
トピックス

**酸性微小環境がビタミンD受容体－SOX2シグナルを介して
大腸がんの悪性を誘導する****An acidic microenvironment induces the malignant phenotype of colorectal cancer
through the VDR-SOX2 signaling**

ビタミンDは、古くから骨代謝や骨リモデリング、カルシウムのホメオスタシスを調整する役割があることが知られており、ビタミンDの欠乏が小児における成長遅延やくる病、成人における骨粗鬆症の発症に関与することが証明されている¹⁾²⁾。また、近年の健康ブームと相まって、ここ数年、ビタミンDと種々の疾患との関係を明らかにしようと数多くの研究が行われており、特にがん領域では活性型ビタミンD(1 α ,25(OH)₂D₃)が腫瘍の成長を抑制すること³⁾や血中1 α ,25(OH)₂D₃濃度ががん患者の罹患や生存に影響することが報告されている⁴⁾⁵⁾。さらには、ビタミンD受容体(VDR, vitamin D receptor)の発現レベルが、がん細胞の分化度に関与するという報告もあり⁶⁾、悪性腫瘍に対するビタミンDの役割が注目されている。

悪性腫瘍は、生物学的に不均一な細胞集団により構成されており、その細胞の不均一の起源は少数のがん幹細胞であると考えられている。最近、そのがん幹細胞の表現型にがん微小環境が重要な役割を果たしていることが報告され⁷⁾⁸⁾、がん微小環境における低酸素や酸性化が、がん幹細胞の表現型の変化を導く可能性が示されている⁹⁾。そして、ビタミンDシグナル経路もがん幹細胞の表現型の進展に関与することが知られているだけでなく、グリオーマ細胞を用いた研究では、ビタミンDシグナル経路が酸性条件下で抑制される⁶⁾という報告もあり、ビタミンDやVDRが悪性腫瘍のイニシエーションや進展に関与している可能性が考えられる。しかしながら、がん幹細胞に対するビタミンDやVDRの役割に関する詳細なメカニズムは未だ不明な点が多い。そこで、Huらのグループが大腸がん患者の組織検体や大腸がん細胞株を用いて、がん幹細胞の進展および悪性化にがん微小環境の酸性化とVDRがどのように関与しているか検証し、新たな可能性を提唱しているので、本トピックスで紹介する。

まず、大腸がん細胞のstemness(幹細胞としての形質)に酸性の微小環境がどのような影響を及ぼすか確認した。大腸がん患者の組織検体から単離・培養した細胞(CC tissue-adherent cells)と大腸がん細胞株RKO細胞をpH 6.8およびpH 7.4の条件下で培養したところ、pH 6.8培養群でCD133(がん幹細胞マーカー)陽性細胞の割合が有意に増加した。また、pH 7.4に比べてpH 6.8では自己複製能が著しく促進し、CD133および未分化状態の維持に関わりマスター転写調節因子として知られるOCT4ならびにSOX2のmRNA発現の増加も認めた。すなわち、酸性条件下において大腸がん幹細胞の表現型が誘導および維持される可能性が示された。

次に、その主となる経路を確認するため、pH 6.8およびpH 7.4の条件下で培養したRKO細胞を用いてRNA sequencingおよびenrichment解析を行ったところ、pH 6.8培養群では脂溶性ビタミンの代謝過程が大きく変化することが分かった。脂溶性ビタミンの中でもビタミンDは、ビタミンDシグナル経路を介してがん細胞の分化制御に関連することが知られている³⁾。そこで、CC tissue-adherent cellsおよび種々の大腸がん細胞株を用いて、ビタミンDシグナル経路に重要な役割を担うCYP27A1, CYP27B1, CYP24A1およびVDRの発現量が培養条件(pH)により異なるのか確認したところ、pH 7.4に比べてpH 6.8でVDRタンパク質およびmRNA発現量が明らかに低値を示した。しかしながら、CYP27A1, CYP27B1およびCYP24A1発現量には明らかな違いは確認できなかった。また、大腸がん患者から採取したがん組織とその周辺組織(正常組織)を比較した検討では、正常組織に比べてがん組織でVDR mRNA発現量が明らかに低値を示したが、その他の分子においては明らかな違いを確認できなかった。さらに、大腸がん組織検体において、微小環境の

酸性度に関連することが知られる LAMP2 の発現量と VDR 発現量には負の相関が認められた。つまり、これらの結果は、酸性の微小環境が VDR の発現に影響を与えていることを示唆している。ところで、これまでに報告された臨床研究によれば、大腸がんのリスク軽減に最適な血中 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度は、75 ~ 100 nmol/L であるとされている¹⁰⁾。この濃度は通常推奨されている $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度に比べると遥かに高い数値である。その理由として、大腸がん組織の酸性微小環境が VDR の発現を低下させることから、大腸がんのリスク軽減には、より多くの $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の投与が必要になることが推察される。そこで次に、VDR が大腸がん患者に与える影響を確認するため、原発 (primary) 組織と再発 (recurrence) 組織、そして stage 分類の異なる組織検体を用いて VDR mRNA 発現量を比較した。その結果、recurrence 組織および stage IV の組織検体で VDR mRNA 発現量が低値を示し、VDR 発現量が低値を示す患者では生存期間が短いことが認められた。これらの結果から、VDR の発現低下が大腸がんの再発や悪性度に関与している可能性が考えられた。

次に、VDR が大腸がんの stemness に影響を与えるのか確認した。大腸がんの組織検体および培養細胞株の非がん幹細胞とがん幹細胞の VDR 発現量を測定したところ、非がん幹細胞に比べてがん幹細胞で著しく低値を示した。そこで、遺伝子導入により、がん幹細胞に VDR を過剰発現させ培養したところ、対照群に比べて腫瘍塊の大きさが縮小し、腫瘍塊の数が有意に減少した。また、CD133 陽性細胞の割合も有意に減少した。一方、すでに VDR が十分に発現している大腸がん細胞の VDR をノックダウンすると自己複製能の促進や stemness マーカーの発現増加、CD133 陽性細胞の割合の増加が確認できた。続いて、VDR と大腸がんの悪性度との関係を明らかにするため、白金製剤の抗悪性腫瘍薬オキサリプラチンに耐性を示す HCT-116 細胞の VDR 発現を確認したところ、HCT-116 細胞に比べて VDR 発現量が低値を示した。また、大腸がん幹細胞に VDR を過剰発現させるとオキサリプラチンへの感受性が増すことも分かった。さらには、酸性の微小環境下では、がん幹細胞はオキサリプラチン抵抗性を示すが、VDR を過剰発現させることにより抵抗性が改善されることを確認した。一方、すでに VDR が十分に発現している大腸がん細胞の VDR をノックダウンすると、オキサリプラチン抵抗性が増した。これら一連の結果から、VDR が大腸がん幹細胞の表現型を制御している可能性や大腸がん患者における治療薬抵抗性に起因している可能性が示された。

では、VDR はどのような機構で大腸がん幹細胞の表現型や薬剤抵抗性に影響を与えているのだろうか。VDR はリガンド依存的に転写を制御する転写因子のひとつで、標的タンパクの発現を調節することが知られている。そこで、幹細胞マーカー (SOX2, OCT4, CD44 および NANOG) のプロモーター領域への VDR 結合能を調べたところ、pH 6.8 で VDR は SOX2 のプロモーター領域に結合することが分かった。そして、VDR を過剰発現させた大腸がん幹細胞では対照群に比べて、SOX2 の発現が減少していることや SOX2 プロモーター領域への VDR 結合能が亢進すること、SOX2 プロモーターの転写活性を阻害することを確認した。すなわち、VDR が SOX2 プロモーターに結合して転写を阻害することによって SOX2 発現をダウンレギュレートする可能性が考えられた。

次に、VDR が SOX2 のダウンレギュレーションを介して大腸がんの悪性形質を制御するのか否かを検討した。VDR を過剰発現させた大腸がん幹細胞に SOX2 を過剰発現させ培養したところ、自己複製能が著しく増大した。一方、すでに VDR が十分に発現している大腸がん細胞を用いた検討では、VDR と SOX2 を共にノックダウンさせると、がん幹細胞マーカーである CD133 および CD44 の発現が低下し、かつ自己複製能が低下した。次に、pH 7.4 に比べて pH 6.8 で培養した大腸がん幹細胞で SOX2 mRNA 発現の著しい増加を認めた。SOX2 をノックダウンした大腸がん幹細胞を pH 6.8 で培養すると、自己複製能の低下やオキサリプラチンによる感受性の増大を認め、SOX2 のターゲット遺伝子でもある OCT4 や MYC, CCDN1 などの幹細胞遺伝子の減少を認めた。さらに同条件において、活性型ビタミン D で処置すると pH 6.8 で促進する自己複製能が抑えられることや pH 6.8 で増加する CD133, SOX2 および OCT4 発現が減少することを確認した。これらの結果から、酸性の微小環境がビタミン D - VDR シグナル経路を介して大腸がん細胞の stemness に影響を与えることが示された。

さらに詳しい機序を明らかにするために、酸性微小環境における VDR の subcellular localization を検出した。大腸がん細胞を pH 6.8 で培養したとき、細胞質内の VDR 発現が減少し、核内における VDR の蓄積量も減少した。このとき細胞質内の pH も低下していた。また、さらなる解析により VDR の ligand-binding domain には核外輸送シグナル (NES ; nuclear export signal) を含んでいることが分かった。そこで、VDR の核外輸送と NES の関連性を検証するために、leptomycin B (LMB) を用いて検討した。LMB は、核外輸送レセプター (CRM1 ;

chromosome region maintenance 1) に結合することで、核外輸送基質の CRM1 結合を阻害することが知られている¹¹⁾。まず、pH 6.8 および pH 7.4 で培養した大腸がん細胞を LMB で処置したところ、pH 6.8 において VDR の核外輸送が阻害された。この結果は、酸性下における VDR の核外輸送が CRM1 に依存することを意味する。次に、大腸がん細胞に NES site-mutant プラスミドを組み込み、pH 6.8 および pH 7.4 で培養したところ、pH 6.8 において VDR の核外輸送が阻止された。さらに、大腸がん幹細胞に NES site-mutant プラスミドを組み込み、同条件で培養したところ、pH 6.8 において大腸がん幹細胞の自己複製能が抑制された。これらのことから、酸性微小環境における VDR の核外輸送は NES を介して起こり、それは CRM1 に依存していると考えられる。

次に、Qiagen のデータベースを利用することで、腫瘍の発生に重要な役割を果たすペルオキシソーム増殖剤活性化レセプター (PPAR; peroxisome proliferator-activated receptor) ファミリーが VDR プロモーターに関与する可能性があることが分かった。そこで、TCGA (The Cancer Genome Atlas) のデータベースを分析した結果、大腸がん検体における PPARA および PPARD の発現量は VDR 発現量と正の相関を示すことが認められた。また、PPARD の mRNA およびタンパク発現量は酸性下で培養することで有意に減少することを発見した。さらには、PPARD は VDR のプロモーター領域に結合することや、PPARD の発現の低下により VDR mRNA およびタンパク発現量が減少すること、そして、幹細胞マーカーの発現が増えることを発見した。これらの結果は、酸性微小環境が PPARD の発現低下を介して VDR の発現を抑制することを示唆している。

これまでの結果から、酸性の腫瘍微小環境を改善し、VDR 発現を誘導させることで、大腸がんの発生や進展を抑制できる可能性が考えられた。そこで、ヌードマウスに VDR を過剰発現させた大腸がん幹細胞を播種したところ、対照群に比べて腫瘍の進展が抑えられた。さらに、それらマウスに H₂O および NaHCO₃ を投与したところ、H₂O 投与群に比べて NaHCO₃ 投与群で有意に腫瘍組織の SOX2 発現や腫瘍の進展が抑えられた。また、VDR をノックダウンした大腸がん細胞を移植したヌードマウスで同様の検討を行ったところ、対照群のマウスに比べて腫瘍が増大し、NaHCO₃ 投与によって、その進展が抑えられた。さらに、患者腫瘍移植モデル (Patient-derived xenograft, PDX モデル) マウスにビ

タミン D₃ を投与すると、腫瘍の増殖が抑制できること、そして、ビタミン D₃ とオキサリプラチンを同時に投与すると腫瘍増殖抑制効果が増すことが分かった。以上の知見は、今後の臨床における大腸がん治療に新しい選択肢を提供することができるだろう。

最後に、大腸がんの腫瘍形成能に VDR と SOX2 発現が影響するの否かを検討した。VDR を過剰発現させた大腸がん幹細胞を播種したヌードマウスでは、対象群に比べて有意に腫瘍発生率が低下したが、SOX2 の過剰発現を伴う場合は、その発生率は上昇した。また、大腸がん患者の予後と VDR および SOX2 発現量の関係を解析したところ、腫瘍組織の VDR 発現が低値かつ SOX2 発現が高値である患者の生存期間が最も短かった。一方、stage III および IV 患者の腫瘍組織の VDR および SOX2 発現量を調べた結果、VDR が高発現している患者では SOX2 が低発現を示し、VDR が低発現の患者では SOX2 が高発現している患者が多かった。次に、大腸がん化学療法の中でオキサリプラチンを含む治療 (FOLFOX と XELOX 療法) を受けた 65 名の進行大腸がん患者の組織検体を用いて VDR および SOX2 の発現量を評価した。原発組織の VDR が高発現の患者に比べて SOX2 が高発現の患者のほうが化学療法に抵抗性を示し、VDR が低発現かつ SOX2 が高発現の患者が最も化学療法に抵抗性を示した。これらの結果から VDR および SOX2 の発現を事前に調べることで無駄な治療を回避できるかもしれない。

以上のように、転写因子である VDR が SOX2 発現を抑制することで、大腸がんの進展や予後、がん幹細胞の stemness に影響を与えるという新しいメカニズムが明らかになった。Hu らは、酸性であるがん微小環境が VDR の核外輸送を引き起こすことで、SOX2 発現を誘導し、大腸がんの悪性形質の獲得に寄与していることを提唱している (図 1)。近年の大腸がん治療の進歩は目覚ましく、本邦でも手術療法、化学療法および放射線療法の治療成績は過去に比べて大きく改善しているが、現在、がんによる死因の第 2 位であり、死亡者数も年々増加している。がん細胞のプロテオームは非常に複雑であり、SOX2 以外にも VDR と拮抗作用を示す因子が存在する可能性もあり、さらなる研究が求められるが、今回紹介した Hu らの報告は、大腸がんの新たな治療戦略の一助になると期待される。

Key words : Vitamin D, Vitamin D receptor, SOX2, Colorectal cancer, Stemness

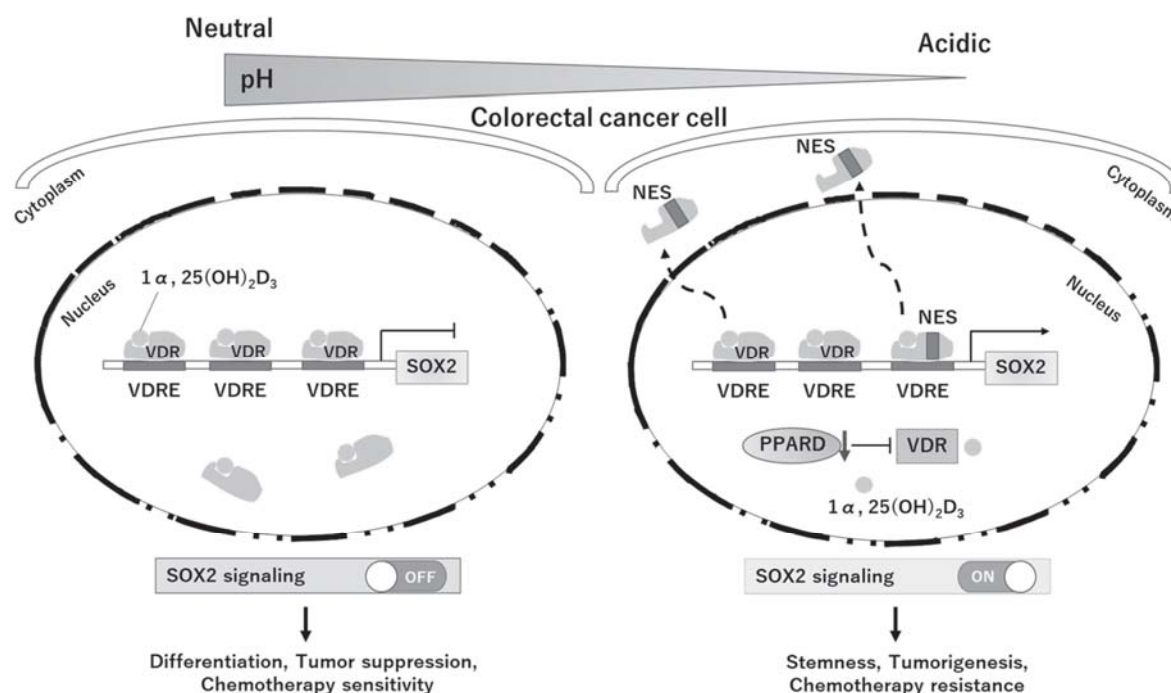


図1 大腸がんの悪性形質に関わる VDR-SOX2 シグナル経路

転写因子である VDR は SOX2 プロモーター領域に存在するビタミン D 応答配列 (VDREs) に結合することで SOX2 発現を抑制する。しかし、酸性微小環境では、VDR の核外輸送が誘導され SOX2 発現が増加することで大腸がんの stemness や悪性化が誘導される。VDR: vitamin D receptor, VDRE: vitamin D response elements, SOX2: SRY-box 2, NES: nuclear export signal, PPARΔ: peroxisome proliferator-activated receptor delta (文献 6 の図を改変, 詳細は本文参照)

¹Clinical Pharmacy, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Mukogawa Women's University

²2nd Department of Biochemistry, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Mukogawa Women's University

Motohiro Yamamori¹, Kazuto Nosaka²

¹ 武庫川女子大学薬学部臨床薬学講座

² 武庫川女子大学薬学部生化学Ⅱ講座

山森 元博¹, 野坂 和人²

利益相反自己申告: 申告すべきものなし

(2022.9.10 受付)

文 献

- 1) Holick MF (2007) Optimal vitamin D status for the prevention and treatment of osteoporosis. *Drugs Aging* **24**, 1017-1029
- 2) Holick MF (2010) Vitamin D: physiology, molecular biology, and clinical applications, 2nd ed. *New York (NY): Humana Press*

- 3) Deeb KK, Trump DL, Johnson CS (2007) Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* **7**, 684-700
- 4) Fleet JC, DeSmet M, Johnson R, Li Y (2012) Vitamin D and cancer: a review of molecular mechanisms. *Biochem J* **441**, 61-76
- 5) Peterlik M, Grant WB, Cross HS (2009) Calcium, vitamin D and cancer. *Anticancer Res* **29**, 3687-3698
- 6) Hu P (2019) Acidosis enhances the self-renewal and mitochondrial respiration of stem cell-like glioma cells through CYP24A1-mediated reduction of vitamin D. *Cell Death Dis* **10**, 25
- 7) Medema JP, Vermeulen L (2011) Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature* **474**, 318-326
- 8) Kreso A, Dick JE (2014) Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell* **14**, 275-291
- 9) Jain RK (2013) Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarkers. *J Clin Oncol* **31**, 2205-2218
- 10) McCullough M (2019) Circulating vitamin D and colorectal cancer risk: an international pooling project of 17 cohorts. *J Natl Cancer Inst* **111**, 158-169
- 11) Fang Y (2017) Smad5 acts as an intracellular pH messenger and maintains bioenergetic homeostasis. *Cell Res* **27**, 1083-1099