

助成番号 26-2-31

癌幹細胞のエピゲノム制御を介した大腸癌治療抵抗性の克服

紀南病院 外科

(現 大阪大学大学院医学系研究科 外科学講座消化器外科学)

波多 豪

1. 諸言

HOXA5 は、大腸癌における癌幹細胞の分化マーカーとして 2015 年に報告された¹⁾。HOXA5 は、正常腸管上皮細胞では WNT シグナル経路を抑制して上皮の最終分化を促進するが、大腸癌では WNT シグナル経路の標的遺伝子である MYC を介して発現が抑制されている。乳癌では上皮間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition : EMT) 抑制と上皮分化の促進により、悪性度と癌幹細胞性を低下させることが報告された²⁾。LGR5 など従来報告されている癌細胞マーカーとして知られる分子の多くは、癌幹細胞に発現する "脱分化マーカー" として機能するものが多い中、この HOXA5 は、"分化マーカー" つまり「脱癌幹細胞マーカー」としての機能を持つ。

癌幹細胞は、腫瘍組織中で少数の細胞集団として存在し、自己複製能と多分化能、高い造腫瘍能を特徴とする。癌の増殖、転移に関わっており、大腸癌薬物療法の主軸として使用される 5-フルオロウラシル (5-fluorouracil : 5-FU) やオキサリプラチン (oxaliplatin : L-OHP) の薬剤耐性においても関与が知られている。近年、LGR5 を標的とした癌幹細胞に対する治療が思いのほか効果に乏しかったことが報告され³⁾、癌幹細胞治療の開発にブレイクスルーが求められる中、HOXA5 を標的とした「脱癌幹細胞化」に着目し、癌幹細胞に対する従来とは異なったアプローチによる画期的な治療法となる可能性を考えた。

HOXA5 の制御機構は、現在までの報告からエピゲノムの関与が示唆され、殺細胞性抗癌薬に対する耐性を獲得した癌幹細胞に対してヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase : HDAC) 阻害剤や DNA メチル化阻害薬による HOXA5 のエピゲノム調節を行うことで、癌幹細胞から娘細胞への分化促進を介して耐性を克服できると考えた。まだ研究途中の段階であるが、現在まで得られた研究成果について報告する。

2. 方法

大腸癌における HOXA5 の発現意義を明らかにすべく、当院で手術した大腸癌臨床検体を用いて免疫組織学的染色を行った。約 90 例の免疫組織学的染色により、HOXA5 と大腸癌

患者の予後との相関について検証した。

細胞実験については、大腸癌細胞株 HCT-116、DLD-1、HT-29、RKO、SW480 を用い、ウェスタンブロット、qRT-PCR によって細胞株ごとの HOXA5 の発現量を確認した。大腸癌における HOXA5 の生物学的意義を明らかにするために、HOXA5 のノックダウン、強制発現の実験モデルを作成した。ノックダウン実験については siRNA transfection、および shRNA vector 導入を行い、強制発現モデルについては、HOXA5 expression vector の導入を行なった。Proliferation assay、invasion assay、sphere formation assay などの細胞実験に加え、癌幹細胞マーカーや EMT マーカーの発現解析を行い、HOXA5 が転写因子として転写・発現に関与すると考えられる下流分子について解析を進めている。また、HOXA5 のエピゲノム調節による制御メカニズムに着目し、大腸癌における HOXA5 の転写・発現への histone acetylation、DNA methylation の関与を明らかにすべく、in vitro での HDAC 阻害剤や DNA メチル化阻害薬投与、さらに HDAC や DNMT に対する specific なノックダウン実験を行なっている。

さらに、抗癌剤抵抗性と HOXA5 の関連を調べるため、5-FU および L-OHP への段階的かつ長期の曝露を行い、大腸癌細胞株の抗癌剤耐性株を樹立した。耐性獲得は抗癌剤感受性試験によって確認した。

3.結果

手術切除検体約 100 例を用いて、免疫組織学的染色を行った。正常部では核が染色されるものが多い一方で、癌部では細胞質が染色される、あるいは全く染色されないものが多い傾向にあった。つまり、癌部において HOXA5 発現は低下している傾向にあると考えられ、既存の報告と一致する結果が得られた。それぞれの患者の検体に付随する臨床情報をもとに生存解析を行ったところ、全生存期間、無病生存期間ともに、HOXA5 低発現群が予後不良であった。単変量、多変量解析によると、無病生存期間において、HOXA5 低発現が病理学的深達度と並んで独立した予後不良因子であった。

現在、細胞実験により、HOXA5 の生物学的意義、HOXA5 のエピジェネティクスとの関連性について研究を進めている。さらに、樹立した抗癌剤耐性株を用いて HOXA5 と薬剤耐性の関連性について明らかにしていく予定である。

4.考察

大腸癌において、HOXA5 は正常部で高発現する一方で、癌部では低発現であった。また、生存解析から HOXA5 は大腸癌患者の独立した予後予測因子と考えられ、癌抑制遺伝子としての機能をもつ可能性が示唆された。エピゲノム調節による HOXA5 制御について、特に薬剤耐性株での解析を進め、HOXA5 が大腸癌における治療標的となりうるか検証していく。

5.結語

大腸癌で HOXA5 は独立した予後予測因子となる可能性が示唆された。引き続き、仮説の解明に向けて研究を継続していく。

6.文献

- 1) Ordóñez-Morán P, Dafflon C, Imajo M, Nishida E, Huelsken J. HOXA5 Counteracts Stem Cell Traits by Inhibiting Wnt Signaling in Colorectal Cancer. *Cancer Cell*. 2015; 28(6): 815-829.
- 2) Teo WW, Merino VF, Cho S, Korangath P, Liang X, Wu RC, et al. HOXA5 determines cell fate transition and impedes tumor initiation and progression in breast cancer through regulation of E-cadherin and CD24. *Oncogene*. 2016; 35(42): 5539-5551.
- 3) Shimokawa M, Ohta Y, Nishikori S, Matano M, Takano A, Fujii M, et al. Visualization and targeting of LGR5⁺ human colon cancer stem cells. *Nature*. 2017; 545(7653): 187-192.

6.成果発表

現在研究継続中である。