCD44v9の発現上昇やALDH (Aldehyde dehydrogenase) の活性の上昇が認められ、紡錘状の形態を示した。またEMT関連マーカーである-cadherin, Snail1, Vimentinの発現が上昇した。

大腸癌幹細胞モデルであるODC-degron導入KM12SMを用いて検討を行った。その結果、ODC-degron導入KM12SM細胞においてもE-cad-Fc上で培養することにより、①プロテアソーム活性の抑制、②癌幹細胞マーカーLgr5, Bmi-1, SOX9の発現上昇、③癌幹細胞表面マーカーCD44, CD44v9の発現上昇、④ALDHの活性上昇、⑤スフェア形成能の増強、⑥抗癌剤5-fluorouracil (5-FU) およびoxaliplatin (L-OHP) への耐性増強といった癌幹細胞性の増幅が認められた。また、紡錘状の形態変化に加え、N-cadherin、Snail1、Slug、Vimentin、ZEB1、Twist-1といったEMT関連マーカーの発現誘導もタンパク、mRNAレベルいずれにおいても認められた。

メカニズム解析の結果、E-cad-FcはEGFRのシグナルの活性化 (EGFR, ERK, PI3K, AKT, mTORのリン酸化) とEMTを誘導する増殖因子であるTGF- β 1の発現亢進をもたらすことが明らかとなった。

(結論)

本研究の結果、E-cad-FcはEGFRシグナルの活性化とTGF- β 1の発現誘導を通じて癌幹細胞性の増幅とEMTの誘導をもたらすことが明らかとなった。

E-cad-Fcは癌幹細胞やEMTの研究を行う上で有用な研究ツールとなることが分かり、癌研究の推進に重要な知見であることから、この研究成果は博士 (保健学) の学位授与に値するものである。